Food and Agriculture Organization of the United Nations

Reef ريف

وزارة البيئة والمياه والزراعة
Ministry of Environment Water & Agriculture

الإجراءات التشغيلية الموحدة لتشخيص مرض النوزيما الذي يصيب النحل : التحديد النوعي والكمي للمرض

BEE/051/2022/3

Strengthening MoEWA's Capacity to implement its Sustainable Rural Agricultural Development Programme (2019-2025) (UTF/SAU/051/SAU)

Food and Agriculture Organization of the United Nations

Riyadh, Kingdom of Saudi Arabia

قائمة المحتويات

1- المقدمة 3

2- العلامات والأعراض المرضية لمرض النوزيما 3

3- المعدات وأدوات الكشف اللازمة للتحديد النوعي والكمي لمرض النوزيما 4

4- جمع العينات والإجراءات الاحترازية ..... **Error! Bookmark not defined.**

4-1 جمع العينات 6

4-2 الاجراءات الاحترازيةاللازمة خلال جمع العينات 7

5- حفظ العينات ماقبل وبعد التحليل 7

6- إجراءات التحديد لمرض النوزيما(الفحص النوعي والكمي) 7

6-1 تحديد الإصابة بمرض النوزيما(الفحص النوعي) 7

6-2 تحديد الإصابة بمرض النوزيما(الفحص الكمي) 7

6-2-1 ترشيح خليط بطون النحل 7

6-2-2 عملية الطرد المركزي **8**

6-2-3 إعادة تعليق الكُريّات **8**

6-2-4 إحصاء الفطريات باستخدام شريحة العد((Haemocytometer **8**

7- المراجع **11**

1- المقدمة

مرض النوزيما هو مرض فطري يصيب نحل العسل وينتشر في العديد من البلدان في العالم ويسبب النوزيما نوعان مختلفان من الفطريات؛ يُعرف النوع الأول بـ(نوزيما أبيس)"Nosema apis"، فيما يُعرف النوع الثاني بـ(نوزيما سيرانا) "Nosema ceranae". وتُعد الفطريات هي العامل المسبب لهذا المرض ويكون انتشار العدوى بين النحل إما عن طريق تناول العسل أو حبوب اللقاح أو الماء الملوث بالجراثيم أو تلوث مدخل الخلية ببراز النحل المصاب أو عملية التبادل الغذائي فيما بين عاملات النحل "Trophallaxis". ويمكن أن تظل الفطريات معدية لمدة تصل إلى (5) سنوات. كما يمكن أن يتفاقم هذا المرض بسبب الضغوط البيئية المختلفة، ونُدرة العسل وحبوب اللقاح، وتقلب الظروف المناخية الموسمية، وانتشار أمراض أخرى بين طوائف النحل مثل (الفاروا والفيروسات والأميبا). يؤدي مرض النوزيما إلى نفوق عدد كبير من طوائف النحل سنويًا في جميع أنحاء العالم ويعتبر أحد العوامل المسببة لظاهرة (اضطراب انهيار طوائف النحل). ويرجع سبب ظهور هذا المرض حاليًا على نطاق واسع في الغالب إلى انتشار الفطريات من نوع "نوزيما سيرانا" الذي يصيب طوائف النحل دون ظهور أي علامات أو أعراض مرضية ملحوظة. لذلك، من المهم إجراء التشخيص المجهري لعينات النحل لغرض الكشف المبكر عن المرض واتخاذ التدابير الوقائية وإجراءات المكافحة اللازمة. وقد أعدت هذه المذكرة حول الإجراءات التشغيلية الموحدة لتوجيه المختصين المشاركين في المسح التشخيصي للتحديد النوعي والكمي لمدى انتشار مرض النوزيما بين طوائف النحل في المملكة العربية السعودية. ومن المؤمل أن يُستفاد من هذه المذكرة الفنية في مراقبة وتأكيد جودة المسح التشخيصي الجاري حاليًا. واُستند في إعداد هذه المذكرة الفنية إلى الدراسات المصّدقة حديثًا واعتماد أحدث المنشورات العلمية الصادرة عن (الوكالة الفرنسية للغذاء والصحة والسلامة البيئية والمهنية (Human,2013 (ANSES, 2020)واخرون (OIE Manual, 2021)

إلى جانب الإجراءات التشغيلية الموحدة، تم وضع قائمة مرجعية مفصلة لمساعدة الخبراء الميدانيين على جمع المعلومات اللازمة حول المناحل وطوائف النحل الخاضعة للفحص وجمع العينات. حيث تسهم هذه المعلومات في فهم مدى تأثير انتشار المرض ولتمييز العوامل التي تساهم في نشأته وانتشاره.

2- العلامات والأعراض المرضية لمرض النوزيما

تتمثل بعض الأعراض المرضية الرئيسية لطوائف النحل المصابة بمرض النوزيما فيما يلي:

(أ) الأعراض الناجمة عن الإصابة بفطريات نوزيما أبيس "Nosema apis":

- إصابة نحل العسل بالرجفة؛
- انتفاخ وتضخم البطن لدى النحل المصاب؛
- فقدان بعض النحل القدرة على الطيران أو الإصابة بالشلل؛
- وجود النحل النافق حول الخلية؛
- وجود علامات براز النحل على الأطراف وفي مقدمة خلايا النحل؛
- انخفاض إنتاج الحضنة؛
- التضاؤل التدريجي لعدد النحل داخل الطوائف؛
- النمو البطيء لطوائف النحل (خاصة في فصل الربيع).

شكل (1) أعراض الإصابة بمرض النوزيما خارج الخلايا

شكل (2) أعراض الإصابة بمرض النوزيما داخل الخلايا

(ب) الأعراض الناجمة عن الإصابة بفطريات النوزيما سيرانا "Nosema ceranae":

عموما يمكن القول بأنه لا توجد أعراض واضحة للنوزيما سيرانا وبما في ذلك عدم وجود علامات تلوث عن طريق البراز أو خلافه إلا انه يمكن ملاحظة الاتي:-

- التدهور التدريجي لأعداد النحل البالغ في الطوائف
- ارتفاع معدل نفوق النحل في فصلي الخريف والشتاء (على مستوى المنحل).
- تدهور طوائف النحل وموتها تدريجيًا دون ظهور أي علامات أو أعراض مرضية.

شكل (3) وشكل (4) نقص عدد الأفراد بالخلية وهو أحد أعراض الإصابة بمرض النوزيما سيرانا

3- أنواع الكشف والفحوصات:-

التمييز بين أنواع النوزيما

يمكن التمييز بين أنواع النوزيما من خلال قياس أحجام الجراثيم تحت المجهر الضوئي باستخدام ميكرومتر عيني (ocular micrometer). تكون جراثيم N. ceranae في المتوسط أصغر من الأبواغ N. apis حجم N. ceranae: حوالي 4.7 × 2.7 ميكرومتر. التي يتراوح طولها من 3.9 إلى 5.3 ميكرومتر وعرضها 2.0 - 2.5 ميكرومتر، بينما يبلغ عرض N. apis حوالي 6 × 3 ميكرومتر(Chen، 2009). لكن التمايز الدقيق بين النوعين لا يمكن أن يتم إلا من خلال التحليل الجيني، اختبارات تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR).

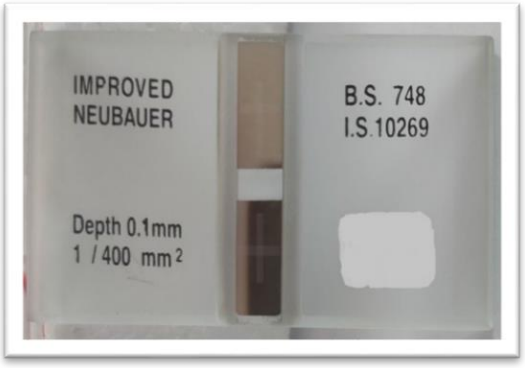
4- المعدات وأدوات الكشف اللازمة للتحديد النوعي والكمي لمرض النوزيما

مواد ومعدات الكشف

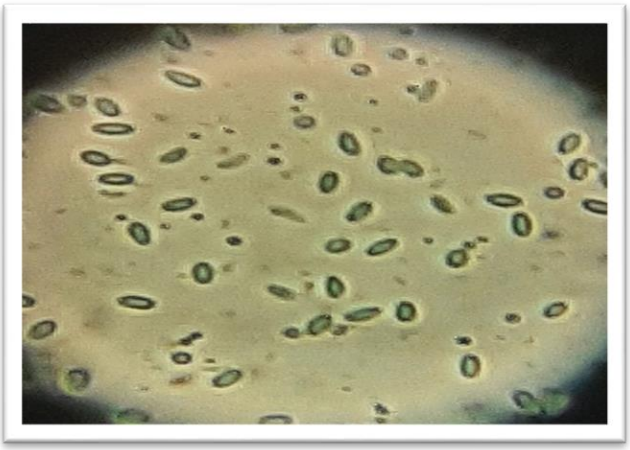
- موس جراحي
- ملقط
- مقص تشريح مستقيم
- هاوُن وَمدَقّة سعة (100 مل)
- ماصة للاستخدام مرة واحدة بحجم (5م و10م)
- شرائح مجهرية وأغطية
- شريحة العد (Haemocytometer)
- مايكرومتر عيني (ocular micrometer)
- حلقة التلقيح سعة (10 ميكرو لتر)
- ماصّة البسترة أو القطارة
- أنبوب طرد مركزي سعة (50 مل)
- قطن ترشيح
- جهاز رج الانابيب
- ماء مقطر
- مجهر ضوئي بدقة (400 x)
- عداد يدوي
- جهاز الطرد المركزي
- جهاز PCR
- أنابيب اختبار لجمع عينات النحل
- قفازات طبية

شكل (5) هاون ومدقة لهرس عينات بطون النحل

شكل (6) مجهر لفحص الشرائح



شكل رقم (7): شريحة العد



شكل شكل(8) جراثيم النوزيما كما تبدو في الفحص المجهري لعينة مصابة من احد المناحل بمنطقة المدينة المنورة بتاريخ 24/02/2022

شكل (9): جهاز PCR

5- إجراءات واحتياطات جمع العينات

5-1 جمع العينات

يمكن وصف درجة الإصابة بعدوى مرض النوزيما في طائفة النحل من خلال متوسط أعداد جراثيم الفطر لكل نحلة

عن طريق أخذ عينة مُجّمعة:

يتم إجراء كشف العينة المُجمعة عن طريق سحق عشرة من شغالات النحل معًا ثم تقدير متوسط عدد جراثيم الفطر لكل شغالة ويُعتبر كشف العينات المُجمعة أفضل وأسرع في عملية الكشف الميداني السريع.

تقدير مستوى إصابة النحل بشكلٍ فردي:

. وتُستخدم درجة إصابة النحل الفردي لتقدير نسبة النحل المصاب في الطائفة. واستناداً للطريقة التحليلية لصحة الحيوان من (الوكالة الفرنسية للغذاء والصحة والسلامة البيئية والمهنية(ANSES،2020) تم اقتراح إمكانية استخدام عشرة من شغالات النحل في الكشف لكل طائفة واحدة ووفقًا للطريقة التحليلية لصحة الحيوان (ANSES، 2020)، تم اقتراح إمكانيات استخدام 10 نحلات لكل طائفة، بينما وفقًا لمنظمة (2021) OIE يُقترح استخدام ما يصل إلى 60 نحلة لكل طائفة للحصول على نتيجة دقيقة.

وفيما يخص الكشف عن المناحل، يتعين جمع العينات من خمسة طوائف مختلفة على الأقل في المنحل الواحد والموزعة في اتجاهات متباعدة يتم اختيارها عشوائيًا لتمثل كافة الطوائف في المنحل. ومع ذلك، يمكن تعديل عدد العينات التي ينبغي جمعها بناء على عدد الطوائف في المنحل والوقت والموارد المتاحة لإجراء التشخيص. كما ينبغي تعيين رقم مرجعي (رمز) لكل طائفة من الطوائف الخاضعة للكشف وجمع العينات وترقيم عبوة العينات المُجمعة حسب الرقم المسجل للطائفة بدقة وكذلك تسجيل الرقم في نموذج الكشف أو بصيغة جداول بنظام إكسل (Excel) لسهولة الرجوع إليها.

وينبغي من كل طائفة جمع حوالي (50) من شغالات النحل لغرض الكشف، ومن ثم الاحتفاظ بالنحل المتبقي من التحليل مبّرداً للرجوع إليه إذا تطلب الأمر أو في حالة الحاجة إلى تكرار إجراء الاختبار. كما يلزم تشخيص عينات

النحل التي تم جمعها من طائفة واحدة والرفع بالتقارير بشأنها بشكل منفصل. وإلى جانب جمع العينات، من المفيد أيضاً القيام بالتدوين وتسجيل الملاحظات في حالة وجود أي علامات وأعراض مرضية للطوائف الخاضعة للكشف والعوامل الأخرى ذات الصلة. (انظر القائمة المرجعية المرفقة بصيغة أكسل).

2-5 الاجراءات والاحتياطات اللازمة خلال جمع العينات

- يتعين التركيز على شغالات النحل الكبيرة بالعمر فقط أثناء جمع النحل لأخذ العينات.
- ينبغي أخذ العينات من شغالات النحل خارج مدخل الخلية
- يجب تجنب جمع النحل صغير السن الذي يحلق حول الخلية، والذي يمكن التعرف عليه من خلال سلوك التحليق بأعداد كبيرة خارج مدخل الخلية ومن الأفضل تجنب القيام بجمع العينات في مثل هذه الظروف.
- عند خلو مدخل الخلية من مجموعات النحل صغير السن التي تحلق حول مدخل الخلية، يمكن جمع النحل الأكبر سنًا من الإطارات الطرفية بعيدًا عن إطارات الحضنة لتجنب أخذ عينات من النحل صغير السن الذي خرج من العيون السداسية حديثا.

6- حفظ العينات ما قبل وبعد التحليل

- إذا كان سيتم تحليل العينات مباشرةً، فيمكن حفظها مبرّدة عند درجة حرارة (+4 درجة مئوية)
- وفي حال عدم التمكن من تحليل العينات على الفور، فيجب حفظها مجمدة عند حوالي (-20 درجة مئوية تحت الصفر)
- أما في مرحلة ما بعد التحليل، يجب تخزين العينات المتبقية مجمدة عند ما يقارب (-20 درجة مئوية تحت الصفر).
- كما يجب مراعاة تسجيل كافة المعلومات الخاصة بكل عينة ويشمل ذلك
  - الرقم التسلسلي للعينة
  - اسم المنطقة (المحافظة المركز)
  - اسم الموقع
  - اسم النحال

7- إجراءات التحديد لمرض النوزيما (الفحص النوعي والكمي)

7-1 تحديد الإصابة بمرض النوزيما (الفحص النوعي)

- وضع عشر شغالات على طبق بتري أو أي وعاء نظيف
- إزالة بطون الشغالات العشر عن طريق قطع الأرجل باستخدام مقص وملقط
- وضع البطون المستخرجة في الهاون ثم إضافة حوالي(5 مل) من الماء النقي باستخدام ماصّة
- سحق البطون بإستخدام المِدَقّة جيداً
- وضع (10 ميكرولتر) من خليط المعلق باستخدام حلقة التلقيح على شريحة مجهرية مع تغطيته
- فحص العينة تحت المجهر الضوئي بقوة تكبير(x400)
- إذا ظهرت نتيجة العينة إيجابية، يتعين الانتقال إلى حساب عدد جراثيم الفطر لتحديد كمية الجراثيم لكل شغالة.

7-2 تحديد الإصابة بمرض النوزيما (الفحص الكمي)

7-2-1 ترشيح خليط بطون شغالات النحل

- ترشيح خليط المعلق(مزيج البطون المسحوقة) في أنبوب الطرد المركزي باستخدام مُرشِّح قماشي مطوي؛

- شطف الهاون والمِدَقّة بمقدار(5 مل) من الماء النقي ثم إضافة ماء الشطف إلى المُرشِّح؛
- الضغط على المُرشِّح بالمِدَقّة المستخدمة في السحق، من أجل استخراج المعلق بالكامل.

2-2-7 عملية الطرد المركزي

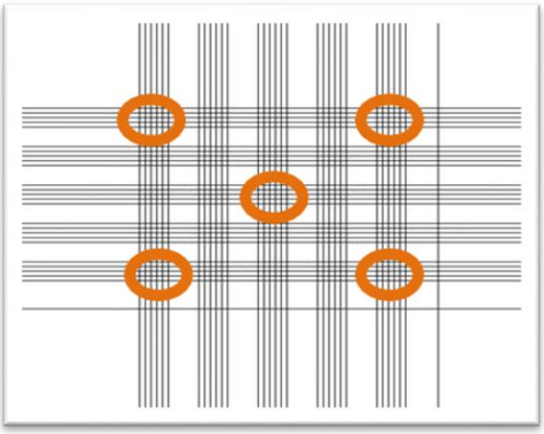
- الجمع بين عمليتي الترشيح والطرد المركزي لمدة 6 دقائق بقوة(800 جم) من نسبة الطرد المركزي.

3-2-8 إعادة تعليق الكُريّات

- بعد الانتهاء من عملية الطرد المركزي، تُزال المادة الطافية عن طريق سكبها؛
- إعادة تعليق الكُريّات(الرواسب) بإضافة مقدار(10) مل من الماء النقي؛
- مُجانسة المعلق باستخدام جهاز رج الانابيب.

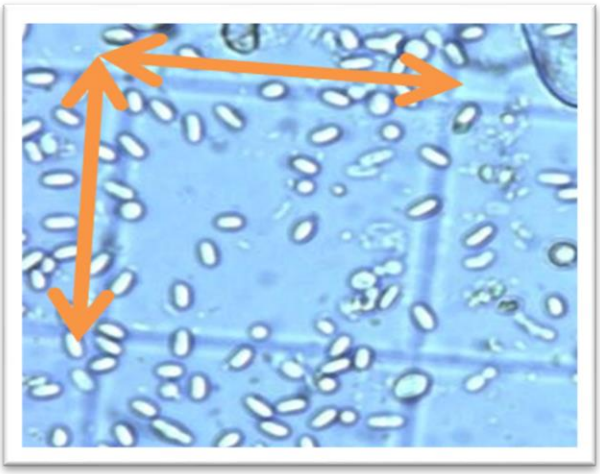
4-2-9 إحصاء جراثيم الفطر باستخدام شريحة العد(Haemocytometer)

- تنظيف شريحة العد بعناية ثم تغطية الزجاج بورق العدسة المغطس في الماء المقطر المعقم لتجنب التلوث أو أخطاء العد؛
- التجفيف باستخدام ورق العدسة؛
- تبليل طرف الإصبع للترطيب الخفيف لحواف الطبقين المحيطين بالمساحة المشّبكة لشريحة العد(Haemocytometer)
- تغطية المساحة المشّبكة لشريحة العد بالساترة بحذر ثم دفعها للأسفل، مع التأكد من استخدام الأغطية الزجاجية المرفقة حيث تتميز بأنها أكثر سُمكًا من الغطاء الزجاجي القياسي حتى لا تتعرض للتشوه بفعل التوتر السطحي؛
- الضغط بقوة حتى يتلامس الغطاء الزجاجي والشريحة بشكل صحيح؛
- تركه ليجف لمدة 30 ثانية؛
- استخدام ماصّة مجهرية أو ماصّة البسترة(القطارة) لجمع ما بين(20-30 ميكرو لتر) من محلول المعلق والسماح بحذر بانتشار المحلول تحت الساترة بفعل الخاصية الشعرية لملء الفراغ بين القناتين، وتجنب أي فائض في القنوات ومن ثم تركه ليستقر لمدة أربعة دقائق؛
- استخدام العداد اليدوي لحساب عدد الفطريات المجهرية في خمس مستطيلات مختلفة(مكونة من 20 مربعًا) كما هو موضح في(الشكل رقم10)؛
- يتم دائمًا اختيار المستطيلات المراد عدها بنفس الطريقة فيما يتعلق بالخطوط الشبكية.



الشكل رقم (10): المساحة المشّبكة لشريحة العد

وفيما يتعلق بأي فطريات مجهرية متداخلة على الخطوط الحدودية للمربعات، يتم حساب تلك الفطريات المتداخلة على الخطوط العلوية واليسرى لكل مربع فقط ويتم تجاهل الفطريات المحصورة يمين وأسفل الخطوط الحدودية كما هو مبين في(الشكل رقم 11) أدناه.



الشكل رقم (11): تظهر الجراثيم المجهرية المتداخلة على الخطوط الحدودية ويتم حساب الأجزاء العلوية واليسرى بينما لا يتم اعتبار الجراثيم المحصورة على الخطوط اليمنى والسفلى.

يتم حساب متوسط الفطريات المجهرية لكل مستطيل عن طريق إضافة عدد جميع الجراثيم التي تم إحصاؤها من خمسة مستطيلات ثم قسمتها على خمسة.

أي، عدد الفطريات المجهرية لكل نحلة هو: $N = [n] \times 10^5$ spores/bee

ملاحظة:

من الممكن إجراء العدّ مرتين بواسطة شريحة العد لمجموعتين من العينات المأخوذة من نفس المعلق. في هذه الحالة، تصبح نتيجة التحليل هي متوسط العددين الناتجين.

وفي حالة اكتشاف الفطريات المجهرية ولكن لا يمكن قياسها كميًا، بمعنى وجود فطريات مجهرية نادرة خارج مناطق العد بالخلية، فإن النتيجة التحليلية التي يجب الإشارة إليها هي: <042 + E من الفطريات لكل نحلة(الناتج لـ042 + E مقابل للكشف عن الجرثومة في منطقة العد).

إعداد تقرير الإصابة:

بعد الانتهاء من كافة الاعمال الميدانية والمختبرية يتوجب اعداد تقرير الإصابة والذي يمكن ان يحتوي على ما يلي: -

- منطقة الإصابة(المنطقة- المحافظة – المركز – القرية)
- جهة الإبلاغ عن الإصابة
- إجراءات وطريقة المسح
- فريق المسح
- مواقع المناحل التي تمت زيارتها
- الكفاءات
- المختبر وعمليات الفحص المخبري التي تمت

- مستوى الإصابة
- نوع المرض
- الخلاصة
- التوصيات

8- المراجع

- Human, H, Brodschneider, R., Dietemann, V., Dively, G., Ellis, J.D., Forsgren, E., Fries. I., Hatjina, F., Hu, F., Jaffé, R., Jensen, A.B., Köhler, A., Magyar, J.P., Özkýrým, A., Pirk, C. W.W., Rose, R., Strauss, U., Tanner, G., Tarpy, D.R., van der Steen, J.J.M., Vaudo, A., Vejsnæs, F., Wilde, J., Williams, J.R. & Zheng, H.,(2013). Miscellaneous standard methods for Apis mellifera research, journal of Apicultural Research 52(4):(DOI 10.3896/IBRA.1.52.4.10
- ANSES(2020) Nosemosis diagnosis: identification and quantification of Nosema spp. by microscopic examination. Analytical method for animal health(2020) REFERENCE: ANSES/SOP/ANA-I1.MOA.0900 - Version 02 May 2020.
- **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.** Published by the World Organisation for Animal Health(OIE, 2021). Chapter 3.2.4. Nosemosis of honey bees. https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/(accessed on 14.03.2022).

برنامج التعاون الفني بين وزارة البيئة والمياه والزراعة ومنظمة الأغذية
والزراعة للأمم المتحدة، الرياض، المملكة العربية السعودية
ص. ب.: 558 الرياض 11421
بريد إلكتروني: FAO-SA@fao.org