

Nová infekce včel přenášená roztočem Varroa?

Jim Burrit, University of Wisconsin-Stout

Když lidé přemýšlejí o včelách, většinou přemýšlejí o letním období, kdy je zjevné, jak jsou včely pro nás potřebné. Je skutečnou radostí být včelař v Západním Wisconsinu, protože je úžasné sledovat, jak to včely dobře dělají - je to něco jako zahradničení :) Je úžasné vidět, jak to funguje dobře - když to funguje dobře., ale je také zajímavé sledovat, jak to nefunguje, když se něco pokazí. Tudiž sledovat včely v zimě je vskutku jiný příběh - a já Vám o včelách v zimním období budu nyní povídat, jelikož včely jsou v rámci hmyzu opravdu zvláštní - je to jediný druh hmyzu, který se zahřívá po celou zimu v našem klimatu. To je vskutku zajímavá vlastnost a je to i velký problém pro včely, když jejich systém nefunguje správně. Takže zimní období je pro včely v Západním Wisconsinu opravdu výzva a většina z nás, pokud přijde o svá včelstva, přijde o ně během zimy, což vzbuzuje veliký zájem o to, co můžeme udělat pro to, abychom včelstva během zimy udrželi zdravá. Tam, kde jsme to sledovali, jsme zjistili, že ztráty dosahují někde kolem 70 - 80%, bez toho abychom chápali proč - takže my vlastně více ztrácíme než chováme během zimy. To je veliký problém.

Zde je obrázek zdravých včel - to je jeden z těch neobvyklých příkladů, co jsem měl, kdy to včely zvládly přes zimu velmi dobře, byly před zimou silné, měly dobré léto a byly před zimou zdravé a zimu přežily, což prokazuje, že stále pokud to včelstvo dobře funguje, tak včely zimu zvládnou, ale obvyklé to už tolik není.

Takže to, co vidíte na obrázku, jsou všechno živé včely, poté co jsem odstranil z vrchu pevnou pěnovou izolační desku, je tam spousta zdravých včel. Takže takto by to mělo vypadat.



Ale nemusím zřejmě ukazovat mnohým včelařům, jak to vypadá, když to včely přes zimu nezvládnou. Situace, na kterou jsem často narazil, když jsem otevřel úl během zimy, je malý shluk zmrzlých včel. Zde horní obrázek ukazuje, že průměr toho shluku je asi 12cm, a ten spodní obrázek ukazuje, jak to vypadá, když z toho shluku odstraníte ty vrchní mrtvé včely - vidíte všechny včely s hlavičkama uvnitř buněk, jak jsou jedna přes druhou, ja je to smutný obrázek. Když jsem to poprvé viděl ve Wisconsinu, ptal jsem se sám sebe, co to znamená?

Ptám se vás, co to znamená? Je to hladovění? I když jsem neviděl nikde, že by to bylo dokázáno, vypadá to opravdu, že je to umrtví hlady. Ale to, co bylo zvláštní, je, že poblíž těchto shluků včel byly zásoby medu. Takže to neznamená, že by včelař nenechal včelám dostatek zásob, znamená to, že ty včely prostě nebyly schopné se k těm zásobám dostat ve chvíli, když se ten shluk dostane do nějakého kritického stavu - včely jsou zavěšeny na sobě dolů a nejsou schopny se pohnout do strany. Občas v tom úle je spousta medných zásob.

Takže jsem si jistý jednou věcí - včely neumřou na zimu - mohly by a asi by i umřely, kdyby byly osamocení jednotlivci, ale s ohledem že vytváří tu hmotu, neumřou zimou.

Dostanu se k tomu ještě později, ale zmíním to již nyní - jsem přesvědčen, že neztrácíme tolik včelstev na Nosemu.



Každopádně tato situace na obrázku je celkem častá a já se ptám, co to zapříčiňuje? Zřejmě to má několik důvodů, ale tím hlavním je, že včelstvo, které bylo na počátku silné a skončí takto je to, že ta kolonie "krvácela" včely už nějakou dobu - včely příliš rychle umíraly.

Dneska bych Vám chtěl povědět o 3 tématech:

1. Hemocyte Profiling - Profily dle hemocytů
2. Bakteriální infekce u dospělých včel přenášená Varroa.
3. Imunologické sondy do imunitních funkcí včel

1. Hemocytové profily (Profily dle hemocytů)

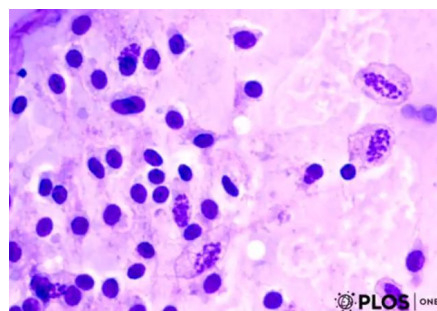
Vytvořili jsme metodu, kterou charakterizujeme bílé krvinky včel, zjistili jsme že každá včela má svůj "profil" a můžeme porovnávat včely mezi sebou, jelikož tyto profily jsou odlišné. Myslím, že to bylo v létě 2013, kdy já a Mike Kruger jsme začali sbírat "krev" ze včel - jmenuje se hemolymfa, ale budu to nyní nazývat "krev". Když jsme tu "krev" sbírali, byli jsme velmi zvědaví, co se v ní nachází, co můžeme nalézt a co můžeme studovat? Takže v následujících letech jsme se stovkami studentů sbírali "krev" ze včel.

Tady na tom obrázku vidíte, jak ten proces probíhá. Včelu musíte zabít, abyste to mohli provést. Včela je zchlazena, abyste s ní mohli pracovat - tudíž jsme sesbíraly světlé včely, vložili jsme je do nádoby s ledem, což včely to hned uspí, ale neumřou. Pokud je zahřejeme, opět se začnou pohybovat.



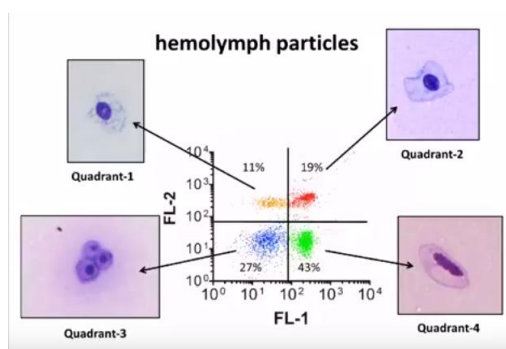
Takže takto probíhal sběr hemolymfy a poté jsme se rozhodovali, co můžeme dělat. Nejdříve jsme chtěli zjistit, co je v ní, tudíž jsme dali hemolymfu na mikroskopické sklíčko. Takto jsme viděli tekutinu, která měla být krvinkami - ty se nazývají u včel hemocyty a mají překvapivě množství funkcí obdobně jako bílé krvinky u člověka. Ale když jsme se je snažili zvýraznit/probarvit, abychom se na ně mohli lépe podívat, pomocí látky, která se používá na zvýraznění lidských krvinek, nedařilo se nám je nikdy vidět, z čehož jsme byli frustrováni. Ale náhodně se nám podařilo zjistit, že když sklíčko natřete tenkou vrstvou roztoku želatiny, dokážete buňky již dobře rozlišit.

Tímto způsobem jsme spatřily veškeré buňky, různé typy. Tudíž jsme si říkali, co tam všechno je? Co to všechno znamená? Ale nikde jsme nebyli schopni nalézt nějaký obdobný obrázek

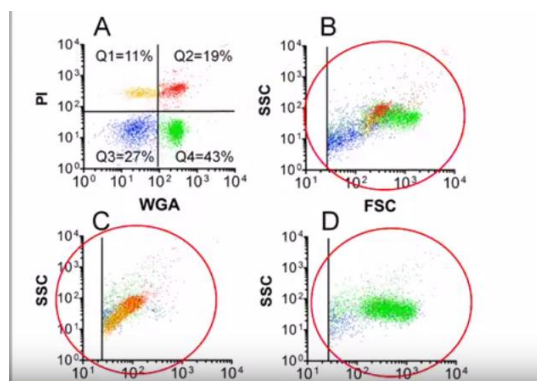


V tu samou dobu jiný student - Moringa(?) - se zajímal o to, co se stane, pokud hemolymfu vložíme do Průtokového cytometru (Flow Cytometer) - stojí, který je speciálně určen pro charakterizování buněk.

To, co jsme objevili po té, co jsme pracovali s různými barvivy (fluorescentními barvivy), bylo, že můžeme rozdělit jednotlivé buňky do 4 podskupin - rozdělili jsme tak dané buňky do daných 4 kvadrantů.. Zjistili jsme, že můžeme kvantifikovat procentuální zastoupení těchto buněk a tím vlastně přijít s jistým "sériovým číslem" či jistým "čárovým kódem" dané včely - a to je hemocytový profil.



Když jsme se podívali na několik různých včel, které měly být zdravé, existovaly rozsáhlé rozdíly mezi těmito hemocytovými profily. Toto jsou profily 3 různých včel - z čehož vidíte, jak jeden profil může být rozdílný od druhého a zjistili jsme, že tyto včely mají různé možnosti ohledně jejich imunitních funkcí - nemyslíme si, že je to náhoda, jsme přesvědčeni, že Matka příroda to takto naprogramovala, ale nikdo ještě "nerozlomil" ten kód, co tyto jednotlivé profily znamenají - velmi nás to zajímá a já jsem doufal, že od chvíle, co jsme tuto studii publikovali, někdo se toho ujme a vyřeší to, ale zatím to nikdo neudělal - pro mne je to velmi zajímavé a překvapuje mne to, že to nikdo neřeší.



Nevíme, jestli ty včely měly stejný věk, tudíž by to mohl být jen rozdílný věk - už to by bylo zajímavé.

Mohlo by to být od jiných trubců, i to by bylo zajímavé.

Publikovali jsme studii ohledně různých množství Varroa v úlech ve spojitosti s hemocytovými profily včel - i tam jsme hledali určitou spojitost.

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Honey Bee Hemocyte Profiling by Flow Cytometry

William J. Marrings, Michael J. Krueger, Nancy L. Burritt, James B. Burritt*

Department of Biology, University of Wisconsin-Stout, Menomonie, Wisconsin, United States of America

Abstract

Multiple stress factors in honey bees are causing loss of bee colonies worldwide. Several infectious agents of bees are believed to contribute to this problem. The mechanisms of honey bee immunity are not completely understood, in part due to limited information about the types and abundances of hemocytes that help bees resist disease. Our study utilized flow cytometry and microscopy to examine populations of hemolymph particulates in honey bees. We found bee hemolymph includes permeabilized cells, plasmatocytes, and acellular objects that resemble microparticles, listed in order of increasing abundance. The permeabilized cells and plasmatocytes showed unexpected differences with respect to properties of the plasma membrane and labeling with annexin V. Both permeabilized cells and plasmatocytes failed to show measurable mitochondrial membrane potential by flow cytometry using the JC-1 probe. Our results suggest hemolymph particulate populations are dynamic, revealing significant differences when comparing individual hive members, and when comparing colonies exposed to diverse conditions. Shifts in hemocyte populations in bees likely represent changing conditions or metabolic differences of colony members. A better understanding of hemocyte profiles may provide insight into physiological responses of honey bees to stress factors, some of which may be related to colony failure.

Citation: Marrings WJ, Krueger MJ, Burritt NL, Burritt JB (2014) Honey Bee Hemocyte Profiling by Flow Cytometry. PLOS ONE 9(10): e108466. doi:10.1371/journal.pone.0108466

Editor: Gra V. Amdam, Arizona State University, United States of America

Received: February 14, 2014; Accepted: August 29, 2014; Published: October 6, 2014

Copyright: © 2014 Marrings et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The authors wish to acknowledge funding from the Honey Bee Health Task Force of the North American Pollinator Protection Campaign (NAPPC). The authors also acknowledge an internal Student Research Grant from the University of Wisconsin-Stout Bees to Learning Program and a grant from the Stout University Foundation. The opinions expressed are those of the authors and do not necessarily reflect the views of the funders. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

2. Bakteriální infekce u dospělých včel přenášená roztočem Varroa

Jak včelstvo ztrácí včely v průběhu pozdního léta, během podzimu a během zimy, v určitou chvíli se může dostat do stavu, kdy nemá dostatečnou masu, dostatečný počet včel, aby udrželo teplo. V tu chvíli se podchládí, začnou hladovět a umřou hladu - to myslím, že se děje - a takto to vypadá - toto jsou poslední dny včelstva, které jsem sledoval - tento shluk je stále živý, ale to je vše, už to není včelstvo, i když to má matku, tak možná bude bojovat, možná přežije do jara, ale to není včelstvo, se kterým chcete začínat na jaře.



Včelaři jsou zvláštní stvoření - často dělají vše pro to aby udrželi svá včelstva živá, experimentují a je to opravdu tvrdá práce. I já jsem to zkusil, a jednou z věcí, co jsem vyzkoušel bylo, že jsem obehnal včelstvo izolací a říkal jsem si, to jim udrží teplo. Takže zde vidíte dva úly obehnané izolací kolem dokola i navrchu (vidíte tu pevnou pěnovou desku). Věřil jsem s tou izolací budou opravdu v telpe. Navrchu jsem udělal ventilační otvor, kudy v noci jde vidět i sloupec páry, který vychází ze včel, takže když jsem šel v noci se na ně podívat, viděl jsem, díky tomu sloupci, že jsou včely skutečně živé. Když jsem k těm úlům přišel, spatřil jsem levý úl bez mrtvých včel a pravý úl s mrtvými včelami v okolí otvoru. Odstranil jsem tedy mrtvé včely, vrátil jsem se po několika dnech a viděl jsem to samé - říkal jsem si, co se tam děje?



Takže tyto mrtvé včely na vrchu víka se staly šťastným bodem našeho výzkumu - ony jsou nemocné a snaží se opustit včelstvo - to je to, co si myslím já, možná se mýlím.

Takže jsme začali jeden ten úl studovat podrobněji, otevřeli jsme ho zvrchu, a zde vidíte uprostřed, kde je otvor do úlu, skupinu velmi aktivních, světlých včel, které vypadají velmi zdravě. Ale všude kolem dokola, po okrajích, byly - jak jsem si myslel já - mrtvé včely. Včelstvo ztrácelo včely vrchem a zřejmě i spodem, ale viděl jsem je hlavně na vrchu.



Když jsem se podíval dovnitř na rámečky, uviděl jsem shluk včel, dobrý shluk, sice bych si přál, aby byl větší, ale byl OK. - se spoustou zdravých včel. A neviděl jsem žádné pokálení - k tomu nedojde, dokud je včelstvo živé, včely se pokálí těsně před úmrtím, takže zde se nejedná o žádnou Nosemu



Začali jsme tedy sbírat vzorky včel, které jsme považovali za mrtvé a i těch živých včel. To, co bylo zajímavé bylo, že včely, které jsme považovali za mrtvé, ve chvíli kdy se nám náhodou dostali v laboratoři na svobodu, začaly se hýbat. Tudíž včely, o kterých jsme si mysleli, že jsou mrtvé, nebyly mrtvé - alespoň ne všechny. Ty, co se začaly hýbat, se pohybovaly ale velmi velmi pomalu - byly evidentně opravdu nemocné.

Ve chvíli, co jsme nanесли hemolymfu z těchto včel na sklíčko a vložili pod mikroskop, viděli jsme toto:

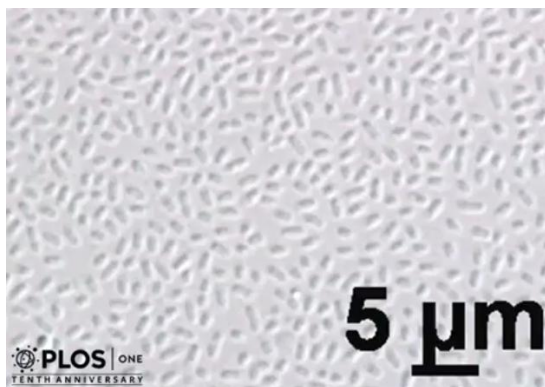
Dívali jsme se na něco neočekávaného a zřejmě významného. Toto je čerstvá hemolymfa ze včely A nepodaří se vám v životě dosáhnout příliš vyšší koncentrace než této - to prostě nejde. A tyto včely byly stále živé!

Našli jsme tyto bakterie ve všech těch nemocných, pomalých včelách, které se odpojily od shluku a pravděpodobně byly na cestě umřít.

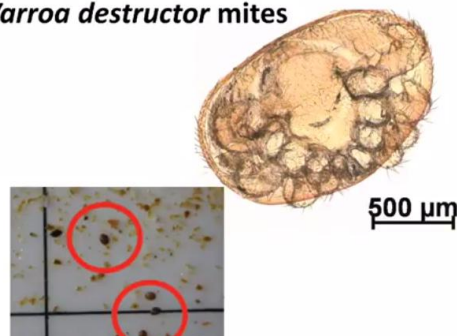
Toto jsme našli u včel během zimy, ale našli jsme to i u trubců během léta. Nenašli jsme tyto bakterie u dělnic během teplých měsíců. Jak to? Protože umřou vně úlu - opustí úl, když cítí, že jsou nemocné - to si myslím já, jsou to mé spekulace, ale je to podpořeno výzkumem na univerzitě v Minnesotě, kde potvrdili, že včely, když onemocní, aby zachránily kolonii, opustí ji - když jsou již opravdu nemocné. I trubci opouštěli včelstvo, viděli jsme je ale kolem úlu na zemi. Koncentrace bakterií v jejich hemolymfě byla ještě vyšší.

Začali jsme tedy shromažďovat více vzorků.

Našli jsme tedy tyto bakterie u zimních dospělých včel v letním období u trubců a tudíž s ohledem, že se Varroa živí hemolymfou, jasnou otázkou bylo, jestli nalezneme bakterie i ve Varroa - a našli jsme - zde máte misku s bakteriemi z jednoho kleštíka - na to, že je to z jednoho, je to opravdu hodně a navíc - je to čistá kultura.



Varroa destructor mites



Otázkou zůstává, co dokazuje, že tato bakterie způsobuje, že jsou včely nemocné? Já tyto otázky dostávám od vědecké komunity.

Na základě dalších zkoumání a porovnání genových databází nám vyšlo, že se jedná o bakterii Serratia, což mne velmi překvapilo, jelikož jsem jako zdravotnický pracovník v laboratoři pracoval často s bakterií Serratia, ale toto vypadalo úplně jinak než cokoli, co jsem do té doby viděl. Na základě dalšího zkoumání sekvencí genomů nám vyšlo, že se jedná o Serratia marcescens - kmen Sicaria (Ss1). Co je též zajímavé, Serratia - kmen SCBI, který je nejbližší kmen Ss1 - byla nalezena u zavíječe voskového (Galleria mellonella) - jedná se o bakteriální patogen zavíječe. Nevíme, jestli je toto jen náhoda.

Koncentrace bakterií ve včelách, které jsme zkoumali, byla neočekávaně vysoká.

U symptomatických včel - dělnic - v zimním období byla koncentrace bakterií v jejich krvi přes 10^9 v 1ml krve, u asi 3% dělnic z letního období, které se nám podařilo zkoumat, byla koncentrace 10^5 (10000x nižší), koncentrace u symptomatických trubců z letního období byla nejvyšší ze všech - 10^{10} a v krvi kleštíka byla koncentrace obdobná jako u zimní dospělé včely, která byla velmi nemocná - nemyslíme si, že toto je náhoda.

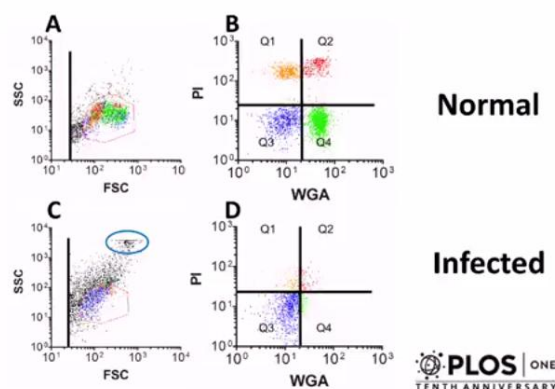
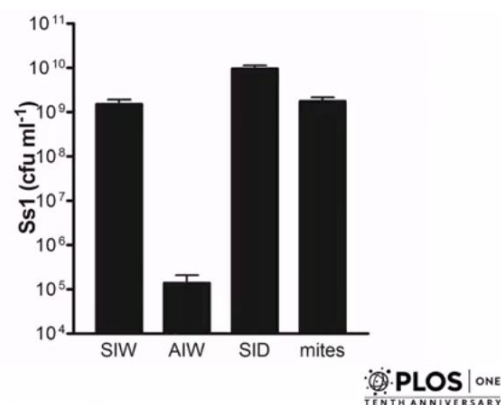
Domníváme se, že Varroa, které se krmí krví dospělých dělnic, mají v sobě obdobnou koncentraci. Ne všechny Varroa roztoči jsou pozitivní, většinou kolem poloviny, někdy až 70%, obvykle do 50%. Pro srovnání, člověk umírá na krevní infekci, když koncentrace bakterií je 10^2 /ml až 10^3 /ml krve. Tyto zkoumané včely vykazovaly někdy až milionkrát vyšší koncentrace bakterií v hemolymfě a byly stále naživu. To vypovídá něco o houževnatosti hmyzu.

Vraťme se k průtokovému cytometru, protože vzpomeňte si, že jsme zatím zkoumali jen bakterie v hemolymfě, ale neviděli jsme ještě hemocyty. Otázkou tedy je - můžeme spatřit ztrátu bílých krvinek? A odpovědí je ano, vidíme to. Nahoře na obrázku máte normální včelu, ale u těch velmi nakažených včel - obrázek dole - vidíte pouhým okem ten rozdíl.

Zároveň jsme objevili velké granulóvé částice - a zjistili jsme, že se jedná o pylová zrna.

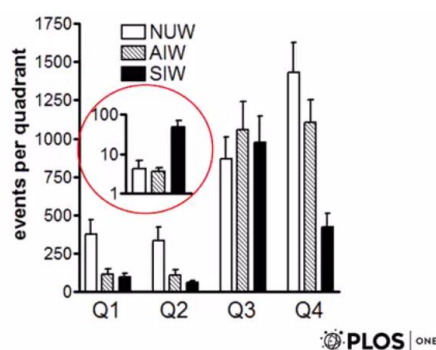
Takže tyto infikované včely s vysokou koncentrací bakterií v hemolymfě měly zároveň v hemolymfě i pyl! Domníváme se, že ta infekce narušila sliznici trávicího traktu a tím se uvolnil obsah trávicího traktu do hemolymfy.

Zde tedy máte obraz hemolymfy nakažené včely, vidíte pylové zrno a spoustu bakterií a zdá se, že u těchto včel sliznice trávicího ústrojí selhává. A zdá se, že se to děje dost často.



Zde máte pro srovnání obsahy pylových zrn u normálních včel, asymptomatických dělnic a symptomatických dělnic, jak se zvyšuje obsah bakterií u těch nakažených včel, výrazně roste i obsah pylových zrn v hemolymfě.

Navíc jsme se přesvědčili, že to nemůže být způsobeno během odběru hemolymfy.



Naše výsledky:

- zkoumali jsme 3219 včel, 1259 roztočů Varroa v letech 2014 - 2016
- 91 včelstev z různých částí USA
 - z čehož 33 v sobě mělo kleštika (76% z nich bylo pozitivní na *Serratia*)
 - v 66 včelstvech bylo přes 48% pozitivních dělnic
 - v 33 včelstvech, co nepřežilo zimu, bylo 73% pozitivních včel

- jednalo se o stejnou bakterii ve včele i v roztoči
- objevili jsme nový kmen bakterie *Serratia*, který jsme nazvali Ss1

Naše domněnky - na které nemáme přesné důkazy:

- je možné spojit nemocnost včely s přítomností dané bakterie? Zdá se, že ano
- jaké je geografické rozšíření bakteriálního kmenu *Serratia* Ss1? Nalezli jsme ho všude, kde jsme v rámci Wisconsinu, Minnesoty dělali odběry, našli jsme ho i ve vzorku, který pocházel z území mimo USA. Domníváme se tedy, že se nejedná pouze o lokální záležitost.
- opustí nakažená včela včelstvo, když přesáhne koncentrace bakterií v hemolymfě určitou hranici? Myslíme, že ano a že to potvrzuje i to, že jsme v létě nenalezli žádnou dělnici, která by byla nakažená. Nalezli jsme trubce, ti se též snaží opustit včelstvo, ale zdá se, že to nedokážou tak efektivně, jako dělnice.

Testovali jste plod? Ano, testovali jsme zavíčkovanou trubčinu, která v sobě měla roztoče Varroa a ano, našli jsme tam danou bakterii. Co vím, tak jsme nikdy neevidovali, že by bakterie nakazila plod - nejedná se o nemoc plodu, tudíž co vím, bylo by to jediné bakteriální onemocnění, které se přenáší přímo na dospělé jedince dělnic.

Není možnost, že by se - obdobně jako některé bakteriální nemoci - přenášelo přes matku? I my jsme se tohoto obávali, ale nikdy jsme nenarazili na nevylihnutý plod dělnic ani trubců, který by prokazoval nemoc (pokud v něm nebyl roztoč) - oproti třeba moru včelího plodu.

Testovali jsme královnu dvakrát a našli jsme v ní bakterii *Serratia*.

Publikovali jsme tuto studii jako článek, který naleznete zdarma přístupný online.



RESEARCH ARTICLE
 Sepsis and Hemocyte Loss in Honey Bees (*Apis mellifera*) Infected with *Serratia marcescens* Strain Sicaria

Nancy L. Burritt¹, Nicole J. Foss¹, Eric C. Neeno-Eckwal¹, James O. Church², Anna M. Hilger³, Jacob A. Hildebrand⁴, David M. Warshauer⁵, Nicole T. Perna⁵, James B. Burritt^{1*}

¹ Department of Biology, University of Wisconsin-Stout, Menomonie, WI, United States of America, ² Biotechnology Center, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, United States of America, ³ Department of Biology, Lafayette University, Philadelphia, PA, United States of America, ⁴ Wisconsin State Laboratory of Hygiene, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, United States of America, ⁵ Genome Center of Wisconsin, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, United States of America

* burritn@uwstout.edu



Zde jsou moje navrhované teorie týkající se infekce:

Začíná to tím, že Varroa přenesou bakterii do nového včelstva, novým včelám, s ohledem, jak se roztoč živí na dospělé včele.

Noví roztoči se mohou žít na infikovaných včelách, ne všichni roztoči jsou pozitivní, někteří ano a bakterie mohou být přeneseny na nové včely a do nového včelstva, bakterie nepoškozuje roztoče

Včely se pomalu stávají symptomatické (ne všechny najednou, ale pomalu) a příp. opouští včelstvo.

Postupná ztráta včel v průběhu zimy zabraňuje otužilosti včelstva. Ne pokaždé musí včelstvo umřít, ale často se tak zřejmě děje - to jsme ale neprokázali.

3. Imunologické sondy do imunitních funkcí včel

Závěr - poznatky:

- včelstva málokdy umírají na chlad či na Nosemu
- Varroa roztoč jsou přenašeči onemocnění, která zabíjí naše včely
- chemikálie (akaricidy, neonicotinoidy, antibiotika) mají negativní vliv na včely
- je třeba uvažovat i o dalších - nám v současnosti neznámých - infekcích (nových bakteriálních onemocněních?)
- pro analýzy je třeba pracovat s dobrými, čerstvými vzorky (zjistili jsme ale, že třeba Serratia setrvává ve včele i 1 rok, když je v mrazáku - tam je dost otužilá, ale třeba v roztoči je "half-life" - "poločas-život" - jen 10 dní)