

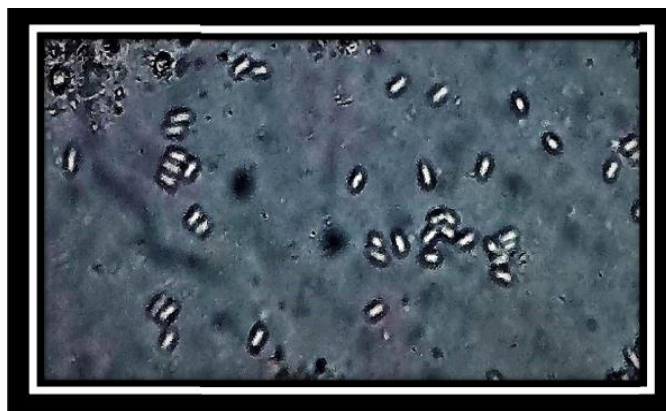


**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΗΡΟΤΡΟΦΙΑΣ & ΜΕΛΙΣΣΟΚΟΜΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ  
ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Αξιολόγηση και ομαδοποίηση των εκτιμήσεων ποσοτικοποίησης του βαθμού προσβολής από Νοσεμίαση (*N. ceranae* και *N. apis*), σε δείγματα μελισσών για την εναρμόνιση των εργαστηριακών ελέγχων



**Κωνσταντίνος Μάριος Α. Αναγνωστέλλης**

Επιβλέπων Καθηγητής:

Γκόρας Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ, 2021**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΗΡΟΤΡΟΦΙΑΣ & ΜΕΛΙΣΣΟΚΟΜΙΑΣ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Αξιολόγηση και ομαδοποίηση των εκτιμήσεων ποσοτικοποίησης του βαθμού προσβολής από Νοσεμίαση (*N. ceranae* και *N. apis*), σε δείγματα μελισσών για την εναρμόνιση των εργαστηριακών ελέγχων

“Evaluation and grouping of quantification estimates of nosemosis infestation degree (*N. ceranae* and *N. apis*) in bee samples to harmonize laboratory tests”

Κωνσταντίνος Μάριος Α. Αναγνωστέλλης

Εξεταστική Επιτροπή:

Γκόρας Γεώργιος, Επίκουρος καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Καβαλλιεράτος Νικόλαος, Αναπληρωτής καθηγητής ΓΠΑ

Παπαδούλης Γεώργιος, Καθηγητής ΓΠΑ

## **Αξιολόγηση και ομαδοποίηση των εκτιμήσεων ποσοτικοποίησης του βαθμού προσβολής από Νοσεμίαση (*N. ceranae* και *N. apis*), σε δείγματα μελισσών για την εναρμόνιση των εργαστηριακών ελέγχων.**

*Π.Μ.Σ. Ολοκληρωμένα Συστήματα Φυτοπροστασίας και Διαχείρισης του Περιβάλλοντος*  
*Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής*  
*Εργαστήριο Σηροτροφίας & Μελισσοκομίας*

### **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Η προσβολή της μέλισσας *Apis mellifera* από το μικροσπορίδιο *Nosema spp.* προκαλεί μια από τις πιο σοβαρές ασθένειες των ενήλικων μελισσών, τη Νοσεμίαση. Παρ' όλα αυτά, ο προσδιορισμός της προσβολής δεν έχει οριστεί σε αντικειμενικά πλαίσια, καθώς δεν υπάρχει κοινή προσέγγιση από την ερευνητική κοινότητα στο επιστημονικό αυτό θέμα. Κύριος σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι η δημιουργία ενός κοινού πρωτοκόλλου, όπου θα είναι εύκολο, άμεσο στη χρήση και αποτελεσματικό με στόχο την εναρμόνιση των εργαστηριακών ελέγχων. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν 102 παρασκευάσματα, λήφθηκαν 536 φωτογραφίες με φορητή συσκευή μέσω οπτικού μικροσκοπίου, στάλθηκαν ερωτηματολόγια σε 12 εξειδικευμένους αξιολογητές στην Ελλάδα και μετρήθηκαν σπόρια *Nosema spp.* από τις φωτογραφίες. Σε ένα σύνολο εικόνων με εύρος σπορίων από 0-4871, μελετήθηκαν δύο περιπτώσεις. Η πρώτη αφορούσε έξι βαθμούς προσβολής με την εξής εν δυνάμει ομαδοποίηση: «Καθόλου»:0-10, «Πολύ μικρή προσβολή»:10-150, «Μικρή προσβολή»:40-350, «Μέτρια Προσβολή»:100-750, «Μεγάλη προσβολή»:200-1700, «Πολύ μεγάλη προσβολή»: >700 σπόρια *Nosema spp.* Η δεύτερη περίπτωση αφορούσε τέσσερις βαθμούς προσβολής με την εξής εν δυνάμει ομαδοποίηση: «Καθόλου»:0-10 σπόρια, «Μικρή προσβολή»:2-353, «Μέτρια Προσβολή»: 120-750, «Μεγάλη προσβολή»: >800 σπόρια *Nosema spp.* Χρειάζεται να σημειωθεί πως δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο διαφορετικών περιπτώσεων. Επιπλέον, εξετάστηκαν και αναλύθηκαν δύο μέθοδοι προσέγγισης των αποτελεσμάτων, η πλειοψηφία των αξιολογήσεων (MR) και ο μέσος όρος των αξιολογήσεων (AR). Αναφορικά με τις δύο μεθόδους χρειάζεται να σημειωθεί πως δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο στην περίπτωση των έξι, όσο και των τεσσάρων βαθμών προσβολής. Τέλος αποδείχθηκε η διακρίβωση της μεθόδου με τη φορητή συσκευή, καθώς δεν υπάρχει διαφορά στον αριθμό σπορίων στο μικροσκόπιο με την μέτρηση του αριθμού σπορίων της φωτογραφίας.

**Επιστημονική περιοχή:** Ποσοτικοποίηση βαθμών προσβολής Νοσεμίασης

**Λέξεις-Κλειδιά:** *Apis mellifera*, *Nosema spp.*, Νοσεμίαση, βαθμοί προσβολής, δημιουργία πρωτοκόλλου, μέτρηση σπορίων

## **Evaluation and grouping of quantification estimates of nosemosis infestation degree (*N. ceranae* and *N. apis*) in bee samples to harmonize laboratory tests.**

MSc Integrated Plant Protection and Environmental Management Systems  
Department of Crop Science  
Laboratory of Sericulture and Apiculture

### **ABSTRACT**

The infestation of the honey bee *Apis mellifera* by the microspore *Nosema spp.* causes Nosemosis, which is one of the most severe diseases of adult bees. However, the definition of infestation has not been defined in an objective context, as there is no standard approach by the research community to this scientific issue. The aim of this study is to create a standard protocol, which will be easy, direct to use, and practical to harmonize laboratory tests. During the study, 102 preparations were created, 536 photographs were taken with a portable device through an optical microscope, questionnaires were sent to 12 specialized evaluators in Greece and *Nosema spp.* spores were counted from the photographs. In a spore range 0-4871, two cases were studied. The first concerning the six degrees of infestation with the following potential grouping: "Not at all":0-10, "Very light infestation":10-150, "Light infestation":40-350, "Medium infestation":100-750, "Heavy infestation":200-1700, "Very heavy infestation": $\geq 700$  spores of *Nosema spp.* The second case consists of four degrees of infestation with the following potential grouping: "Not at all":0-10 spores, "Light infestation":2-353, "Medium infestation":120-750 and "Heavy infestation" : $> 800$  spores *Nosema spp.* It should be noted that there are no statistically significant differences between the two different levels of infection. In addition, two methods of approaching the results were examined and analyzed, the Majority of Ratings (MR) and the Average of Ratings (AR). Regarding the two methods, it should be noted that there are no statistically significant differences in the case of both six and four degrees of infection. Finally, the method was calibrated using the mobile device, as there is no difference in the number of spores counted in the microscope and the number of spores in the photograph.

**Scientific area:** Quantification of infestation degrees of Nosemosis

**Keywords:** *Apis mellifera*, *Nosema spp.*, nosemosis, infestation degrees, standard protocol creation, spore counting

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή του εργαστηρίου Σηροτροφίας & Μελισσοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, κύριο Γκόρα Γεώργιο για την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπό μου και για την πολύτιμη βοήθεια του σε όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής διατριβής. Με περηφάνεια θα ήθελα μετά το τέλος του μεταπτυχιακού μου, να συνεχίσω ως υποψήφιος διδάκτορας στο εργαστήριο Σηροτροφίας & Μελισσοκομίας, διότι έχοντας κατασταλάξει ότι θέλω να ασχοληθώ με τον συγκεκριμένο κλάδο, δεν θα μπορούσα να εμπιστευτώ άλλο εργαστήριο όσον αφορά την πορεία της εξέλιξής μου. Στη συνέχεια, δεν γινόταν να παραλείψω έναν από τους πιο δυναμικούς χαρακτήρες που έχω γνωρίσει, και εξέχον μέλος του εργαστηρίου του Σηροτροφίας & Μελισσοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών ως ΕΔΙΠ, κύριο Δημήτριο Λαζαράκη, για την προθυμία του να βοηθήσει στη διπλωματική μου εργασία. Στο συγκεκριμένο εργαστήριο, η εξαιρετική συνεργασία και το οικείο περιβάλλον που προσφέρει, έκανε πιο εύκολη την εκπλήρωση της μεταπτυχιακής διατριβής, και γι' αυτό τον λόγο ευχαριστώ όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Σηροτροφίας & Μελισσοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής: κ. Καβαλλιεράτο Νικόλαο, Αναπληρωτή Καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και τον κ. Παπαδούλη Γεώργιο, Καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, τους οποίους γνώρισα μέσω των μεταπτυχιακών μαθημάτων του Π.Μ.Σ. «Ολοκληρωμένα Συστήματα Φυτοπροστασίας & Διαχείρισης του Περιβάλλοντος», κατά τη διεξαγωγή των οποίων μου μετέδωσαν τις γνώσεις τους και την αφοσίωση τους στο αντικείμενό τους. Είναι τιμή μου που επέβλεψαν την παρούσα μελέτη.

Επιπλέον, θα ήθελα να απευθύνω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους αξιολογητές του ερωτηματολογίου, διότι είχαν βασικό ρόλο στην διεκπεραίωση της μελέτης. Χάρη στην αντικειμενική αξιολόγηση των βαθμών προσβολής, δώσανε στην διπλωματική εργασία την επιστημονική βάση που χρειαζόταν εξαιτίας της πολύχρονης εμπειρίας τους στην παθολογία της μέλισσας. Συγκεκριμένα, ευχαριστώ τον κ. Χαριζάνη Πασχάλη, Ομότιμο Καθηγητή του εργαστηρίου Σηροτροφίας & Μελισσοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, τον κ. Παπά Ευάγγελο, υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου Σηροτροφίας & Μελισσοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, τον κ. Βλογιαννίτη Σπύρο, υποψήφιο διδάκτορα του Εργαστηρίου Γ. Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, την κα. Σοφία Γούναρη, Ερευνήτρια στο εργαστήριο Μελισσοκομίας του Ινστιτούτου Μεσογειακών και Δασικών Οικοσυστημάτων στην Αθήνα, τον κ. Θρασυβούλου Ανδρέα, Ομότιμο Καθηγητή του εργαστηρίου Μελισσοκομίας & Σηροτροφίας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, την κα Τανανάκη Χρυσούλα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του εργαστηρίου Μελισσοκομίας & Σηροτροφίας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, καθώς επίσης και το υπόλοιπο προσωπικό του εργαστηρίου Μελισσοκομίας & Σηροτροφίας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης: την κα. Ελισάβετ Λαζαρίδου, μελισσοκόμο, την υποψήφια διδάκτορα κα. Ροδοπούλου Μαριάννα, τον διδάκτορα κ. Κανέλλη Δημήτριο και τον διδάκτορα κ. Βασίλη Λιόλιο.

Εν κατακλείδι, τη διπλωματική εργασία την αφιερώνω στους δικούς μου ανθρώπους, στην οικογένεια μου που με στηρίζει όλα αυτά τα χρόνια. Συγκεκριμένα, αφιερώνω την εργασία στη μητέρα μου Βέρθα Ευθυμιάδου και στον πατέρα μου Αλέξη Αναγνωστέλλη, διότι με βοήθησαν να φτάσω μέχρι αυτό το σημείο του μεταπτυχιακού, ακόμη και σε δύσκολες συνθήκες. Οφείλω ένα ιδιαίτερα μεγάλο ευχαριστώ στη μητέρα μου, που με ώθησε να ακολουθήσω τις σπουδές μου από το προπτυχιακό επίπεδο ακόμη, καθώς μόνο περήφανη την κάνω και θέλω να συνεχίσω να την κάνω, συνεχίζοντας τις σπουδές μου και σε διδακτορικό επίπεδο. Ευχαριστώ την αδερφή μου Σόνια Αναγνωστέλλη, διότι, ούσα φιλόλογος, με συμβούλεψε πάνω στη δομή της διπλωματικής εργασίας και μου επεσήμανε ορισμένες τροποποιήσεις, κάτι που με βοήθησε πραγματικά. Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην αναφέρω τη σύντροφο μου και συνάδελφο Μαρίνα Μπροκάκη, καθώς η στήριξη της ήταν η σημαντικότερη και πιστεύω δεν θα μπορούσα να συνεχίσω να προσπαθώ να γίνομαι καλύτερος αν δεν ήταν εκείνη· την ευχαριστώ λοιπόν από τα βάθη της καρδιάς μου.

«Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της»

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>4</b>
<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....</b>	<b>5</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>10</b>
<b>MICROSPORIDIA.....</b>	<b>16</b>
Γενικές πληροφορίες.....	16
Ιστορική αναδρομή στην ταξινόμηση.....	18
Συσχέτιση του Φύλου Microsporidia με μύκητες.....	19
Αλληλεπιδράσεις των ειδών του Φύλου Microsporidia με ξενιστές.....	23
Το Μικροσποριδιακό Σπόριο.....	24
Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	24
Τοίχωμα σπορίου.....	26
Κύκλος ανάπτυξης των Μικροσποριδίων.....	27
Πολλαπλασιαστική φάση (Μερογονία).....	28
Φάση παραγωγής σπορίων (Σπορογονία).....	33
Διαδικασία μόλυνσης.....	35
<b>ΝΟΣΕΜΙΑΣΗ.....</b>	<b>38</b>
<i>Nosema apis</i> .....	39
<i>Nosema ceranae</i> .....	40
Σύγκριση των δύο ειδών μικροσποριδίων.....	41
Βιολογικός κύκλος.....	44
Συμπτώματα.....	46
Συμπτώματα <i>N. apis</i> .....	46
Συμπτώματα <i>N. ceranae</i> .....	48
Παράγοντες εμφάνισης της Νοσεμίας.....	49
Επιπτώσεις από την Νοσεμία.....	51
Αντιμετώπιση.....	52
Παρεμπόδιση μετάδοσης ασθένειας.....	55
Διάγνωση της ασθένειας.....	56
Διάγνωση στο μελισσοκομείο.....	56
Εργαστηριακή διάγνωση.....	58
Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την προσέγγιση του βαθμού προσβολής από <i>Nosema spp.</i> ....	62

Πρωτόκολλο Cantwell με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου.....	62
Ανάγκη δημιουργίας κοινού πρωτόκολλο.....	65
Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας.....	65
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>66</b>
Διεξαγωγή μελέτης.....	66
Υλικά.....	66
Μεθοδολογία.....	66
Δειγματοληψία στα πλαίσια της πειραματικής διαδικασίας.....	66
Προετοιμασία δειγμάτων.....	67
Επιλογή μεθόδου για τη λήψη φωτογραφίας των δειγμάτων.....	69
Εγκυρότητα της μεθόδου.....	72
Διαδικασία δημιουργίας ερωτηματολογίου.....	72
Προφίλ αξιολογητών.....	73
Εγκυρότητα αξιολογήσεων.....	74
Επεξεργασία δεδομένων.....	75
Μέθοδοι προσέγγισης δεδομένων.....	75
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	79
Στατιστική ανάλυση.....	79
Πρωτογενή αποτελέσματα.....	79
Διακρίβωση μεθόδου.....	79
Αποτελέσματα με βάση τις έξι βαθμίδες προσβολής.....	81
Αποτελέσματα με βάση τις τέσσερις βαθμίδες προσβολής.....	85
Δευτερογενή αποτελέσματα.....	89
Περίπτωση ίδιων εικόνων.....	89
Περίπτωση διχογνωμίας.....	90
Περίπτωση πολυγνωμίας.....	93
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ &amp; ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>95</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>103</b>
Ξένη βιβλιογραφία.....	103
Ελληνική Βιβλιογραφία.....	123
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....</b>	<b>126</b>

## Κατάλογος Πινάκων

<b>Πίνακας 1:</b> Σκευάσματα και ουσίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον περιορισμό της Νοσεμίας .....53	53
<b>Πίνακας 2:</b> Βαθμοί προσβολής κατά Cantwell, (1970).....64	64
<b>Πίνακας 3:</b> Παράδειγμα κατανόησης της πλειοψηφίας των αξιολογήσεων (MR).....78	78
<b>Πίνακας 4:</b> Παράδειγμα κατανόησης του μέσου όρου των αξιολογήσεων (AR).....78	78
<b>Πίνακας 5:</b> Διακρίβωση μεθόδου για την υποκειμενικά θεωρούμενη «Μεγάλη προσβολή» .....80	80
<b>Πίνακας 6:</b> Διακρίβωση μεθόδου για την υποκειμενικά θεωρούμενη «Μέτρια προσβολή» .....80	80
<b>Πίνακας 7:</b> Διακρίβωση μεθόδου για την υποκειμενικά θεωρούμενη «Μικρή προσβολή».....81	81
<b>Πίνακας 8:</b> Απεικόνιση και στατιστική ανάλυση των αξιολογήσεων με την πλειοψηφική (MR) και κατά μέσο όρο μέθοδο (AR) με έξι βαθμίδες προσβολής. ....83	83
<b>Πίνακας 9:</b> Οριοθέτηση βαθμών προσβολής με βάση τον αριθμό των σπορίων (έξι βαθμίδες προσβολής) .....84	84
<b>Πίνακας 10:</b> Απεικόνιση και στατιστική ανάλυση των αξιολογήσεων με την πλειοψηφική (MR) και κατά μέσο όρο μέθοδο (AR) με τέσσερις βαθμίδες προσβολής .....85	85
<b>Πίνακας 11:</b> Οριοθέτηση βαθμών προσβολής με βάση τον αριθμό των σπορίων (τέσσερις βαθμίδες προσβολής). 88	88
<b>Πίνακας 12:</b> Ποσοστό αντικειμενικής αξιολόγησης για την ίδια εικόνα. ....89	89
<b>Πίνακας 13:</b> Αριθμός αξιολογητών που διαφοροποίησαν την απάντησή τους στην ίδια εικόνα ανάλογα με τον αριθμό σπορίων που είχε μετρήσει ο συγγραφέας. ....90	90
<b>Πίνακας 14:</b> Παρουσία διχογνωμίας σε ορισμένες εικόνες του ερωτηματολογίου από τους αξιολογητές.....91	91
<b>Πίνακας 15:</b> Παρουσία πολυγνωμίας σε ορισμένες εικόνες του ερωτηματολογίου από τους αξιολογητές.....94	94
<b>Πίνακας 16:</b> Αποτελέσματα αξιολογήσεων ομαδοποιημένα με την πλειοψηφική μέθοδο (MR). ....126	126
<b>Πίνακας 17:</b> Αποτελέσματα αξιολογήσεων ομαδοποιημένα με την κατά μέσο όρο μέθοδο (AR).....131	131

## Κατάλογος Γραφημάτων

<b>Γράφημα 1:</b> Αριθμός μελισσοκόμων στην Ευρωπαϊκή Ένωση. ....10	10
<b>Γράφημα 2:</b> Αριθμός μελισσοκόμων στην Ελλάδα..... 11	11
<b>Γράφημα 3:</b> Αριθμός κυψελών στην Ελλάδα κατά τα έτη 2004-2009.....11	11
<b>Γράφημα 4:</b> Αριθμός κυψελών στην Ελλάδα κατά τα έτη 2010-2018.....12	12
<b>Γράφημα 5:</b> Παραγωγή μελιού στην Ελλάδα κατά τα έτη 2011-2018.....12	12
<b>Γράφημα 6:</b> Κλινική επικράτηση της Νοσεμίας στα μελισσοκομεία που καταγράφηκε κατά τη διάρκεια των τριών επισκέψεων του EPILOBEE 2012 – 2013 .....15	15
<b>Γράφημα 7:</b> Κλινική επικράτηση της Νοσεμίας στα μελισσοκομεία που καταγράφηκε κατά τη διάρκεια των τριών επισκέψεων του EPILOBEE 2013 – 2014 .....16	16
<b>Γράφημα 8:</b> Προσβολή από Νοσεμία σε αποικίες μελισσών.....54	54
<b>Γράφημα 9:</b> Αποτελέσματα αξιολογήσεων που στάλθηκε με ερωτηματολόγιο στους ερευνητές-αξιολογητές, καθώς οι βαθμίδες προσβολής είναι έξι.....82	82
<b>Γράφημα 10:</b> Αποτελέσματα αξιολογήσεων μετά την συγχώνευση «Πολύ μικρής προσβολής» στην «Μικρή προσβολή» και της «Πολύ Μεγάλης προσβολής» στην «Μεγάλη προσβολή». ....85	85

## Κατάλογος Εικόνων

<b>Εικόνα 1:</b> Συνολικά ποσοστά θνησιμότητας μελισσιών στα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης .....13	13
<b>Εικόνα 2:</b> Φυλογενετικό δένδρο των Ευκαρύων .....17	17
<b>Εικόνα 3:</b> Κλαδόγραμμα απεικόνισης των κύριων ευκαρυωτικών κλάδων. ....22	22
<b>Εικόνα 4:</b> Σχηματική αναπαράσταση της υπερδομής ενός μικροσποριδιακού σπορίου. ....25	25
<b>Εικόνα 5:</b> Κύκλος ανάπτυξης των Μικροσποριδίων .....28	28
<b>Εικόνα 6:</b> Ανοσολογικός εντοπισμός ακτίνης σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια του <i>E. cuniculi</i> . ....31	31
<b>Εικόνα 7:</b> Απεικόνιση του σποροπλάσματος, σπορονίου και μερονίου σε ηλεκτρονική μικροσκοπία .....32	32
<b>Εικόνα 8:</b> Μείωση στα Μικροσπορίδια .....34	34



<b>Εικόνα 9:</b> Σπόρια του μικροσποριδίου <i>Nosema apis</i> σε ένα εντερικό επιθηλιακό κύτταρο μέλισσας.....	34
<b>Εικόνα 10:</b> Διαδικασία μόλυνσης.....	37
<b>Εικόνα 11:</b> Τομές σπορίων <i>Nosema ceranae</i> (A) και <i>Nosema apis</i> (B) .....	43
<b>Εικόνα 12:</b> Ο κύκλος ζωής του <i>Nosema apis</i> , που προκαλεί τη δυσεντερία των μελισσών.....	45
<b>Εικόνα 13:</b> Περιττώματα στην είσοδο της κυψέλης.....	47
<b>Εικόνα 14:</b> Κηρήθρα με εμφανή τα περιττώματα των μελισσών .....	48
<b>Εικόνα 15:</b> Εγκατάσταση μελισσιών στα πεύκα για την μελιτοέκκριση του <i>Marchalina hellenica</i> .....	50
<b>Εικόνα 16:</b> Θετική δοκιμή πεδίου.....	57
<b>Εικόνα 17:</b> Αρνητική δοκιμή πεδίου: το έντερο μιας υγιούς μέλισσας έχει κοκκινωπό χρώμα (FAO, 2020). ....	57
<b>Εικόνα 18:</b> Αιμοκυτταρόμετρο .....	60
<b>Εικόνα 19:</b> Μετρητής σπερματοζωαρίων .....	60
<b>Εικόνα 20:</b> Αριθμημένη (χαραγμένη) περιοχή .....	63
<b>Εικόνα 21:</b> Λήψη φωτογραφίας σε ένα τυχαίο σημείο της αριθμημένης περιοχής του αιματοκυτταρόμετρου...64	64
<b>Εικόνα 22:</b> Υπολογισμός A (Cantwell, 1970). .....	64
<b>Εικόνα 23:</b> Υλικά: Α) Γουδί, Β) Υδροβολέας, Γ) Δείγματα μελισσών σε πλαστικό δοχείο, Δ) Λαβίδα. ....	68
<b>Εικόνα 24:</b> Μεθοδολογία.....	68
<b>Εικόνα 25:</b> Οπτικό μικροσκόπιο Olympus CX31.....	69
<b>Εικόνα 26:</b> Σύγκριση λήψης φωτογραφίας από φορητή συσκευή (κινητό) με το λογισμικό πρόγραμμα LUMENERA Infinity 1 .....	70
<b>Εικόνα 27 :</b> Κινητό τηλέφωνο Alcatel Pop 4S (μπροστινή και πίσω όψη) .....	71
<b>Εικόνα 28:</b> Απεικόνιση από την λήψη φωτογραφίας μέσω κινητού τηλεφώνου .....	71
<b>Εικόνα 29:</b> Παράδειγμα ερωτηματολογίου προς αξιολόγηση.....	73
<b>Εικόνα 30:</b> Παράδειγμα εικόνας για την κατανόηση των στατιστικών προσεγγίσεων MR & AR.....	77
<b>Εικόνα 31:</b> Παράδειγμα εικόνας για την κατανόηση των στατιστικών προσεγγίσεων MR & AR.. .....	77
<b>Εικόνα 32:</b> Διχογνωμία αξιολογήσεων της Εικόνας 61.....	92
<b>Εικόνα 33:</b> Διχογνωμία αξιολογήσεων της Εικόνας 145.....	92
<b>Εικόνα 34:</b> Διχογνωμία αξιολογήσεων της Εικόνας 177.....	93
<b>Εικόνα 35:</b> Στη συγκεκριμένη εικόνα (Εικόνα 140 του ερωτηματολογίου) παρουσιάστηκε το φαινόμενο της πολυγνωμίας.....	94

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

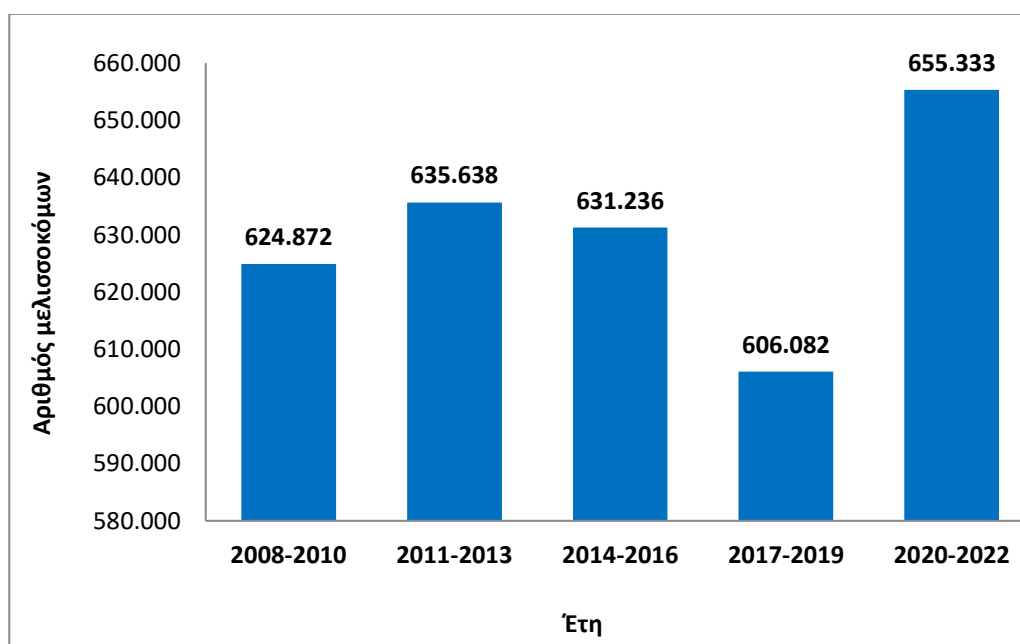
Ο τομέας της μελισσοκομίας διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, καθώς η σημασία αυτού οφείλεται, αφενός, στην παραγωγή προϊόντων μεγάλης θρεπτικής και βιολογικής αξίας (μέλι, γύρη, πρόπολη, βασιλικός πολτός και δηλητήριο μελισσών) και αφετέρου, στις υπηρεσίες επικονίασης διότι περίπου το 80% των καλλιεργειών επικονιάζονται από μέλισσες (Paşca et al., 2019).

Από πρόσφατα στοιχεία της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (Γράφημα 1), παρατηρείται ότι στην ΕΕ υπάρχουν 650.000 μελισσοκόμοι και διαχειρίζονται περίπου 17,5 εκατομμύρια κυψέλες (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2019). Ο αριθμός των μελισσοκόμων είναι αυξημένος συγκριτικά με τα στοιχεία που κοινοποιήθηκαν για τα προγράμματα της περιόδου 2017-19. Στην Ελλάδα, σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (ΥΠΑΑΤ, 2012), κατά τα έτη 1995, 1999, 2004 και 2009 (Γράφημα 2), παρατηρείται μια καθοδική μείωση των μελισσοκόμων, αλλά υπάρχει μια επιφύλαξη καθώς μπορεί σε επόμενη κοινοποίηση στατιστικών στοιχείων να υπάρξει αύξηση του αριθμού των ατόμων που ασχολείται με τον κλάδο της μελισσοκομίας.

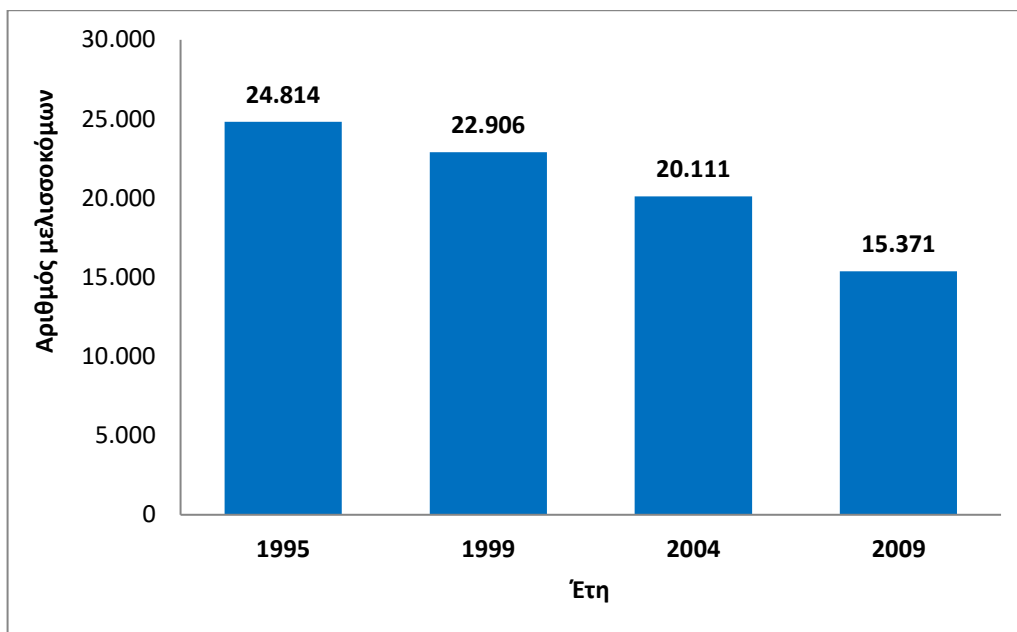
Όσον αφορά τον αριθμό κυψελών που υπάρχουν στην Ελλάδα (Γράφημα 3 & Γράφημα 4), παρατηρείται μια ανοδική πορεία μέχρι το έτος 2008, ύστερα υπάρχει μια απότομη μείωση των κυψελών μέχρι το 2010 και μέχρι το 2018 υπάρχει σταθερή αύξηση των κυψελών.

Αξιοσημείωτο είναι, σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα στοιχεία της ΕΛΣΤΑΤ (ΕΛΣΤΑΤ, 2018), ότι οι μελισσοκόμοι κατά το έτος 2018, διαχειρίζονταν περίπου 1.674.494 κυψέλες, καθώς επίσης καταγράφηκε η ετήσια παραγωγή μελιού εκείνη την περίοδο, όπου έφτασε στους 22.288 τόνους (Γράφημα 5).

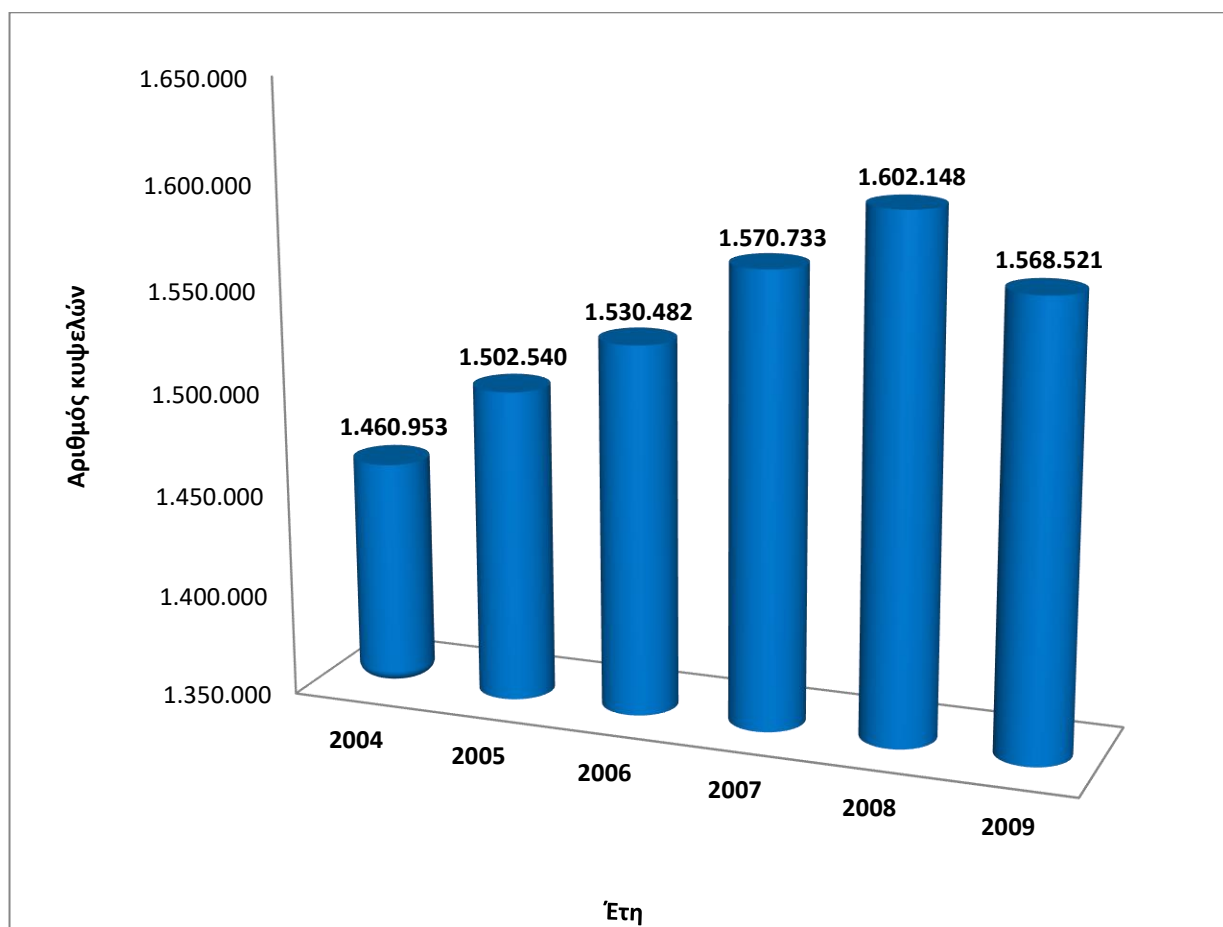
Γράφημα 1: Αριθμός μελισσοκόμων στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2019).



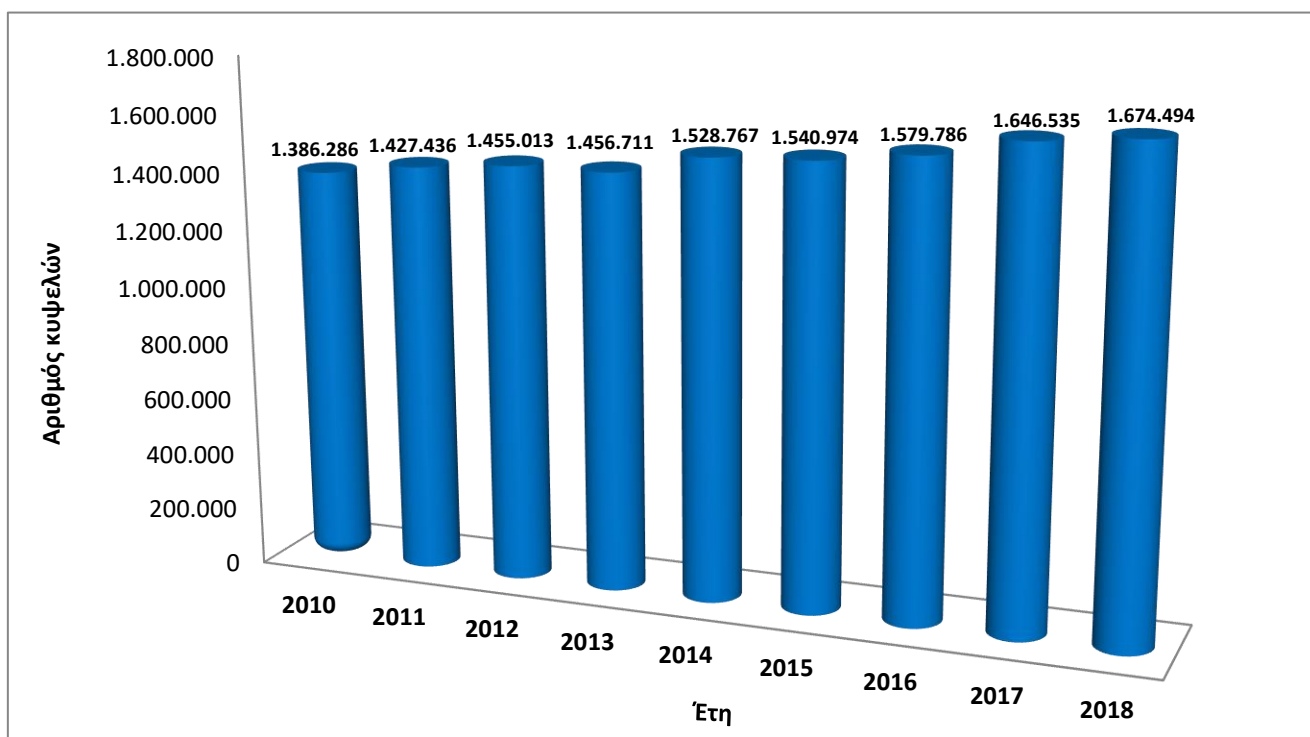
**Γράφημα 2:** Αριθμός μελισσοκόμων στην Ελλάδα (ΥΠΑΑΤ, 2012).



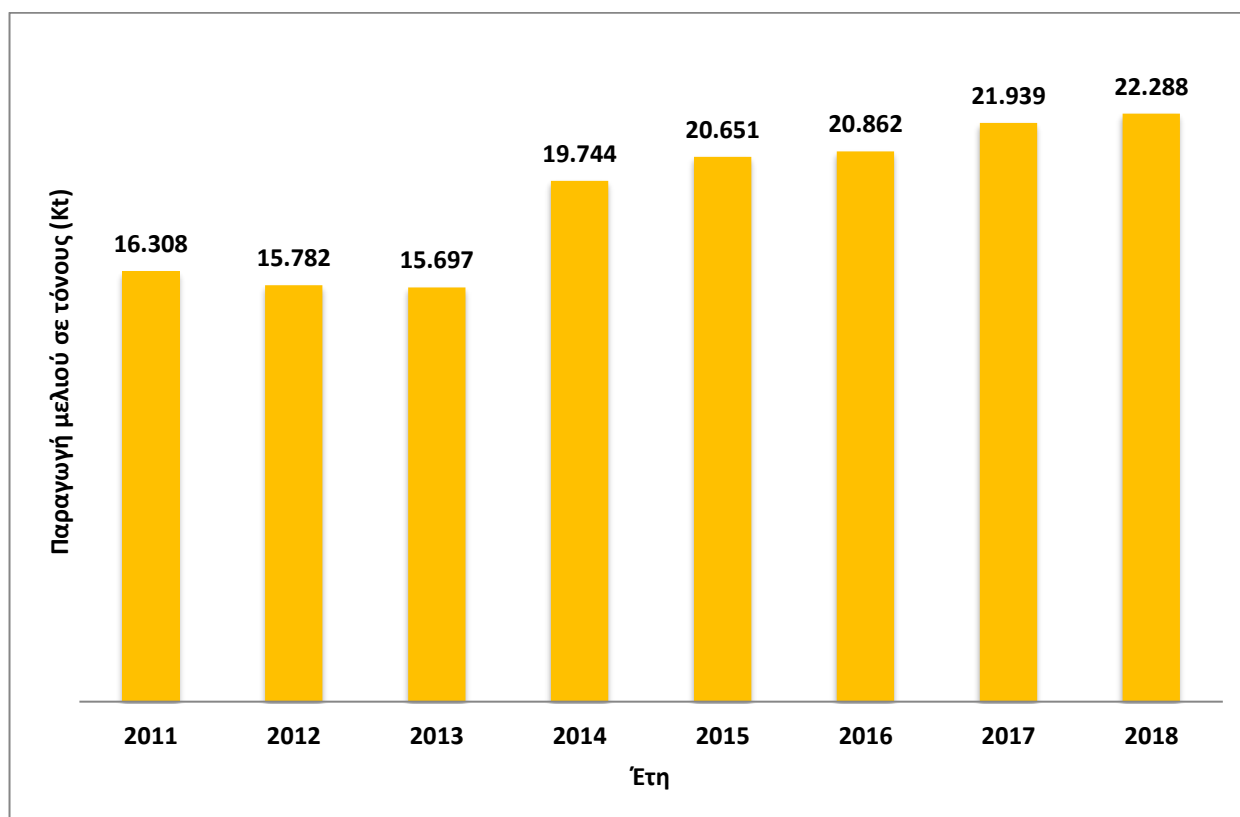
**Γράφημα 3:** Αριθμός κυψελών στην Ελλάδα κατά τα έτη 2004-2009 (ΥΠΑΑΤ, 2012).



**Γράφημα 4:** Αριθμός κυψελών στην Ελλάδα κατά τα έτη 2010-2018  
(ΕΛΣΤΑΤ, 2010; 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018).



**Γράφημα 5:** Παραγωγή μελιού στην Ελλάδα κατά τα έτη 2011-2018  
(ΕΛΣΤΑΤ, 2011; 2012; 2013; 2014; 2015; 2016; 2017; 2018).

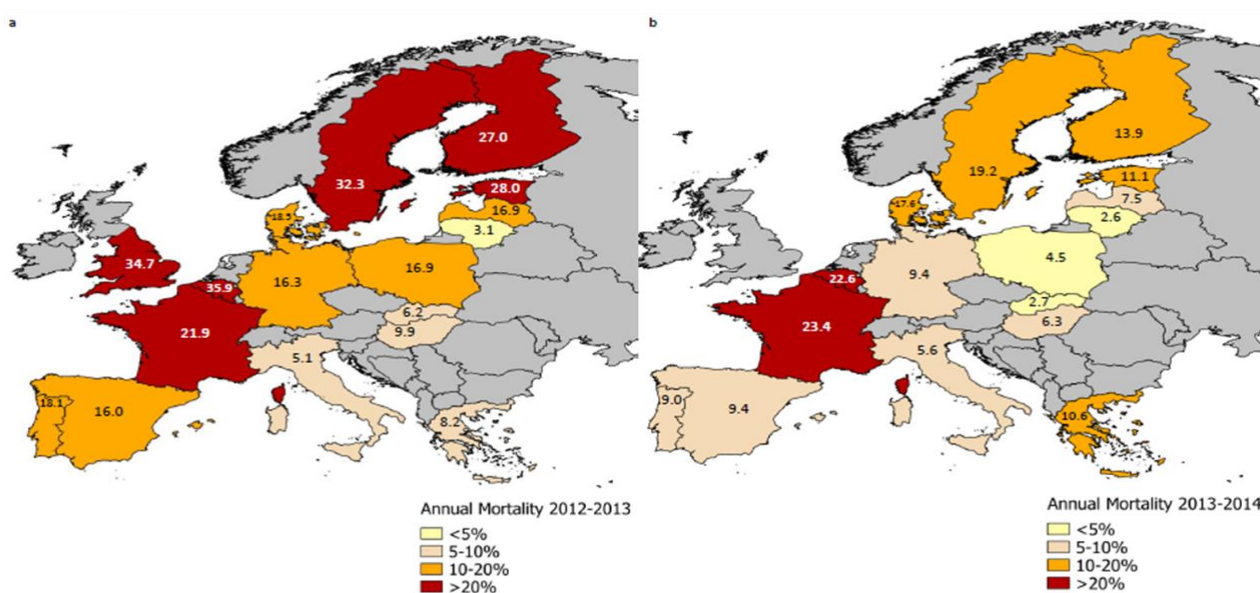


Σύμφωνα με τα παραπάνω, διαφαίνεται η συνεχής αύξηση ενασχόλησης στον τομέα της μελισσοκομίας, καθώς επίσης γίνεται περισσότερο κατανοητή η σημασία του μελισσοκομικού κλάδου και σε επίπεδο επαγγελματικής απασχόλησης. Με λίγα λόγια, η μελισσοκομία, εκτός από την επικονίαση και τα προϊόντα υψηλής θρεπτικής αξίας, προσφέρει και δυνατότητα εργασίας. Γι' αυτόν τον λόγο η υγεία των μελισσιών αποτελεί καθοριστικό παράγοντα.

Χρειάζεται να αναφερθεί πως σύμφωνα με την ευρωπαϊκή επιδημιολογική μελέτη μέσω του προγράμματος «EPILOBEE» κατά τα έτη 2012-2013 και 2013-2014 (Εικόνα 1), παρατηρήθηκε μείωση των μελισσιών σε 17 ευρωπαϊκά κράτη μέλη (EPILOBEE, 2016). Ο υπολογισμός του συνολικού ποσοστού θνησιμότητας μελισσιών κατά το πρώτο και δεύτερο έτος ήταν δυνατός μόνο σε μελισσοκομεία που δέχτηκαν επίσκεψη τρεις φορές κατά τη διάρκεια ενός πλήρους έτους EPILOBEE. Αυτό αντιπροσώπευε το 92,8% και το 93,7% των επιλεγμένων μελισσοκομιών για το EPILOBEE 2012 - 2013 και 2013 - 2014 αντίστοιχα.

Το συνολικό ποσοστό θνησιμότητας των μελισσιών κυμαινόταν από 3,1% έως 35,9% στα 17 κράτη μέλη που συμμετείχαν στην EPILOBEE 2012-2013. Το συνολικό ποσοστό θνησιμότητας των μελισσιών καθ' όλη τη διάρκεια του πρώτου έτους ήταν πάνω από 20% στο ένα τρίτο των 17 κρατών μελών. Το συνολικό ποσοστό θνησιμότητας μελισσιών κυμαινόταν από 2,6% έως 23,4% στα 16 κράτη μέλη που συμμετείχαν στην EPILOBEE 2013-2014. Το ποσοστό ήταν κάτω του 10% σε εννέα κράτη μέλη. Το ποσοστό ήταν πάνω από 20% σε δύο κράτη μέλη (Βέλγιο και Γαλλία).

Επίσης, για την Ελλάδα παρατηρείται, ότι το συνολικό ποσοστό θνησιμότητας μελισσιών για το EPILOBEE 2012-2013 ήταν 8,2% και για το EPILOBEE 2013-2014 ήταν 10,3%, καθώς και στις δύο περιπτώσεις υπήρχε μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας μελισσιών, συγκριτικά με την Ιταλία (5.1% & 5.6%) και στις δύο χρονιές.



**Εικόνα 1:** Συνολικά ποσοστά θνησιμότητας μελισσιών στα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης καταγράφηκαν καθ' όλη την περίοδο EPILOBEE 2012-2013 (a) και EPILOBEE 2013 - 2014 (b) (EPILOBEE, 2016).

Κατά τον [Genersch \(2010\)](#), γενικά τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια σταθερή μείωση των πληθυσμών των μελισσών ή / και καταστροφικές χειμερινές απώλειες σε ορισμένες περιοχές του κόσμου διότι οι μέλισσες είναι ευάλωτες σε διάφορες ασθένειες και περιβαλλοντικές απειλές, όπου ορισμένες έχουν αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία 5 έως 10 χρόνια.

Μία από τις πιο διαδεδομένες και οικονομικά καταστροφικές ασθένειες της δυτικής μέλισσας *Apis mellifera*, είναι η ασθένεια της Νοσεμίας (Paxton, 2010), καθώς μολύνει τις ενήλικες μέλισσες (εργάτρια, βασίλισσα και κηφήνα) (Chen et al., 2009; FAO, 2015; Υφαντίδης, 2018) όχι όμως και τις προνύμφες τους (Hassanein, 1951). Μελέτες έδειξαν ότι η μόλυνση με *Nosema spp.* κυμαίνεται από λιγότερο από 1 έως 100 %. Επιπλέον, μειώνει τη διάρκεια ζωής των εργατριών κατά 22-44% (Yucel and Dogaroglu, 2005), η οποία με τη σειρά της μειώνει την παραγωγή μελιού και προκαλεί περιορισμένη επικονίαση των καλλιεργειών (Paşca et al., 2019).

Επιπροσθέτως, προκαλεί και άλλες σημαντικές αρνητικές επιπτώσεις στις μέλισσες, όπως: δυσεντερία, αντικατάσταση των μολυσμένων βασιλισσών και μείωση του πληθυσμού του μελισσιού (Hassanein, 1951; Rinderer and Sylvester, 1978; Malone et al., 1995). Χρειάζεται να αναφερθεί, ότι η ασθένεια της Νοσεμίας έχει κατηγορηθεί πως ευθύνεται για την κατάρρευση αποικιών των μελισσιών ("Colony Collapse Disorder") (Paxton, 2010), επηρεάζοντας επίσης και την ανάπτυξη πρωτεϊνών του λιπώδους ιστού, καθώς και τα επίπεδα πρωτεϊνών και λιπαρών οξέων στην αιμοδέμφο των μελισσών (Chen et al., 2009). Επομένως, οι επιπτώσεις της ασθένειας προκαλούν σημαντικές οικονομικές απώλειες στους μελισσοκόμους παγκοσμίως (Delbac and Polonais, 2008; Giersch et al., 2009; Paşca et al., 2019).

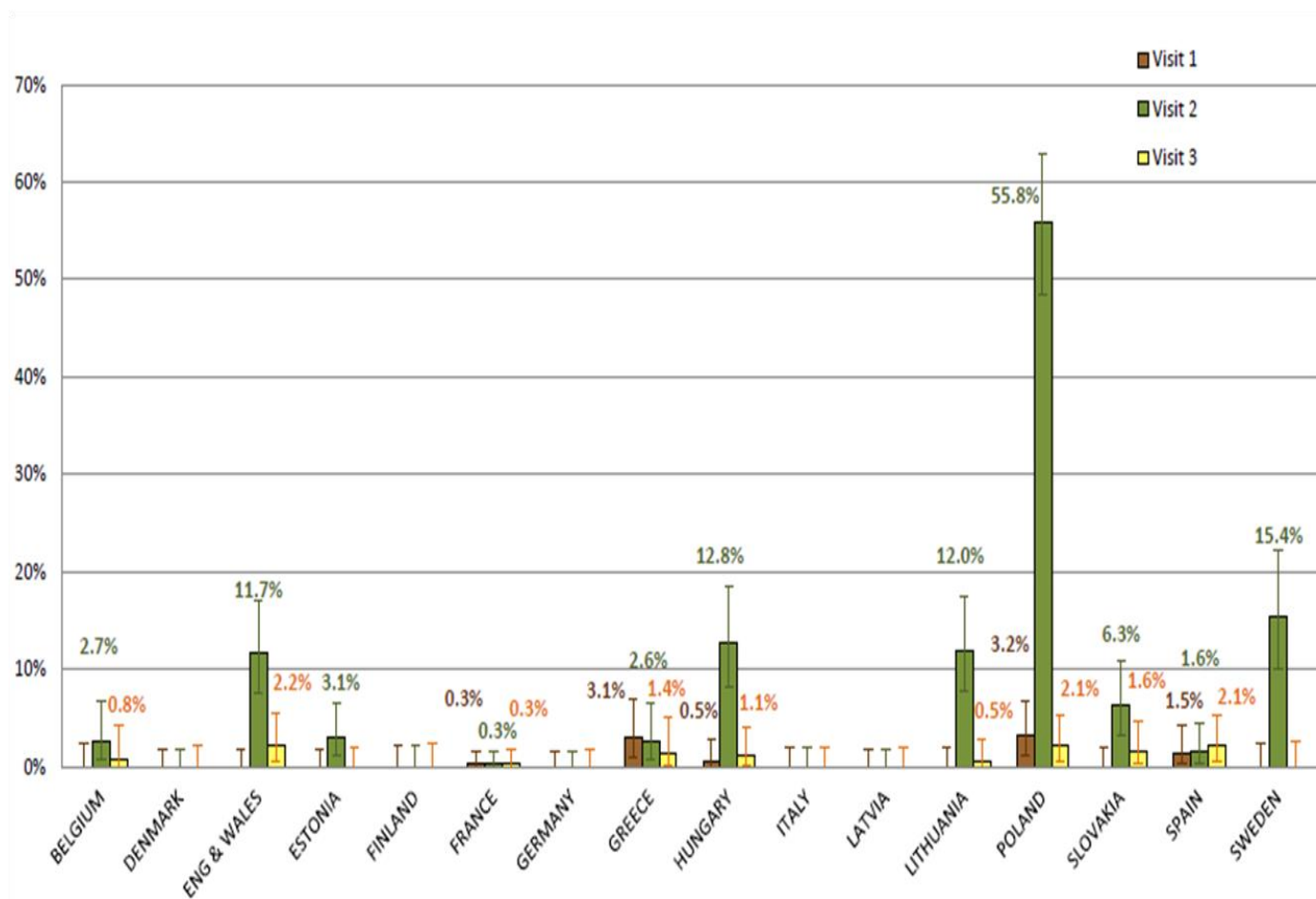
Τα *Nosema ceranae* και *Nosema apis* είναι δύο είδη που είναι γνωστά ως αιτιολογικοί παράγοντες της Νοσεμίας στην ευρωπαϊκή μέλισσα, *Apis mellifera*. Όμως, οι Chemurot et al. (2017) περιγράφουν ένα νέο μικροσπορίδιο, το *Nosema neumanni* n. sp., που εντοπίστηκε σε ορισμένες αποικίες στην Ουγκάντα. Παρ' όλα αυτά, την μεγαλύτερη βαρύτητα έχει το *N. ceranae*, καθώς παρατηρείται να επικρατεί στις περισσότερες μέλισσες παγκοσμίως και σχεδόν έχει αντικαταστήσει το *N. apis* (Chen et al., 2009).

Όσον αφορά γενικότερα την εμφάνιση της ασθένειας, σημαντικά δεδομένα προέκυψαν από σχετική μελέτη στην Ευρώπη, μέσω του προγράμματος EPILOBEE, όπου φαίνεται σε ποσοστά ο βαθμός προσβολής στα επιλεγμένα μελισσοκομεία, καθώς έγιναν έξι επισκέψεις μέσα σε δύο χρόνια για την ανίχνευση της ασθένειας, ειδικότερα πραγματοποιήθηκαν τρεις για το έτος 2012-2013 και άλλες τρεις για τα έτος 2013-2014 (EPILOBEE, 2016).

Για το έτος 2012-2013 (Γράφημα 6) γίνονται οι εξής παρατηρήσεις: στην Δανία, Φιλανδία, Ιταλία, Γερμανία και Λετονία δεν βρέθηκαν μολυσμένες μέλισσες από την ασθένεια της Νοσεμίας στα επιλεγμένα μελισσοκομεία, επίσης η χώρα με το μικρότερο ποσοστό είναι η Γαλλία (0,3% και στις

τρεις επισκέψεις) και το μεγαλύτερο ποσοστό παρατηρήθηκε στην Πολωνία κατά την 2<sup>η</sup> επίσκεψη, όπου έφτασε το 55,8%.

**Γράφημα 6:** Κλινική επικράτηση της Νοσεμίας στα μελισσοκομεία που καταγράφηκε κατά τη διάρκεια των τριών επισκέψεων του EPILOBEE 2012 – 2013 (EPILOBEE, 2016).

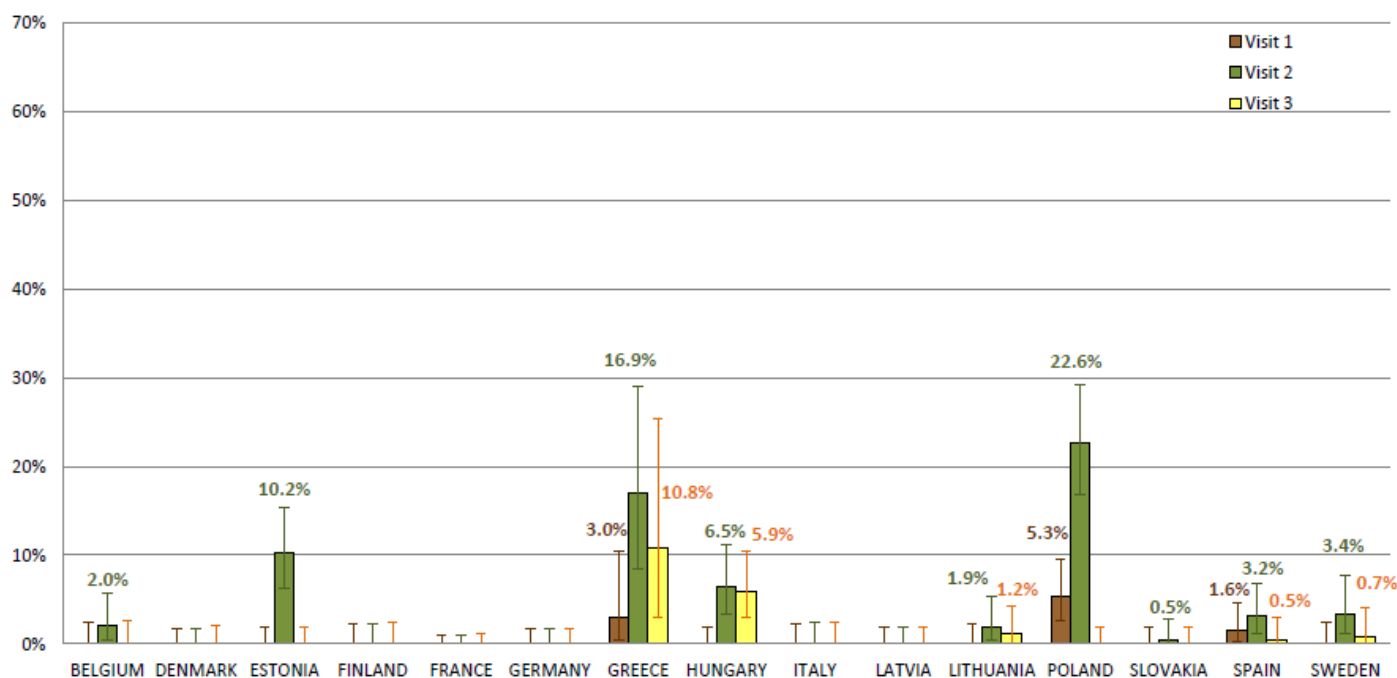


Για το έτος 2013-2014 (**Γράφημα 7**) φαίνεται επίσης ότι στις χώρες Δανία, Φινλανδία, Ιταλία, Γερμανία, Λετονία και Γαλλία δεν παρατηρήθηκε προσβολή στα επιλεγμένα μελισσοκομεία και στις τρεις επισκέψεις. Συγκριτικά με το **Γράφημα 6**, παρατηρείται μια μείωση του ποσοστού στο Βέλγιο, Ουγγαρία, Λιθουανία, Σλοβακία και Σουηδία. Επιπλέον, χρειάζεται να αναφερθεί πως στην Ελλάδα για το έτος 2012-2013, τα ποσοστά βαθμού προσβολής από Νοσεμίαση ήταν 3,1%, 2,6% και 1,4% για κάθε επίσκεψη αντίστοιχα, αλλά το 2013-2014 παρατηρείται μεγάλη αύξηση του ποσοστού, συγκεκριμένα 3%, 16,9% και 10,8% για κάθε επίσκεψη αντίστοιχα.

Συνοπτικά, από δεδομένα της συγκεκριμένης έρευνας: α) το γεγονός ότι δεν βρέθηκαν στα επιλεγμένα μελισσοκομεία προσβολές από Νοσεμίαση, δεν σημαίνει απαραίτητα ότι δεν υπάρχει η ασθένεια, απλά υποδεικνύει στατιστικά ότι για εκείνη την περίοδο, στα περισσότερα μελίσσια δεν παρατηρείται, β) οι διαφορές στο ποσοστό προσβολής σχετίζονται με την εποχή όπου έγινε η κάθε επίσκεψη, τις διαφορετικές κλιματικές συνθήκες από χρονιά σε χρονιά, καθώς και τους διαφορετικούς

μελισσοκομικούς χειρισμούς, γ) στην Ελλάδα, φαίνεται ότι στα επιλεγμένα μελισσοκομεία υπήρχαν από 1,4% έως 16,9% προσβεβλημένες αποικίες από Νοσεμίαση, κάτι που μπορεί να συμβάλει στο ποσοστό θνησιμότητας των μελισσιών.

**Γράφημα 7:** Κλινική επικράτηση της Νοσεμίασης στα μελισσοκομεία που καταγράφηκε κατά τη διάρκεια των τριών επισκέψεων του EPILOBEE 2013 – 2014 (EPILOBEE, 2016).



## MICROSPORIDIA

### Γενικές πληροφορίες

Το Φύλο Microsporidia (παλαιότερα γνωστό ως Microspora και Microsporida) ταξινομείται μεταξύ των Πρωτίστων (Cali et al., 2017) (Εικόνα 2). Συγκεκριμένα, είναι μια μεγάλη ομάδα μονοκύτταρων, υποχρεωτικών, ενδοκυτταρικών και ευκαρυωτικών παρασίτων μόνο των ζωντανών κυττάρων, που είναι γνωστή στην επιστήμη για περίπου 150 χρόνια και έχουν επίσης περιγραφεί σε αυτήν περισσότερα από 1400 είδη και 200 γένη (Solter & Bencel, 2000; Vávra and Lukeš, 2013; Cali et al., 2017; Han et al., 2020), με βάση την κυτταρική τους δομή, τον κύκλο ζωής και την ειδικότητα του ξενιστή (Corradi and Keeling, 2009).

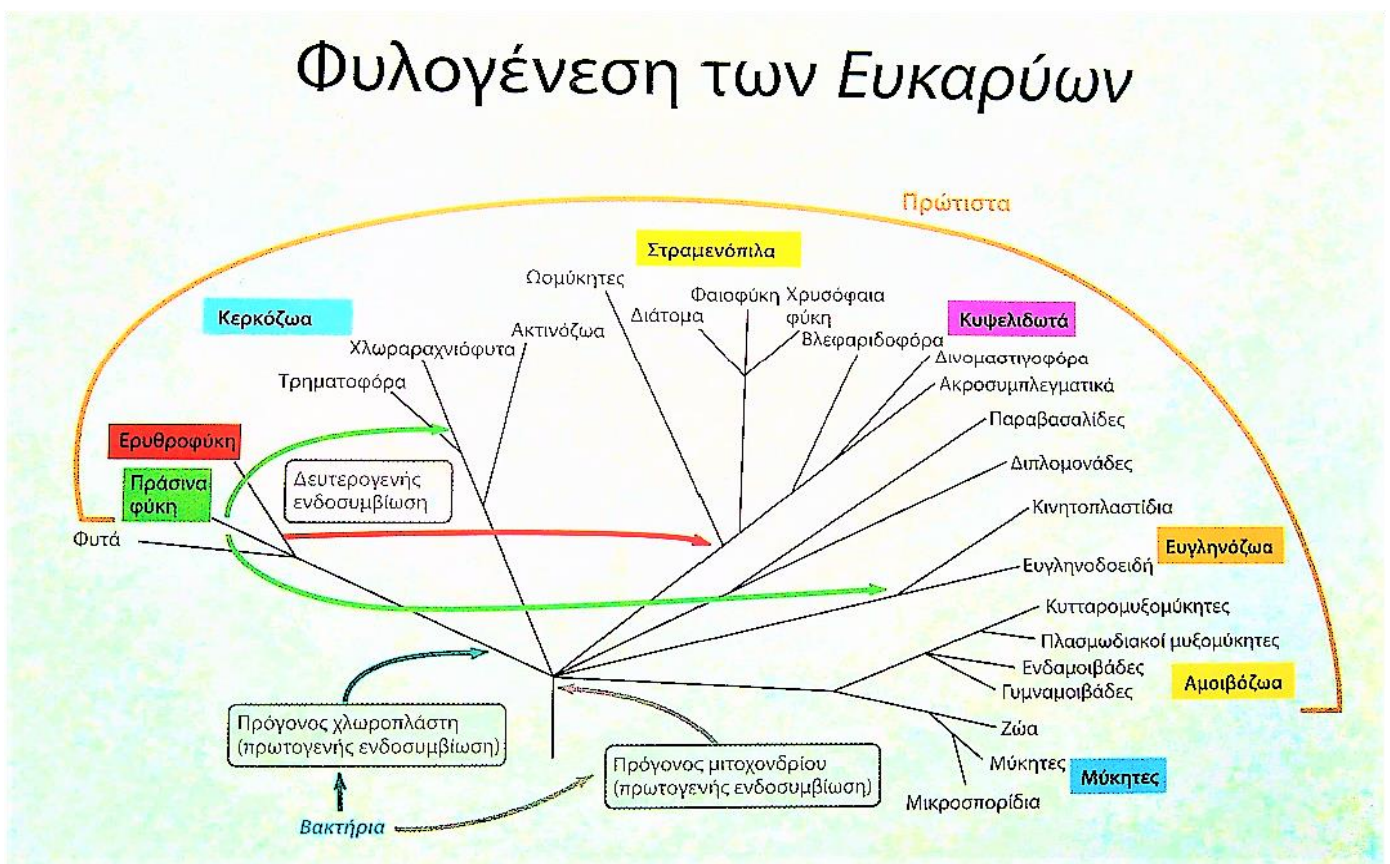
Λόγω του μεγάλου αριθμού γενών και ειδών, το Φύλο χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποικιλία μορφολογίας και στρατηγικής του κύκλου ζωής (Bigliardi and Sacchi, 2001).



Επιπλέον, τα μικροσπορίδια είναι πολύ διαδεδομένα στη φύση και έχει παρατηρηθεί ότι παρασιτούν ένα ευρύ φάσμα ξενιστών, που μολύνουν ζώα σχεδόν όλων των ζωικών φυλών, συμπεριλαμβανομένων και των εντόμων (Higes et al., 2006; 2007; Didier and Weiss, 2008), όπου φαίνεται να είναι και ο πρωτεύων ξενιστής τους (Chen et al., 2009). Χρειάζεται να αναφερθεί, ότι υπάρχουν έξω από το κύτταρο του ξενιστή (Bigliardi and Sacchi, 2001; Corradi and Keeling, 2009; Weiss & Bencel, 2014) ως μεταβολικά ανενεργά σπόρια (Genersch, 2010) και συχνά είναι ανθεκτικά στις ανοσολογικές αντιδράσεις των ξενιστών τους (Higes et al., 2006).

Η συγκεκριμένη ομάδα παρασίτων παρουσιάζει κάποια μοναδικά χαρακτηριστικά όπως: α) είναι παράσιτα χωρίς μιτοχόνδρια και υπεροξυσώματα, χωρίς κινητοσώματα, κεντριόλια ή βλεφαρίδες και χωρίς κεντροσωμική πλάκα (Sina et al., 2005; Corradi and Keeling, 2009; Vávra and Lukeš, 2013), β) διαθέτουν έναν εξωτερικό εξειδικευμένο πολικό σωλήνα για διείσδυση στον ξενιστή (Didier and Weiss, 2008), γ) έχουν ομοιόμορφο βιολογικό κύκλο, καθώς επίσης διακρίνονται σε σεξουαλικά, ασεξουαλικά ή και τα δύο (Vávra and Lukeš, 2013), δ) τα ριβοσώματά τους δεν είναι τυπικά ευκαρυωτικά αλλά μοιάζουν με τα ριβοσώματα των προκαρυωτικών οργανισμών (Bigliardi and Sacchi, 2001) και στ) έχουν σχετικά λίγα γονίδια (γονιδιωματικά στοιχεία μέχρι σήμερα δείχνουν έναν συνολικό αριθμό περίπου 2000), καθώς τα περισσότερα από αυτά αποκλίνουν πολύ στο επίπεδο αλληλουχίας για να είναι χρήσιμα φυλογενετικά (Thomarat et al., 2004).

## Φυλογένεση των Ευκαρύων



Εικόνα 2: Φυλογενετικό δένδρο των Ευκαρύων. (τροποποιημένο από Brock, 2015)

Όπως αναφέρθηκε, τα είδη του Φύλου Microsporidia δεν έχουν μιτοχόνδρια, όμως έχει αποδειχθεί σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία, ότι διαθέτουν ένα «μιτόσωμα» (Williams et al., 2002; Redhead et al., 2009; Han & Weiss, 2017), καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μιτοχονδριακής προέλευσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα μικροσπορίδια κάποτε είχαν μιτοχόνδρια, αλλά τα έχασαν κατά την εξελικτική τους πορεία (Καραουλάνη, 2017).

Τα πιο γνωστά Γένη είναι τα εξής: *Amblyospora*, *Amphiacantha*, *Buxtehudia*, *Caudospora*, *Chytridiopsis*, *Desportesia*, *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Glugea*, *Hessea*, *Metchnikovella*, *Nosema*, *Spraguea*, *Vairimorpha* (Sina et al., 2005).

Από τα παραπάνω μικροσπορίδια, εκείνο με την μεγαλύτερη ποικιλομορφία είναι το Γένος *Nosema* (Καραουλάνη, 2017), καθώς κατά τους Chen et al., (2009), τα περισσότερα είδη του συγκεκριμένου Γένους είναι εντομοπαθογόνα, ειδικότερα των Τάξεων Lepidoptera και Hymenoptera. Επιπλέον, στο συγκεκριμένο Γένος δόθηκε μεγάλη σημασία, γιατί παρασιτεί σε έντομα οικονομικής σημασίας. Συγκεκριμένα, το 1857 το *Nosema bombycis*, ένα παράσιτο του μεταξοσκώληκα (*Bombyx mori*), ήταν ο πρώτος οργανισμός που ταυτοποιήθηκε ως μικροσπορίδιο (Weiss and Keohane, 1999; Bigliardi and Sacchi, 2001) και είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της ασθένειας «πιπερίτιδα» που σχεδόν κατέστρεψε την βιομηχανία του μεταξοσκώληκα τον 19ο αιώνα (Delbac and Polonais, 2008; Corradi and Keeling, 2009). Επίσης, αποτελεί σημαντικό εχθρό και κατά των μελισσών, καθώς ευθύνεται για την ασθένεια της Νοσεμίας, με αιτιολογικό παράγοντα, το *N. apis* και το *N. ceranae*, όπου το δεύτερο είδος ανακαλύφθηκε πρόσφατα.

Εκτός του Γένους *Nosema*, υπάρχουν και άλλα μικροσπορίδια, όπου το 1959 αναγνωρίστηκαν ως ευκαιριακά παράσιτα των ανθρώπων μεγάλου παθολογικού ενδιαφέροντος (π.χ. τα γένη *Encephalitozoon* και *Enterocytozoon*) (Weiss and Keohane, 1999; Bigliardi and Sacchi, 2001), καθώς μέχρι σήμερα είναι γνωστό ότι μερικά από τα είδη αυτών των μικροσποριδίων μπορούν να προκαλέσουν σοβαρά σύνδρομα στον άνθρωπο, κυρίως σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς, καθώς και ευκαιριακές λοιμώξεις σε ασθενείς με σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS) (Desportes et al., 1985; Didier, 2005; Didier and Weiss, 2008; Καραουλάνη, 2017).

## Ιστορική αναδρομή στην ταξινόμηση

Παλαιότερα το Φύλο Microsporidia είχε ταξινομηθεί στην Τάξη με την ονομασία Microspora, καθώς η αλλαγή από Τάξη σε Φύλο έγινε από τον Sprague το 1977 (Han & Weiss, 2017) και μια δεκαετία αργότερα, οι Sprague & Becnel, (1998), πρότειναν ότι αντί για την ονομασία Microspora θα έπρεπε να χρησιμοποιηθεί ο όρος Microsporidia.

Αυτοί οι οργανισμοί, λόγω της φύσης τους ως Πρώτιστα, θεωρήθηκαν για μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή, ως πρωτόζωα, δηλαδή πρωτόγονοι οργανισμοί (Corradi and Keeling, 2009; Vávra and Lukeš, 2013). Ωστόσο, η μοριακή φυλογενετική ανάλυση είχε ως αποτέλεσμα την αντίληψη ότι αυτοί

οι οργανισμοί δεν είναι πρωτόγονοι, αλλά τώρα προκύπτουν στοιχεία για πιο πρόσφατη εξέλιξη. (Vossbrinck et al., 1987; Bigliardi and Sacchi, 2001).

Χρειάζεται να αναφερθεί, ότι η ταξινόμηση των Μικροσποριδίων και των ειδών σε αυτό το Φύλο βασίστηκε ιστορικά κυρίως σε μορφολογία, υπερδομή, βιολογία και χαρακτηριστικά ενδαιτημάτων όπου παρατηρούνται κάτω από το φως και με την μέθοδο της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (Didier and Weiss, 2008), καθώς τα μικροσπορίδια αναγνωρίζονται και διακρίνονται πιο εύκολα από όλες τις άλλες ομάδες μικροσκοπικών ευκαρυωτών (Redhead et al., 2009). Για παράδειγμα, η διαδικασία μόλυνσης των μικροσποριδίων, όπως θα αναλυθεί και στην συνέχεια, ξεκινάει όταν το σπορόπλασμα εισέρχεται μέσω του πολικού σωλήνα στο κύτταρο ξενιστή, καθώς στη συνέχεια διαιρείται κατά τη διάρκεια της πολλαπλασιαστικής φάσης και η μορφολογία αυτής της διαίρεσης χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των Γενών των μικροσποριδίων (Han and Weiss, 2017).

Πιο πρόσφατα, εφαρμόστηκε η μοριακή φυλογενετική για αυτήν την ταξινόμηση (Larsson, 2005), καθώς οι ακολουθίες γονιδίων rRNA χρησιμοποιούνται, μέχρι και σήμερα, ως υποστηρικτικό και μερικές φορές ακόμη και το κύριο εργαλείο για την οριστική ταξινόμηση (Vávra and Lukeš, 2013). Όμως, η δομή και η βιολογία των μικροσποριδίων είναι τόσο μοναδική που η φυλογενετική τους σχέση με άλλους οργανισμούς δεν είναι πάντοτε προφανής και γι' αυτό τον λόγο δεν είναι ξεκάθαρη αυτή η σχέση, ακόμη και μεταξύ των ίδιων ειδών μικροσποριδίων. Για παράδειγμα, το *N. ceranae* φυλογενετικά έχει μεγαλύτερη σχέση με το *Nosema vespula* (παρασιτεί τις ευρωπαϊκές σφήκες), παρά με το *N. apis*, όπου έχουν τον ίδιο ξενιστή, την ευρωπαϊκή μέλισσα *Apis mellifera* (Chen et al., 2009).

Συνοπτικά, με βάση τις μοριακές φυλογένειες, επικρατεί η άποψη ότι τα Μικροσπορίδια σχετίζονται με τους μύκητες (Υπερβασίλειο: Opisthokonta και Βασίλειο: Fungi), είτε ως βασικός κλάδος των μυκήτων ή ως αδελφή ομάδα (Capella-Gutiérrez et al., 2012; Paşca et al., 2019). Μέχρι και σήμερα, η ταξινόμηση του Φύλου Microsporidia γίνεται σύμφωνα με τον Κώδικα Ζωολογικής Ονοματολογίας (ICZN) - παρά το γεγονός ότι στο συγκεκριμένο Φύλο, επικρατεί η άποψη ότι σχετίζεται με μύκητες, η ταξινόμηση των οποίων υπόκειται επίσημα στον Βοτανικό Κώδικα (ICBN) (Redhead et al., 2009).

Στην συνέχεια, θα αναφερθούν και οι λόγοι για τους οποίους το Φύλο Microsporidia έχει ταξινομηθεί στο Υπερβασίλειο Ophisthokonta και στο Βασίλειο Fungi.

## **Συσχέτιση του Φύλου Microsporidia με μύκητες**

Γενικά, η οπτική ταυτοποίηση των ειδών του Φύλου Microsporidia είναι συχνά δύσκολη (Larsson, 1986) και επειδή είναι δομικά τόσο ανόμοια με άλλα Πρώτιστα, οι μοριακές φυλογένειες φάνηκαν να είναι χρήσιμο εργαλείο για την αποκάλυψη των εξελικτικών τους σχέσεων (Paxton, 2007; Redhead et al., 2009), καθώς τα αποτελέσματα μοριακών τεχνικών που εφαρμόζονται στη φυλογενετική ανάλυση

και υποστηρίζονται από μορφολογικά δεδομένα, επιβεβαιώνουν μια στενή σχέση μεταξύ μικροσποριδίων και μυκήτων (Bigliardi and Sacchi, 2001; Vávra and Lukeš, 2013).

Η πρώτη σύγχρονη πρόταση ότι τα Microsporidia ήταν παρόμοια με τους μύκητες προήλθε από μια επανεξέταση της μικροσποριδιακής μείωσης, η οποία υποδηλώνει ότι η διαδικασία μοιράστηκε μια σειρά από ομοιότητες με ορισμένες ομάδες μυκήτων (Flegel and Pasharawipas, 1995). Λίγο μετά τα πρώτα φυλογενετικά στοιχεία, προέκυψαν οι αναλύσεις των άλφα και β-τουμπουλίνων από έναν αριθμό ειδών μικροσποριδίων (Edlind et al., 1996; Keeling and Doolittle, 1996).

Μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα ήρθαν στο φως διάφορες άλλες μυκητιακές συνδέσεις όπως η ταυτοποίηση των μυκητιακών χιτινών (Hinkle et al., 1997), HSP70 (Hirt et al., 1997), ESPs (Bigliardi et al., 1998), φυλογενετική ανάλυση της πρωτεΐνης σύνδεσης TATA-box (Fast et al., 1999), παρουσία της RNA πολυμεράσης II και δημιουργία δένδρων που βασίζονται σε αλληλουχίες αμινοξέων (Hirt et al., 1999). Αξιοσημείωτο, είναι ότι μέχρι το τέλος της δεκαετίας του 1990, η πιθανότητα σύνδεσης μυκήτων-μικροσποριδίων βρήκε τη θέση της στην επιστημονική κοινότητα.

Στην συνέχεια, προέκυψαν και άλλες έρευνες, όπως η δημοσίευση του πρώτου μικροσποριδιακού γονιδιώματος (Katinka et al., 2001) που παρείχε πληθώρα δεδομένων υπέρ μιας μυκητιακής σχέσης, καθώς επίσης και δεδομένα από άλφα και βήτα υπομονάδες της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης E1 (Gill and Fast, 2006).

Άλλοι χαρακτήρες που μοιράζονται τα μικροσπορίδια και οι μύκητες, κατά τους Vávra and Lukeš, (2013), είναι α) ο σχηματισμός σπορίων, β) η παρουσία χιτίνης στα σπόρια, γ) η παρατήρηση της κρυπτομίτωσης, δ) η παρουσία (σε ορισμένα είδη) ενός σχηματισμού δύο γειτονικών πυρήνων που ονομάζονται «δίδυμοι πυρήνες» (διπλοκάρυο), και ε) η παρατήρηση ορισμένων χαρακτηριστικών της μείωσης. Τέλος, η παρουσία τρεχαλόζης (Iturriaga et al., 2009) και η δομή σωμάτων ατράκτου από τα οποία αναδύονται οι μικροσωληνίσκοι της ατράκτου (Vávra and Larsson, 1999), βοήθησαν στο να υποστηριχθεί η άποψη, ότι σχετίζονται οι δύο αυτές ομάδες παρασίτων.

Από τα παραπάνω, εκείνα που είχαν την ισχυρότερη υποστήριξη για τη σχέση μικροσποριδίων και μυκήτων κατά τους Corradi and Keeling, (2009), ήταν τα δένδρα τουμπουλίνης. Όμως, σύμφωνα με τους συγγραφείς, πέραν τα θετικά αποτελέσματα της έρευνας, παρουσιαζόταν το εξής πρόβλημα: τα μικροσπορίδια και οι περισσότεροι μύκητες μοιράζονται σχετικά υψηλά ποσοστά υποκατάστασης στις τουμπουλίνες τους, που από την μια πλευρά, γίνεται πια κατανοητό, ότι τα μικροσπορίδια ανήκουν γενικά στους μύκητες, αλλά από την άλλη, μπορεί να μην γίνεται ξεκάθαρη η ακριβή φυλογενετική σχέση με συγκεκριμένους μύκητες.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι η βαθιά θέση των μικροσποριδίων στα δέντρα που βασίζονται σε αλληλουχίες αμινοξέων, είναι κάτι τεχνητό που αποδείχθηκε για πρώτη φορά από τους Hirt et al., (1999) και χρησιμεύει ως ένα από τα πιο εντυπωσιακά παραδείγματα έλξης μεταξύ μακρινών βραχιόνων (LBA –Long Branch Attraction) σε ευκαρυωτικά δέντρα (Brinkmann et al., 2005).

Σήμερα, γνωρίζουμε ότι τα μικροσπορίδια είναι σχετικά σύγχρονοι οργανισμοί (Keeling, 2009). Οι διακλαδώσεις τους μπορεί να είναι έως και 8-10 φορές περισσότερο μακριά από αυτά των περισσότερων άλλων μυκητιακών οργανισμών (Cavalier-Smith, 2001). Το πρόβλημα που σχετίζεται με την LBA έχει μετριαστεί σε κάποιο βαθμό με τη χρήση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με σχετικά χαμηλούς ρυθμούς εξέλιξης ή από την εφαρμογή υπολογιστικών μεθόδων, οι οποίες περιορίζουν το τεχνητό αντικείμενο LBA.

Οι μέχρι τώρα συσχετίσεις του Φύλου Microsporidia με συγκεκριμένους μύκητες, προκύπτουν από τις φυλογένειες τόσο της άλφα όσο και της β-τουμπουλίνης, καθώς και οι συνενώσεις και των δύο γονιδίων, οι οποίες περιείχαν μια ευρεία αναπαράσταση τόσο της μυκητιακής όσο και της μικροσποριδιακής ποικιλομορφίας και ήταν συνεπείς στην τοποθέτηση των Μικροσποριδίων εντός των μυκήτων, σε αντίθεση με την αδελφή ομάδα όλων των μυκήτων, και γενικά συνεπείς στην υποστήριξη μιας συγκεκριμένης σχέσης με τους ζυγομύκητες, συγκεκριμένα της Τάξης Entomophthorales (Keeling et al., 2000; Keeling, 2003). Επίσης, όσον αφορά την δομή των σωμάτων της ατράκτου, από την οποία αναδύονται οι μικροσωληνίσκοι, έχει παρατηρηθεί ότι μοιάζει με την άτρακτο της ζύμης και των ασκομυκήτων (Vávra and Larsson, 1999; Vávra and Lukeš, 2013).

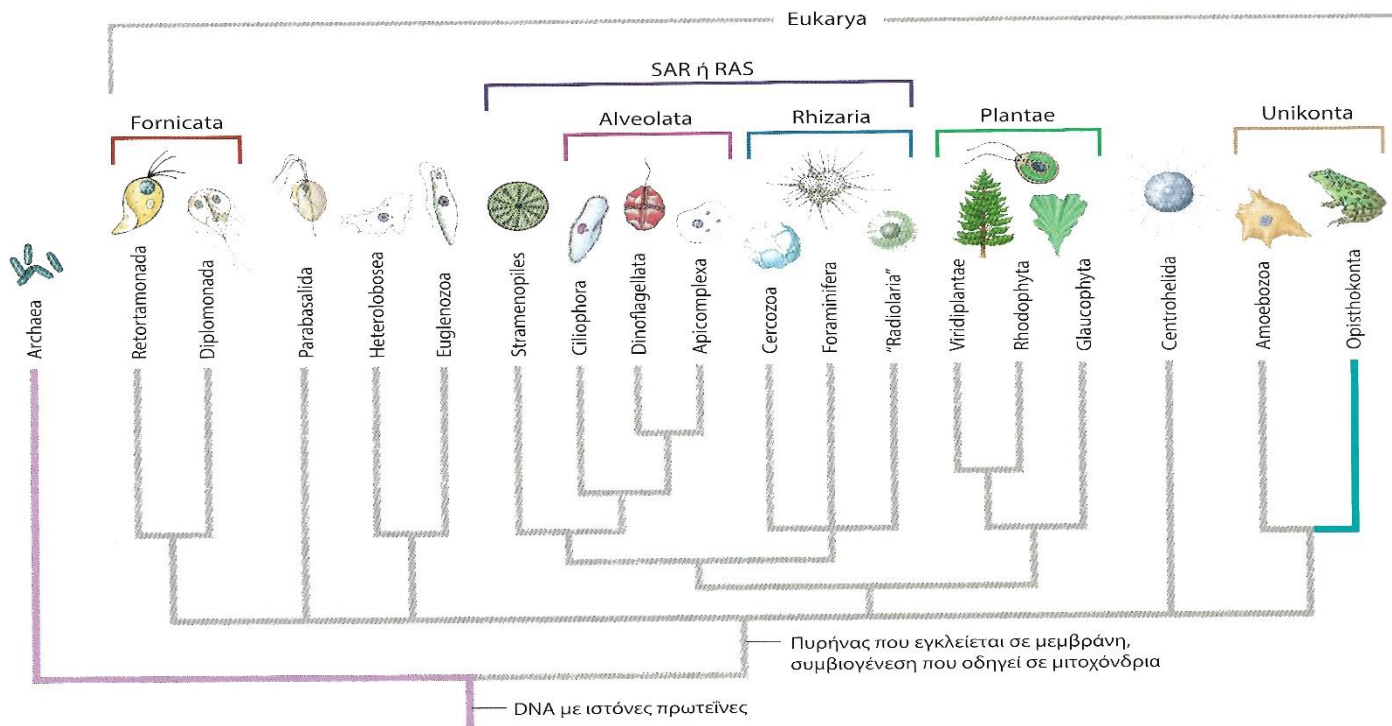
Επιπροσθέτως, δεδομένα που πάρθηκαν από τις άλφα και βήτα υπομονάδες της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης E1, υποστήριξαν επίσης τη διακλάδωση των μικροσποριδίων μέσα στους μύκητες και τις έβαλαν ως αδελφή ομάδα σε ασκομύκητες και βασιδιομύκητες (Gill and Fast, 2006). Τέλος, πρόσφατα έχει επικρατήσει η άποψη, ότι πιθανότατα σχετίζονται με το Φύλο Cryptomycota (Corsaro et al., 2014; Han et al., 2020).

Υπερδομικές μελέτες στο *Enccephalitozoon hellem* αποκάλυψαν ορισμένα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της πυρηνικής διαίρεσης στα μικροσπορίδια, συγκεκριμένα έναν πυρηνικό άξονα και «ηλεκτρονιακά πυκνές πλάκες ατράκτου» (Electron-dense Spindle Plaques-ESPs) που σχετίζονται με τον πυρηνικό φάκελο (Bigliardi et al., 1998), καθώς η μορφολογική και λειτουργική ομοιότητα μεταξύ των ESPs των μικροσποριδίων και των SPBs (Spindle Pole Bodies–Σώματα πολικής ατράκτου) της ζύμης, *Saccharomyces cerevisiae*, υποδηλώνει μια σχέση μεταξύ μικροσποριδίων και μυκήτων (Bigliardi et al., 1998; Bigliardi and Sacchi, 2001).

Όσον αφορά τα Opisthokonta κατά τους Hickman et al., (2015):

- α) Η ονομασία προέρχεται από την Ελληνική γλώσσα «όπισθεν και κοντός»: Οπισθοκόντα.
- β) Αποτελεί κλάδο των Unikonta που με την σειρά τους ανήκουν στην Επικράτεια: Ευκαρυώτες (Εικόνα 3).
- γ) Συμπεριλαμβάνονται σε αυτήν διάφορα Ιχθυοσπορίδια (Ichthyosporia), Μετάζωα (Metazoa), Χοανομαστιγωτά (Choanoflagellata), Αμοιβάδες (Nucleariida) και Μύκητες (Fungi), καθώς στο τελευταίο Βασίλειο, έχουν ταξινομηθεί και τα μικροσπορίδια.

Τα στοιχεία που υποστηρίζουν τη φυλογενετική θέση των μικροσποριδίων στο Υπερβασιλείο Opisthokonta, βασίζονται αποκλειστικά σε χαρακτηριστές μοριακής βιολογίας, καθώς όπως και άλλα είδη του συγκεκριμένου Υπερβασιλείου, τα μικροσπορίδια: 1) έχουν μια μοναδική ένταση 11 αμινοξέων στο γονίδιο EF-1α και 2) τα γονίδια THS και DHFR διαχωρίζονται (Steenkamp et al., 2006; Vávra and Lukeš, 2013).



**Εικόνα 3:** Κλαδόγραμμα απεικόνισης των κύριων ευκαρυωτικών κλάδων (Τροποποιημένο από Hickman et al., 2015).

Σύμφωνα με τις μεμονωμένες μελέτες που αναφέρθηκαν προηγουμένως, καθώς και από την βιβλιογραφική ανασκόπηση, οι περισσότεροι ερευνητές κατατάσσουν τα μικροσπορίδια ως εξαιρετικά εξειδικευμένους μύκητες (Hirt et al., 1999; Paxton et al., 2007; Hickman et al., 2015; Paşca et al., 2019). Ωστόσο, υπάρχει πάντοτε η επιφύλαξη, ότι με καινούργια δεδομένα ερευνών που θα προκύψουν στο μέλλον, να υπάρξουν τροποποιήσεις στην ταξινόμηση, καθώς και στην φυλογενετική σχέση των μικροσποριδίων με άλλους οργανισμούς. Προς το παρόν, τα μικροσπορίδια παραμένουν σταθερά εντός του Υπερβασιλείου Opisthokonta και του Βασιλείου Fungi (Sina et al., 2005; Adl et al., 2012; Vávra and Lukeš, 2013).

Επιπροσθέτως, κατά τους Bigliardi and Sacchi, (2001), ένας τομέας για μελλοντική έρευνα είναι η επιστημονική προσέγγιση στο ερώτημα για το αν τα μικροσπορίδια εξελίχθηκαν από μύκητες ή εάν είναι αδελφές ομάδες τόσο στους μύκητες όσο και στα ζώα, καθώς μια απάντηση στο ερώτημα των σχέσεων μεταξύ ζώων, μυκήτων και μικροσποριδίων μπορεί να είναι τελικά χρήσιμη στην ανάπτυξη θεραπειών για την μικροσποριδίωση.

## Αλληλεπιδράσεις των ειδών του Φύλου *Microsporidia* με ξενιστές

Αναφορικά για τα είδη του Φύλου *Microsporidia*, κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους, κάθε μεμονωμένο μικροσπορίδιο περνάει από μια λιγότερο ακραία μορφή συμβιωτικής σχέσης με τον ξενιστή του και συμπεριφέρεται πρώτα ως φαινομενικά ακίνδυνο (Vávra and Lukeš, 2013). Αυτό κάνει τις σχέσεις ξενιστή-παρασίτου να εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το περιβάλλον και να υπόκεινται σε διαφορές μεταξύ επιβλαβών (συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας του ξενιστή), περισσότερο ή λιγότερο ουδέτερων, ή ακόμη και θετικών σε ορισμένες περιπτώσεις (Ryan και Kohler, 2010).

Η ποικιλία αλληλεπιδράσεων ξενιστή-μικροσποριδίου εξαρτάται κυρίως: 1) από τα αντίστοιχα είδη παρασίτων και ξενιστών, 2) από το βαθμό συν-προσαρμογής τους, 3) τον τροπισμό των ιστών, τον γονότυπο ή το φύλο του ξενιστή, 4) τις περιβαλλοντικές συνθήκες, 5) τα μέσα μετάδοσης κ.ά. (Ryan και Kohler, 2010; Vávra and Lukeš, 2013). Χρειάζεται να αναφερθεί πως η πρώτη έρευνα αναφορικά με την αλληλεπίδραση ξενιστή-μικροσποριδίου, αφορούσε μικροσπορίδια που παρασιτούν κουνούπια (Kellen et al., 1965).

Πολλά μικροσπορίδια που παρασιτούν σε έντομα, αρχικά δεν φαίνεται να τραυματίζουν τον ξενιστή με προφανείς τρόπους, ακόμη και όταν πραγματοποιείται μαζικός πολλαπλασιασμός του παρασίτου στα όργανα του ξενιστή και έτσι οι ήδη μολυσμένοι ξενιστές εξακολουθούν να τρέφονται και να συμπεριφέρονται με λιγότερο ή περισσότερο φυσιολογικό τρόπο (Vávra and Lukeš, 2013). Ωστόσο, συνήθως πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της έκδυσης ή της νύμφωσης, όταν δεν υπάρχουν διαθέσιμα ενεργειακά αποθέματα στους ιστούς του λιπώδους σώματος του ξενιστή για την έκδυση και τη μεταμόρφωση. Επίσης η καθυστέρηση του θανάτου του ξενιστή δίνει τη δυνατότητα στο παράσιτο να μεγιστοποιήσει την παραγωγή των σπορίων έως το τελευταίο στάδιο της έκδυσης ή της νύμφωσης του ξενιστή. (Agnew et al., 2003; Vávra and Lukeš, 2013).

Κατά τους Weiss & Becnel, (2014), το μολυσματικό σπόριο συνήθως εισέρχεται στο νέο ξενιστή μέσω του εντέρου, ακόμη και αν είναι γνωστό ότι υπάρχουν και άλλες πορείες μετάδοσης. Για παράδειγμα, σε ορισμένα είδη Λεπιδόπτερων που παράγουν μετάξι, τα σπόρια μικροσποριδίων μπορεί να μεταδοθούν κατά μήκος του μεταξιού που εκκρίνεται από τις προνύμφες από μολυσμένους αδένες παραγωγής μεταξιού (Jeffords et al., 1987). Αντίθετα, στις μέλισσες γίνεται άμεσα μέσω της κατάποσης των περιττωμάτων, ή έμμεσα, μέσω της κατάποσης μολυσμένου νερού και τροφής (FAO, 2015).

Η μέγιστη παραγωγή σπορίων και η διάδοσή τους στο περιβάλλον είναι επίσης μια στρατηγική που χρησιμοποιείται, όταν το μικροσπορίδιο στοχεύει έναν ιστό που έχει υψηλή αναγεννητική ικανότητα (έντερο ή εκκριτικά επιθήλια), επιτρέποντας έτσι τη συνεχή παραγωγή σπορίων, καθώς σε μια τέτοια περίπτωση, ακόμη και μια μαζική λοίμωξη αφήνει τον ξενιστή προφανώς ανεπηρέαστο, τουλάχιστον προσωρινά (Vávra and Lukeš, 2013).

Από μοριακή προσέγγιση, όπως αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο «Γενικές πληροφορίες», τα μικροσπορίδια δεν διαθέτουν πολλά γονίδια (Thomarat et al., 2004), συγκεκριμένα έχουν έλλειψη γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σε μεταβολικές και ρυθμιστικές οδούς, καθώς διατηρούν μόνο τα γονίδια που σχετίζονται με τη μεταφορά ενεργειακών πηγών και μεταβολιτών, πιθανώς ως συνέπεια της εξάρτησης των κυττάρων-ξενιστών (Didier and Weiss, 2008).

Όσον αφορά, το τοίχωμα του σπορίου, έχει αποδειχθεί ότι περιέχουν πολλές πρωτεΐνες τοιχώματος των σπορίων (Spore Wall Proteins-SWPs) (Vávra, 1976) και σύμφωνα με τους Southern et al., (2007) πιθανώς παίζουν έναν κρίσιμο ρόλο κατά την αλληλεπίδραση μικροσποριδίων και κυττάρων ξενιστή.

Αξίζει να σημειωθεί, πως κατά τους Leonard and Hayman, (2017), αν γίνει επώαση των κυττάρων ξενιστών με συγκεκριμένα πεπτίδια ή πρωτεΐνες (π.χ. RGD πεπτίδια) στο *Encephalitozoon intestinalis*, έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την προσκόλληση του συγκεκριμένου μικροσποριδιακού σπορίου με αποτέλεσμα και τη μόλυνση στα κύτταρα των ξενιστών. Αυτό υποδηλώνει ότι η προσκόλληση των σπορίων είναι σημαντική στη βλάστηση και την επακόλουθη εισβολή των κυττάρων ξενιστών.

Τέλος, οι επιδράσεις στους ξενιστές κυμαίνονται από καλοήγη έως οξεία κακοήθεια, ανάλογα με τα είδη μικροσποριδίων και το είδος ξενιστή (Solter & Bencel, 2000).

## Το Μικροσποριδιακό Σπόριο

### Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Ως μολυσματική πηγή για όλα τα είδη αποτελεί ένα περιβαλλοντικά ανθεκτικό σπόριο (Solter & Bencel, 2000; FAO, 2015). Τα σπόρια των μικροσποριδίων είναι γενικά μικρές, ανθεκτικές δομές σχήματος ωοειδούς τυριφορμίου (Olson et al., 1994; Han et al., 2020).

Επιπλέον, τα κύρια χαρακτηριστικά που διακρίνουν τα ώριμα σπόρια είναι:

- I. Το μέγεθος τους ποικίλει σε μήκος από περίπου 1 έως 12  $\mu\text{m}$  (συνήθως κυμαίνονται σε 2-7  $\mu\text{m}$  x 1,5-5  $\mu\text{m}$ ), καθώς τα μικρότερα σπόρια είναι παρόμοια σε μέγεθος με ένα βακτήριο (1,2 x 0,9  $\mu\text{m}$  στο *Enterocytozoon bieneusi* συγκριτικά με 4 x 2,5  $\mu\text{m}$  σε ένα τυπικό *Nosema*) (Olson et al., 1994; Vávra and Lukeš, 2013; Han et al., 2020).
- II. Διατηρούν ένα παχύ, άκαμπτο τοίχωμα (Bigliardi and Sacchi, 2001).
- III. Χρησιμοποιούν μια σύνθετη συσκευή μόλυνσης που αποτελείται από ένα μακρύ συσπειρωμένο **πολικό νημάτιο** (ή πολικός σωλήνας), ένα **πρόδρομο κενοτόπιο** και ένα σύστημα στοιβαγμένων μεμβρανών που ονομάζεται **πολικός πλάστης** (Solter & Bencel, 2000; Bigliardi and Sacchi, 2001; Corradi and Keeling, 2009; Vávra and Lukeš, 2013).

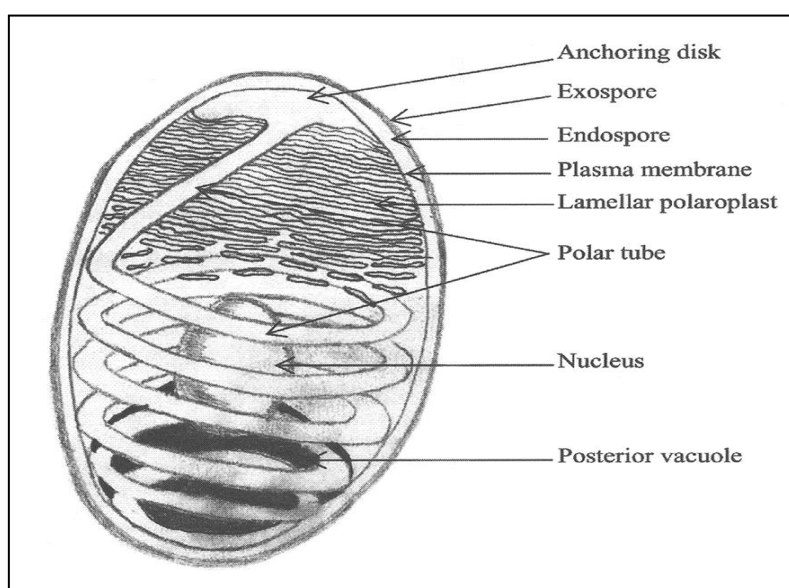


IV. Διαθέτουν **κυτταρόπλασμα**, το οποίο περιλαμβάνει πολλά ριβοσώματα σε κανονική συστοιχία (Bigliardi and Sacchi, 2001; Han et al., 2020).

Όλα συμβάλουν στην δομή του σπορίου. Ειδικότερα όμως, το κυτταρόπλασμα ενός μικροσποριδιακού σπορίου αποτελείται από έναν **πυρήνα** σε διάταξη **μονοκάρυου** (monocaryon) ή **διπλοκάρυου** (diplokaryon), ένα πρόσθιο **δίσκο αγκύρωσης** (anchoring disk), έναν μεμβρανώδη φυλλιδωτό πολικό πλάστη (polaroplast) (**Εικόνα 4**) που φαίνεται να περιέχει μία άτυπη συσκευή Golgi και πολικές κύστες (εκεί παρατηρούνται και τα **μιτοσώματα**) (Vávra and Larsson, 1999). Όσον αφορά, τον πολικό πλάστη, σύμφωνα με τους Sprague and Vernik, (1969), υπάρχει η υποψία ότι το σύμπλεγμα Golgi εμπλέκεται στη σύνθεση του. Άλλοι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι αυτή η δομή μπορεί να προέρχεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) (Bigliardi and Sacchi, 2001).

Χρειάζεται να αναφερθεί, ότι παλαιότερα δεν ήταν γνωστά όλα τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των μικροσποριδίων. Η υποβολή των μικροσποριδίων σε ηλεκτρονική μικροσκοπία όχι μόνο οδήγησε στην ανακάλυψη των πιο θεαματικών χαρακτηριστικών του σπορίου, αλλά επίσης αποκάλυψε την απουσία ενός αριθμού χαρακτηριστικών κοινών σε πιο συμβατικά ευκαρυωτικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των μιτοχονδρίων, της συσκευής Golgi, των υπεροξυσωμάτων ή των μαστιγίων και άλλων δομών όπως των 9 + 2 μικροσωληνίσκων (Corradi and Keeling, 2009).

Όπως διακρίνεται στην **Εικόνα 4**, το τοίχωμα αποτελείται από ένα εσωτερικό ηλεκτρονιακά διαυγές **ενδοσπόριο** (endospore) και ένα εξωτερικό ηλεκτρονιακά πυκνό **εξωσπόριο** (exospore). Το πρόσθιο άκρο του σπορίου, μπροστά από το δίσκο αγκύρωσης, έχει μια περιοχή όπου το ενδοσπόριο είναι λιγότερο παχύ και πιο ηλεκτρονιακά πυκνό (Bigliardi and Sacchi, 2001).



**Εικόνα 4:** Σχηματική αναπαράσταση της υπερδομής ενός μικροσποριδιακού σπορίου. Το τοίχωμα των σπορίων αποτελείται από ένα ηλεκτρονιακά πυκνό στρώμα, το εξωσπόριο και ένα στρώμα ηλεκτρονιακά διαυγές, το ενδοσπόριο. Η

εσωτερική επιφάνεια του ενδοσπορίου καλύπτεται από μια πλασματική μεμβράνη που περιορίζει το σπορόπλασμα (κυτταρόπλασμα και πυρήνας). Το σπορόπλασμα είναι πλούσιο σε ριβοσώματα και ενδοπλασματικό δίκτυο (δεν απεικονίζεται σε αυτό το σχήμα) και περιέχει μια επεμβατική συσκευή που αποτελείται από τον δίσκο αγκύρωσης, το φυλλιδωτό πολικό πλάστη, ένα πρόδρομο κενοτόπιο και τον πολικό σωλήνα (Delbac and Polonais, 2008).

Σε αντίθεση με τα βακτηριακά σπόρια που παράγονται σε απόκριση σε περιβαλλοντικές συνθήκες καταπόνησης, τα μικροσποριδιακά σπόρια αναπτύσσονται ως το ώριμο και μολυσματικό στάδιο του κύκλου ζωής. Ομοίως, με τα βακτηριακά σπόρια, τα μικροσποριδιακά σπόρια είναι ανθεκτικά (Delbac and Polonais, 2008) και επιβιώνουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα στο περιβάλλον για μήνες και σε ορισμένες περιπτώσεις, για χρόνια υπό τις σωστές συνθήκες (Didier and Weiss, 2008; Han et al., 2020). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί, διότι στα στάδια των σποροβλαστών και των σπορίων βρέθηκαν να εκφράζονται πρωτεΐνες που είναι προστατευτικές έναντι της έκθεσης στο περιβάλλον (Brosson et al., 2006).

Όλα τα μέρη της συσκευής έγχυσης και η θήκη των σπορίων είναι εκκριτικά προϊόντα που υποβάλλονται σε επεξεργασία μέσω της κλασικής συνθετικής οδού του ενδοπλασματικού δικτύου και της συσκευής Golgi και σχηματίζονται πλήρως στο ώριμο σπόριο) (Vávra and Lukeš, 2013).

### **Τοίχωμα σπορίου**

Τα σπόρια περιβάλλονται με ένα εσωτερικό στρώμα χιτίνης και ένα εξωτερικό πρωτεϊνούχο στρώμα, που αποτελείται από γλυκοπρωτεΐνη (Vávra et al., 1993; Solter & Bencel, 2000; Sina et al., 2005; Southern et al., 2007; Didier and Weiss, 2008; Vávra and Lukeš, 2013). Συγκεκριμένα, το τοίχωμα του σπορίου περιέχει τρία στρώματα: ένα ηλεκτρονιακά πυκνό πρωτεϊνούχο εξωσπόριο, ένα ηλεκτρονιακά διαυγές ενδοσπόριο και μια υποκείμενη πλασματική μεμβράνη (Vávra, 1976; Han et al., 2020). Αυτό το τοίχωμα διατηρεί τη μορφολογία του σπορίου και προστατεύει τον οργανισμό από τις σκληρές περιβαλλοντικές συνθήκες προτού μολύνει τον ξενιστή (Shadduck and Polley, 1978). Επιπλέον, για την προστασία του σπορίου από εξωτερικές συνθήκες, το τοίχωμα των σπορίων αλληλεπιδρά επίσης με το περιβάλλον και το κύτταρο του ξενιστή και συμμετέχει στη διαδικασία ενεργοποίησης της βλάστησης του πολικού σωλήνα (Polar Tube) (Yang et al., 2018).

Έχει αποδειχθεί, ότι το τοίχωμα των σπορίων περιέχει χιτίνη καθώς και πολλές πρωτεΐνες τοιχώματος των σπορίων (SWPs) (Vávra, 1976). Όσον αφορά τη χιτίνη, χρειάζεται να αναφερθεί πως αποτελεί το κύριο συστατικό τόσο του ενδοσπορίου (Vávra, 1976; Bigliardi and Sacchi, 2001), όσο και των ινιδίων που σχηματίζουν γέφυρες κατά μήκος του ενδοσπορίου και αποτελεί μέρος του ινώδους συστήματος των εξωσπορίων, το οποίο είναι απαραίτητο στη διατήρηση της δομής και της λειτουργίας των κυττάρων των σπορίων (Erickson and Blanquet, 1969; Bigliardi et al., 1996). Επίσης, η παρουσία

χιτίνης στο τοίχωμα των σπορίων είναι χρήσιμη ως στόχος της διάγνωσης, καθώς μπορεί να χρωματιστεί με βαφές φθορισμού, όπως για παράδειγμα το Calcofluor white ή το Uvitex 2B (Han et al., 2020). Αυτά τα ενισχυτικά φθορισμού χρησιμοποιούνται ευρέως για τον εντοπισμό μικροσποριδίων σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα (Ghosh and Weiss, 2009).

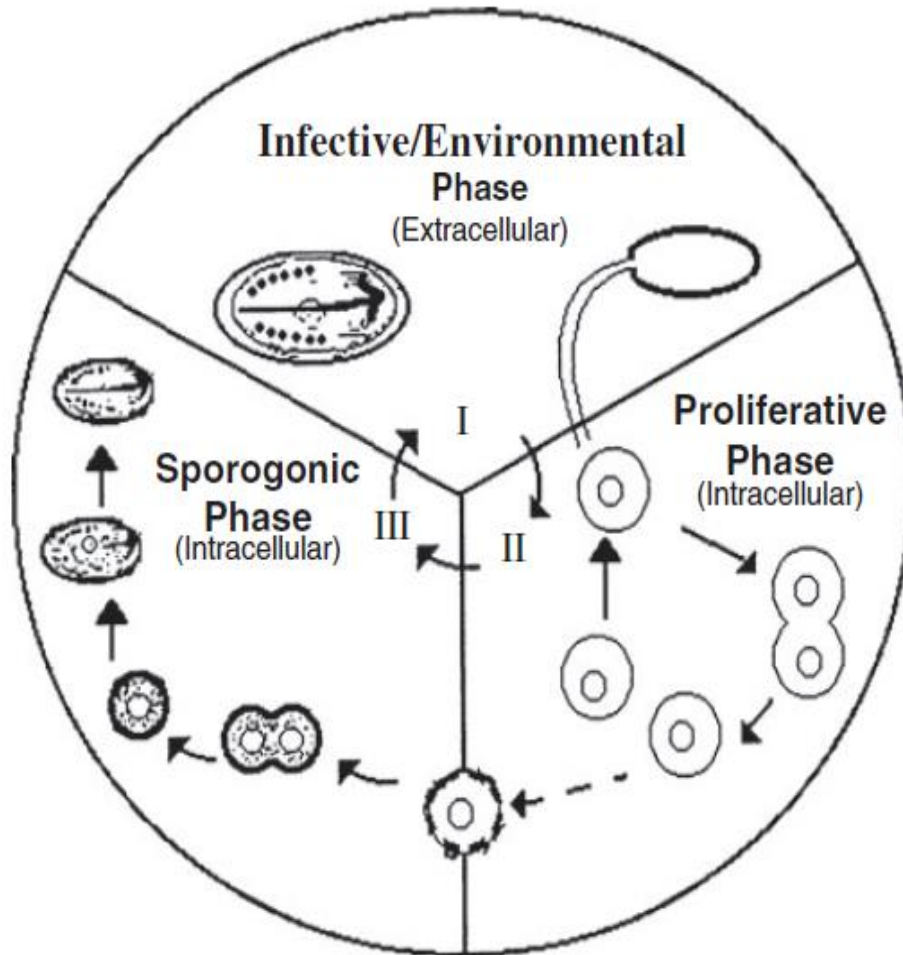
Οι SWPs που εντοπίζονται στο εξωσπόριο εκτίθενται απευθείας στα κύτταρα των ξενιστών και στο περιβάλλον. Αυτές οι SWPs πιθανότατα εμπλέκονται στη διαδικασία δέσμευσης, σηματοδότησης ή ενζυματικών αλληλεπιδράσεων κυττάρων-ξενιστών (Southern et al., 2007). Αντίθετα, SWPs που βρίσκονται στο ενδοσπόριο πιθανότατα εμπλέκονται στις διαδικασίες σχηματισμού του ενδοσπορίου, αλληλεπίδρασης του πολικού σωλήνα (PT) και βλάστησης των σπορίων (Han et al., 2020). Αρκετές πρωτεΐνες έχουν ταυτοποιηθεί στο τοίχωμα των σπορίων και στο ενδοσπόριο συμπεριλαμβανομένων των SWP1, SWP2, SWP3 (EnP2) και EnP1 (Xu et al., 2006; Didier and Weiss, 2008).

## Κύκλος ανάπτυξης των Μικροσποριδίων

Ένας τυπικός κύκλος ανάπτυξης των μικροσποριδίων (Εικόνα 5) μπορεί να χωριστεί σε τρεις φάσεις:

1. **Φάση I:** Η μολυσματική / περιβαλλοντική φάση, είναι το μόνο εξωκυτταρικό μέρος του κύκλου. Αντιπροσωπεύεται από ώριμα σπόρια που εκτίθενται στο περιβάλλον από ξενιστές που είχαν μολυνθεί προηγουμένως. Υπό κατάλληλες συνθήκες, τα σπόρια βλασταίνουν (π.χ. εάν τα σπόρια απορροφηθούν από έναν κατάλληλο ξενιστή, ενεργοποιούνται από το περιβάλλον του πεπτικού σωλήνα), αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εκρηκτική αποβολή του πολικού νήματος (το οποίο συνεχίζει να γίνεται ένας κοίλος σωλήνας). Εάν ο πολικός σωλήνας διαπεράσει ένα κύτταρο ξενιστή, το περιεχόμενο των σπορίων, το σπορόπλασμα, εγγέεται σε αυτό και αρχίζει η Φάση II (Weiss and Becnel, 2014; Cali et al., 2017).
2. **Φάση II:** Είναι η πολλαπλασιαστική φάση, η πρώτη φάση της ενδοκυτταρικής ανάπτυξης. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου του κύκλου ζωής των μικροσποριδίων, οι οργανισμοί βρίσκονται συνήθως σε άμεση επαφή με το κυτταρόπλασμα των κυττάρων-ξενιστών ή σε ένα παρασιτοφόρο κενοτόπιο καθώς αυξάνονται σε αριθμό. Τα κύτταρα μπορούν να επαναλάβουν τους κύκλους διαίρεσής τους μία έως αρκετές φορές στην πολλαπλασιαστική φάση (Cali et al., 2017).
3. Η μετάβαση στη **Φάση III**, την σπορογονική φάση, αντιπροσωπεύει η δέσμευση των οργανισμών προς τον σχηματισμό των σπορίων. Σε πολλούς κύκλους ζωής αυτό υποδηλώνεται μορφολογικά από εκκρίσεις παρασίτων μέσω του πλασμαλήμματος (η μεμβράνη που περιβάλλει το κυτταρόπλασμα), καθώς παράγει μια «παχιά» μεμβράνη (πολλοί σχηματίζουν επίσης ένα περιβάλλον σποροφόρο κυστίδιο, SPOV) (Cali et al., 2017).

## Developmental Cycle of the Microsporidia



Εικόνα 5: Κύκλος ανάπτυξης των Μικροσποριδίων (Τροποποιημένο από Cali et al., 2017)

Συνοπτικά, ο κύκλος ζωής των μικροσποριδίων κατά τους Weiss & Becnel, (2014), ξεκινάει όταν το ανθεκτικό σπόριο που επιβιώνει στο περιβάλλον βλαστήσει υπό τις κατάλληλες συνθήκες, μολύνει με την έγχυση του σποροπλάσματος το νέο ξενιστή, όπου παράλληλα ξεκινά έναν κύκλο αναπαραγωγής (πολλαπλασιαστική φάση) και τελειώνει με την παραγωγή σπορίων (σπορογονία).

Στην συνέχεια, αναλύεται η πολλαπλασιαστική φάση και η φάση παραγωγής σπορίων, καθώς επίσης γίνεται αναφορά στο υποκεφάλαιο «**Διαδικασία Μόλυνσης**» με αναλυτικές πληροφορίες για τη βλάστηση του σπορίου και τον τρόπο μόλυνσης στον ξενιστή από την περιβαλλοντική φάση στην οποία βρίσκεται.

### Πολλαπλασιαστική φάση (Μερογονία)

Η **πολλαπλασιαστική φάση**, ή αλλιώς **μερογονία** (Cali et al., 2017) είναι μια μορφή αγενής (asexual) αναπαραγωγής. Κατά τον Hickman et al., (2015), ως αγενή αναπαραγωγή ορίζεται η δημιουργία νέων ατόμων χωρίς τη συνεισφορά γαμετών. Συνεπώς, οι απόγονοι οι οποίοι προκύπτουν από την αγενή αναπαραγωγή διαθέτουν τον ίδιο γονότυπο με αποτέλεσμα να θεωρούνται «κλώνοι» του προγονικού ατόμου, καθώς έτσι ο κάθε οργανισμός όταν ενηλικιωθεί μπορεί να παράγει γενετικά παρόμοια αντίγραφα του.

Οι βασικές μορφές αγενούς αναπαραγωγής είναι: α) **διαίρεση** (fission), β) η **εκβλάστηση** (budding) και γ) η **κατάτμηση** (gemmulation) (Hickman et al., 2015). Όσον αφορά τα Μικροσπορίδια, υιοθετούν την πρώτη μορφή, δηλαδή τη διαίρεση όπου είναι η διαδικασία πολλαπλασιασμού του κυττάρου κατά την οποία παράγονται περισσότερα άτομα.

Στην διαίρεση υπάγονται οι εξής κατηγορίες:

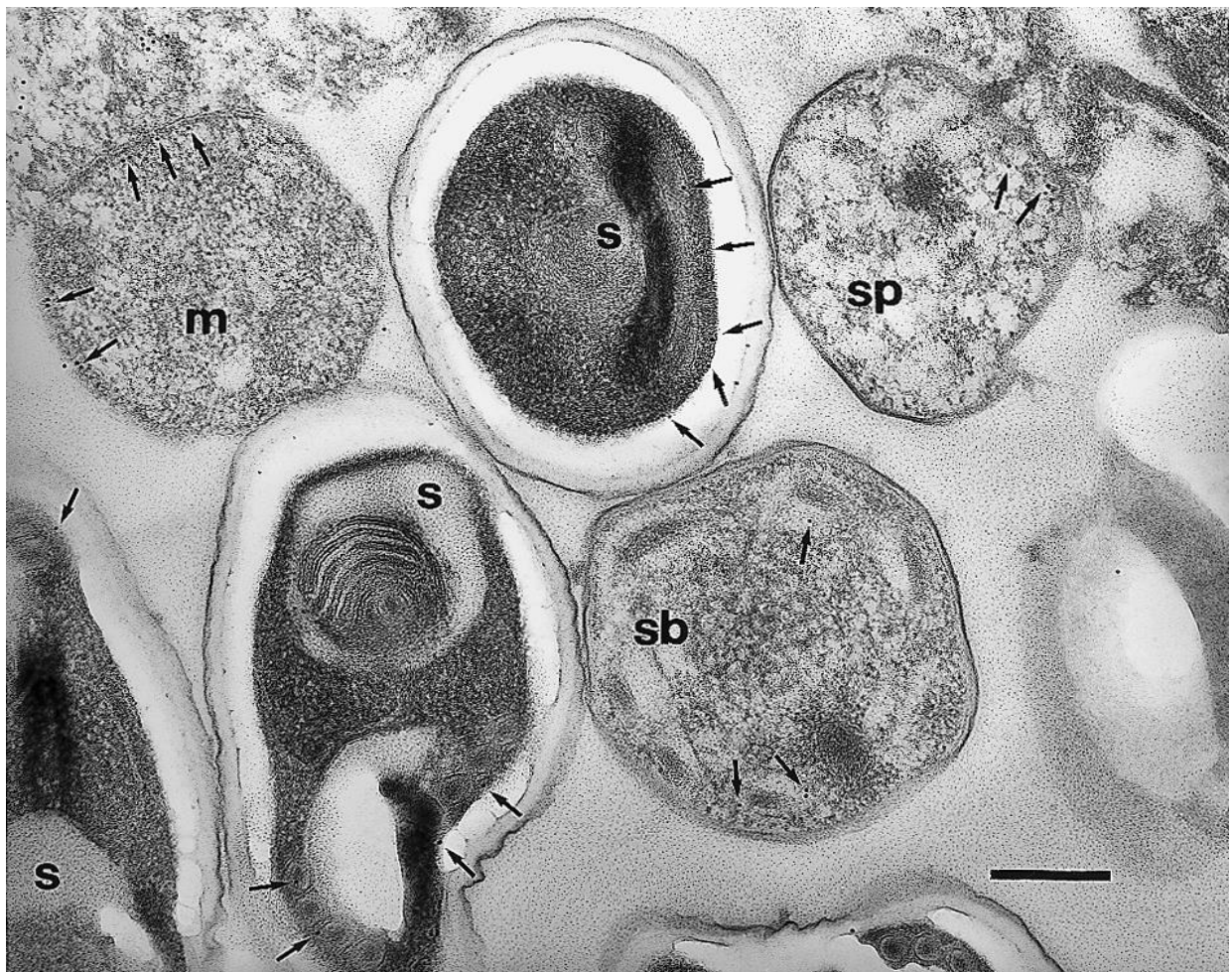
- I. Η **διχοτόμηση** (binary fission), όπου ο μονοκύτταρος οργανισμός διαιρείται με μίτωση σε δύο ίσα περίπου τμήματα, καθένα εκ των οποίων αναπτύσσεται σε ένα νέο άτομο παρόμοιο με το προγονικό. Χρειάζεται να αναφερθεί, ότι η μίτωση, συγκεκριμένα στην περίπτωση της αγενούς αναπαραγωγής, αποτελεί τον μόνο μηχανισμό για την μεταφορά της γενετικής πληροφορίας από τα προγονικά άτομα στους απογόνους (γι' αυτό τον λόγο είναι γενετικά όμοιοι με αυτούς) (Hickman et al., 2015). Με λίγα λόγια, στην αναπαραγωγική διαδικασία της διχοτόμησης, δύο θυγατρικά κύτταρα σχηματίζονται από κάθε μητρικό κύτταρο (Weiss & Becnel, 2014).
- II. Η **πολλαπλή διαίρεση** (multiple fission) ή **σχιζογονία** (schizogony). Σε αυτήν παρατηρούνται πολλαπλές διαιρέσεις του πυρήνα πριν από την διαίρεση του κυτοπλάσματος, δημιουργώντας ταυτόχρονα πολλά θυγατρικά κύτταρα (UofA, 2006; Hickman et al., 2015). Αυτή η διαίρεση συμβαίνει σε ορισμένα είδη *Nosema* (Han and Weiss, 2017). Η **σπορογονία** αποτελεί μια μορφή πολλαπλής διαίρεσης, η οποία είναι συχνή στην αναπαραγωγή των μικροσποριδίων. Ειδικότερα, για τη σχιζογονία σύμφωνα με τους Weiss & Becnel, (2014) χωρίζεται σε τρία στάδια: 1) οι πυρηνίσκοι του πολυπύρηνου πλασμοδίου, μετά την ολοκλήρωση της πυρηνικής σχάσης, συσσωρεύονται στην περιφέρεια. 2) Οι λοβοί (lobes) σχηματίζονται στην περιφέρεια, στον ίδιο αριθμό με τους πυρήνες, και τέλος 3) όλοι οι λοβοί δημιουργούνται ταυτόχρονα και κάθε λοβός αποδίδει ένα θυγατρικό κύτταρο.
- III. **Πλασμοτομία** (plasmotomy), όπου μέσω αυτής σχηματίζονται στρογγυλεμένα πλασμοδιακά πολυπύρηνα κύτταρα που διαιρούνται. Επίσης, αυτή η τρίτη κατηγορία διαίρεσης αφορά συγκεκριμένα είδη (π.χ. είδη *Endoreticulatus*) (Han and Weiss, 2017).

Χρειάζεται να σημειωθεί, πως οι πιο κοινές διαιρέσεις είναι της διχοτόμησης και της πολλαπλής διαίρεσης, καθώς επίσης όσον αφορά την πλασμοτομία και την σχιζογονία, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ξεκινούν με μια σειρά διαίρεσης πυρήνων, δημιουργώντας ένα κύτταρο με πολλούς πυρηνίσκους, το οποίο ονομάζεται **πλασμώδιο** (plasmodium) (Weiss & Becnel, 2014).

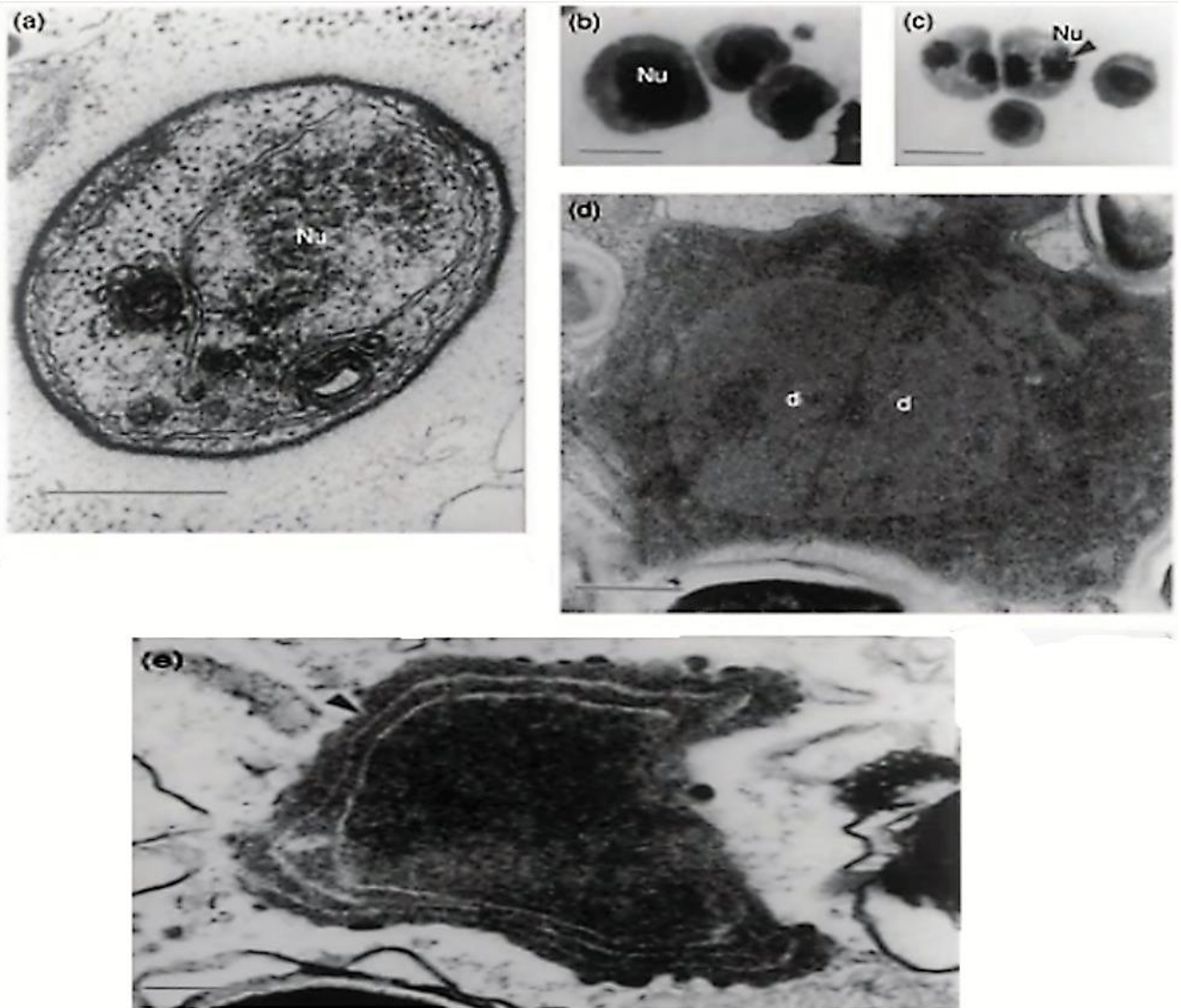
Όσον αφορά την μερογονία η εξέλιξη της φάσης είναι η εξής:

- A. Η πολλαπλασιαστική φάση (μερικές φορές αναφέρεται ως μερογονία) (Cali et al., 2017; Han and Weiss, 2017), περιέχει κύτταρα που έχουν γενικά μια απλή υπερδομική οργάνωση και περιέχουν μια «πυρηνική περιοχή», όπου αυτή περιλαμβάνει ανάλογα με το είδος, από έναν έως αρκετούς μεμονωμένους (**μονοκάρυο**) (π.χ. στα γένη *Encephalitozoon*, *Unikaryon*) ή διπλούς πυρήνες (**διπλοκάρυο**) (π.χ. στα γένη *Nosema*, *Anncaliia*).
- B. Η πολλαπλασιαστική φάση (μερογονία), εμφανίζεται μόλις το σπορόπλασμα εισέλθει σε κατάλληλο κύτταρο ξενιστή (Cali et al., 2017).
- C. Στην συνέχεια, το σπορόπλασμα εξελίσσεται σε πολλαπλασιαστικά κύτταρα, που αναφέρονται ως μερόνια (meronts) ( **Εικόνα 6 & Εικόνα 7d**) (Weiss and Becnel, 2014; Han and Weiss, 2017).
- D. Τα μερόνια είναι στρογγυλά κύτταρα που περικλείονται από μια τυπική μονάδα μεμβράνης. Επίσης, αναπτύσσονται γρήγορα και τελικά πραγματοποιούν ρήξη μέσα στο κύτταρο του ξενιστή, απελευθερώνοντας **μεροζωίτες** (merozoites) (τα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν από την μερογονία) (Weiss and Becnel, 2014).
- E. Τα μερόνια και οι μεροζωίτες είναι μορφολογικά πανομοιότυπα: στρογγυλεμένα ή ελαφρώς ακανόνιστα κύτταρα που καλύπτονται από μια μεμβράνη. Έχουν από ένα έως πολλά πυρηνικά συστατικά τα οποία, ανάλογα με το είδος, εμφανίζονται ως απομονωμένοι πυρήνες ή σε συνδυασμό ως διπλοκάρυα (Weiss and Becnel, 2014).
- F. Στα μερόνια επίσης, κατά τους Bigliardi et al., (1999), έχει ανιχνευθεί η ακτίνη (**Εικόνα 6**) μέσω μικροσκοπίας φθορισμού και μικροσκοπίας ανοσοηλεκτρονίων (TEM), καθώς είναι ιδιαίτερα εμφανές στο φλοιώδες κυτταρόπλασμα, σε ένα στρώμα λεπτών νημάτων που σχετίζονται με τη πλασματική μεμβράνη. Έχει προταθεί ότι η ακτίνη παίζει ρόλο στον έλεγχο της μορφολογίας και της πολικότητας των κυττάρων των μικροσποριδίων.

G. Τέλος, τα πολλαπλασιαστικά κύτταρα (μερόνια), ανάλογα το είδος, αναπτύσσονται είτε: 1) σε άμεση επαφή με το κυτταρόπλασμα των κυττάρων-ξενιστών (*Nosema*, *Enterocytozoon*), 2) σε ένα παρασιτοφόρο κενोटόπιο επενδεδυμένο από μία απλή μεμβράνη που παράγεται από τον ξενιστή (*Enccephalitozoon*), 3) σε μια άμορφη επικάλυψη που εκκρίνεται από το παράσιτο (*Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Thelohania*), 4) σε άλλη άμορφη επικάλυψη, που περιβάλλεται από το ενδοπλασματικό δίκτυο του ξενιστή (*Endoreticulatus*, *Vittaforma*) (Sprague et al., 1992; Frixione et al., 1997; Bigliardi and Sacchi, 2001). Τα ενδοκυτταρικά στάδια αυτής της φάσης είναι συνήθως σε άμεση επαφή με το κυτταρόπλασμα των κυττάρων-ξενιστών, ή στενά συνδεδεμένα με το ενδοπλασματικό δίκτυο του ξενιστή.



**Εικόνα 6:** Ανοσολογικός εντοπισμός ακτίνης σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια του *E. cuniculi*. Σωματίδια χρυσού εντοπίζονται στην περιφέρεια των μερονίων (m), σπορονίων (sp) και πολικού σωλήνα και των δύο σποροβλαστών (sb) και των σποριών (s). Τα βέλη δείχνουν χρυσά σωματίδια. Bar = 0,3  $\mu$ m (Bigliardi and Sacchi, 2001).



**Εικόνα 7:** Απεικόνιση του σποροπλάσματος, σπορονίου και μερονίου σε ηλεκτρονική μικροσκοπία: α) Σπορόπλασμα (*Ameson michaelis*), β & γ) μερόνια και σπορόνια (*Berwaldia schaefernai*), δ) διπλοκαρυωτικό μερόνιο (*Helmichia aggregata*), ε) σπορόνιο με ηλεκτρονικά πυκνό υλικό (δείτε τα βέλη) που συσσωρεύεται επιτόπου (το βέλος δείχνει ομόκεντρο στρώμα ενδοπλασματικού δικτύου) (*B. schaefernai*), (Τροποποιημένο από Weiss and Becnel, 2014).

Κατά τους Weiss & Becnel, (2014) στα περισσότερα μικροσπορίδια, υπάρχουν δύο ακολουθίες αναπαραγωγής που ακολουθούν η μια την άλλη: α) μια αρχική βλαστική αναπαραγωγή (μερογονία) που παράγει θυγατρικά κύτταρα (μεροζωίτες) με δυνατότητα, είτε να επαναληφθεί η μερογονία, είτε να εισέλθει στη δεύτερη αναπαραγωγική φάση, την παραγωγή σπορίων (σπορογονία). β) Τόσο κατά τη διάρκεια της μερογονίας, όσο και της σπορογονίας, τα μικροσπορίδια θα ασκήσουν το φαινόμενο της διαίρεσης είτε με διχοτόμηση, είτε με σχιζογονία, είτε με πλασμοτομία ανάλογα με το είδος, καθώς όλα τα προϊόντα της διαίρεσης «κολλάνε» μεταξύ τους, σχηματίζοντας αλυσίδες κυττάρων.

Στην συνέχεια, θα γίνει αναφορά στην φάση παραγωγής σπορίων, την σπορογονία.



## Φάση παραγωγής σπορίων (Σπορογονία)

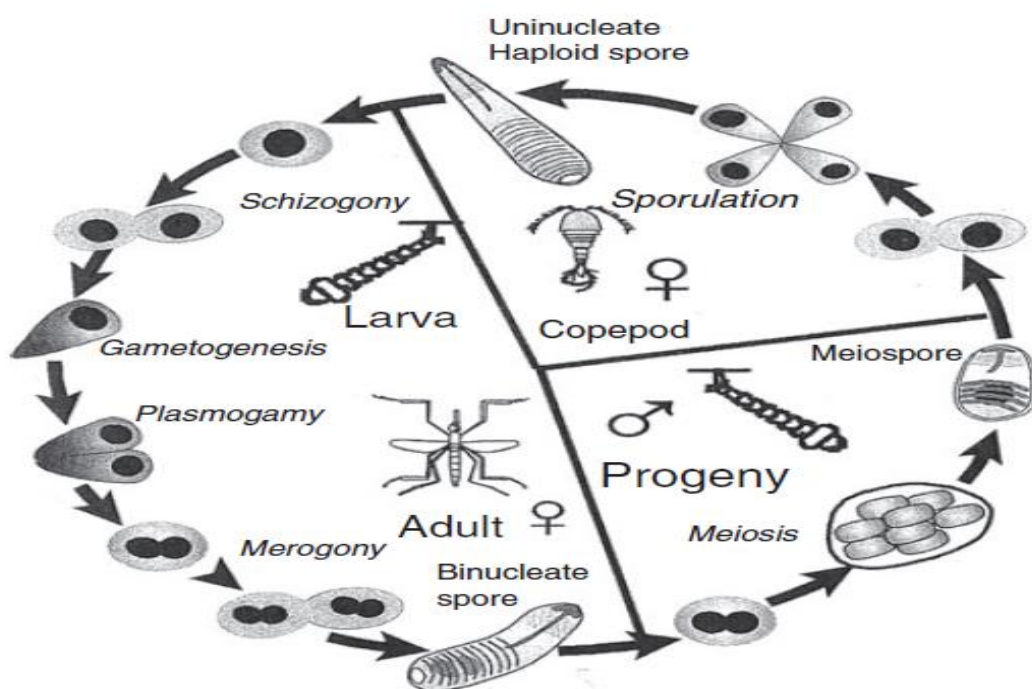
Η φάση παραγωγής σπορίων αποτελείται από μια αλληλουχία διαίρεσης που ονομάζεται σπορογονία, καθώς γίνεται αντιληπτό πως όταν ένα μικροσποριδιακό κύτταρο εισέλθει στη φάση αυτή, δεν μπορεί να επανέλθει στη μερογονία. Οι μεμβράνες των κυττάρων του μερονίου πυκνώνουν σχηματίζοντας **σπορόνια**, όπου είναι το αρχικό στάδιο της σπορογονίας. Τα πολλαπλασιαστικά στάδια (μερόνια) μπορεί να μην διακρίνονται μορφολογικά από τα σπορόνια (Cali et al., 2017). Όμως η μετάβαση από μερόνια σε σπορόνια παρατηρείται όταν τα κύτταρα καλύπτονται από ηλεκτρονικά πυκνό υλικό που εναποτίθεται στην εξωτερική επιφάνεια του πλασμαλήμματος και συχνά παράγει μια οδοντωτή εμφάνιση (**Εικόνα 7e**) (Bigliardi and Sacchi, 2001; Cali et al., 2017). Τότε και μόνο ταξινομούνται ως σπορόνια (Weiss and Becnel, 2014).

Έχει παρατηρηθεί ότι σε αυτή την φάση, υπάρχει προοδευτική αύξηση της κυτταροπλασματικής πυκνότητας με σχηματισμό περισσότερων ριβοσωμάτων και ενδοπλασματικού δικτύου καθώς και μεγαλύτερων συσκευών Golgi (Bigliardi and Sacchi, 2001). Η μείωση (**Εικόνα 8**), όταν συμβαίνει, ξεκινά σε κύτταρα σπορονίων, πριν από το σχηματισμό σπορίου. (Cali et al., 2017). Μόλις ολοκληρωθεί η δημιουργία των σπορονίων, αυτά σταδιακά θα διαιρεθούν (Weiss and Becnel, 2014). Ανάλογα με τα είδη μικροσποριδίων, ο αριθμός των διαιρέσεων των σπορονίων ποικίλλει από μια **δίσπορη σπορογονία**, στο οποίο σχηματίζονται δύο σποροβλάστες, σε **πολύσπορη σπορογονία**. Σε ορισμένα είδη, η σπορογονία αποδίδει έναν κανονικό αριθμό σπορίων, συχνά 4, 8 ή 16, με οκτώ σπόρια να είναι ο πιο συχνός αριθμός (οκτάσπορη σπορογονία). Η δίσπορη σπορογονία εξελίσσεται μέσω διχοτόμησης, και η πολύσπορη μπορεί να προχωρήσει με διαφορετικούς τρόπους (π.χ. πλασμοτομία, σχιζογονία) (Weiss and Becnel, 2014).

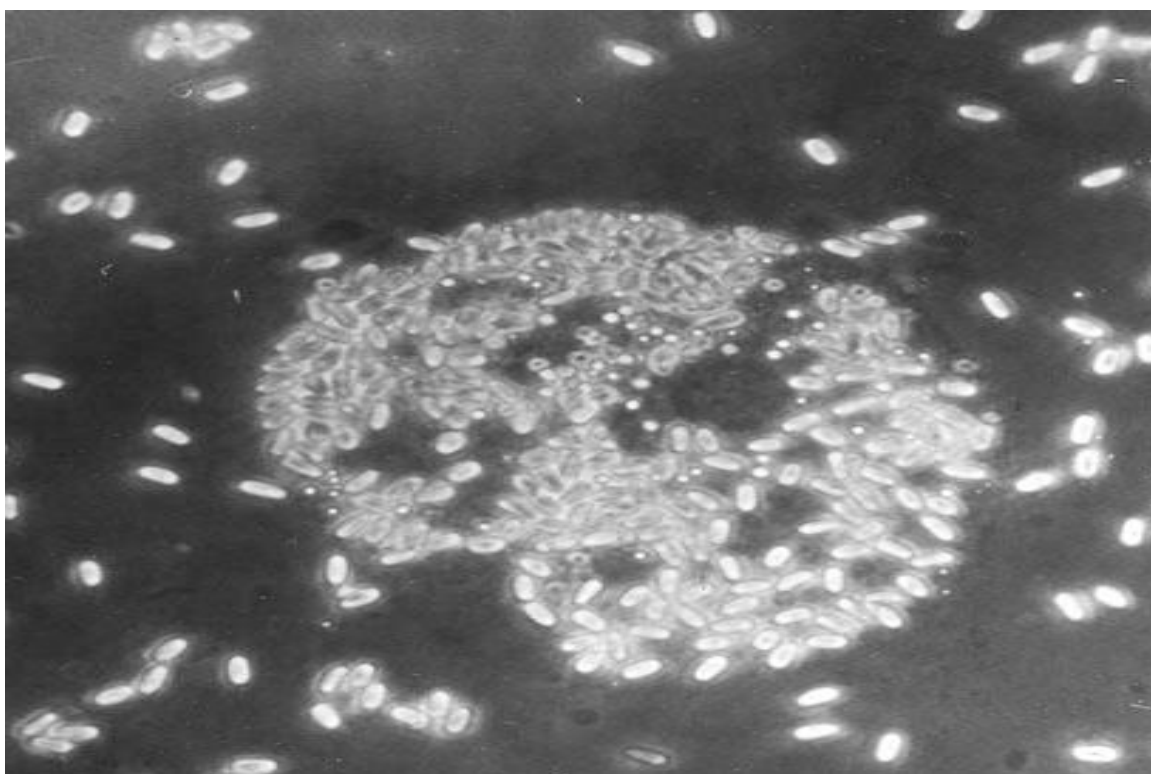
Επιπλέον οι **σποροβλάστες** αναπτύσσονται σε ώριμα σπόρια χωρίς επιπλέον πολλαπλασιασμό (Bigliardi and Sacchi, 2001; Han and Weiss, 2017). Συγκεκριμένα η ωρίμανση των σποροβλαστών χαρακτηρίζεται από πάχυνση της μεμβράνης προς σχηματισμό μιας συνεχούς πυκνής επιφάνειας, η οποία αργότερα γίνεται το εξωσποριακό στρώμα του τοιχώματος των σπορίων. Καθώς οι σποροβλάστες ωριμάζουν, ζαρώνουν και το κυτταρόπλασμά τους γίνεται όλο και πιο ηλεκτρονικά πυκνό λόγω της παραγωγής λείου και τραχέος ενδοπλασματικού δικτύου και διεύρυνσης του συμπλέγματος Golgi (Bigliardi and Sacchi, 2001). Οι σποροβλάστες τελικά συνθέτουν τα οργανίδια του σπορίου καθώς η πόλωση των οργανιδίων θεωρείται το σημείο στο οποίο ο σποροβλάστης μπορεί να χαρακτηριστεί ως σπόριο (Bigliardi and Sacchi, 2001).

Τα σπόρια γεμίζουν τα κύτταρα-ξενιστές (**Εικόνα 9**) και μπορεί είτε να αυτο-μολυνθούν μετά από άμεση βλάστηση στο μολυσμένο κύτταρο-ξενιστή ή μπορεί να απαιτούν περιβαλλοντική έκθεση (δηλαδή από την αναπαραγωγική φάση ή αλλιώς «σπορογονία» περνούν στο περιβάλλον) και ύστερα

διασκορπίζονται ως πηγή μόλυνσεων σε νέους ξενιστές και έτσι επαναλαμβάνεται ο κύκλος ζωής των μικροσποριδίων (Cali et al., 2017).



Εικόνα 8: Μείωση στα Μικροσπορίδια: (Τροποποιημένο από Andreadis, 2007)



Εικόνα 9: Σπόρια του μικροσποριδίου *Nosema apis* σε ένα εντερικό επιθηλιακό κύτταρο μέλισσας. Τα σπόρια εμφανίζονται πολύ διαθλαστικά όταν παρατηρούνται σε ένα παρασκεύασμα με μικροσκοπία αντίθεσης φάσης. (Τροποποιημένο από Cali et al., 2017).

## Διαδικασία μόλυνσης

Έχει αποδειχθεί εργαστηριακά (*in vitro*), ότι όλη η διαδικασία της μόλυνσης μπορεί να γίνει σε λιγότερο από 2 δευτερόλεπτα (Frixione et al., 1992), καθώς σύμφωνα με τους Han and Weiss, (2017) η αρχική φάση της μόλυνσης περιλαμβάνει τα σπόρια να εκτίθενται στις κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες που προκαλούν βλάστηση των σπορίων. Η εκτροπή ή η βλάστηση των σπορίων μπορεί να συμβεί είτε στον αυλό του εντέρου εάν έχουν ληφθεί περιβαλλοντικά σπόρια, είτε εντός των κυττάρων του ξενιστή. (Solter & Bencel, 2000).

Ο σπόρος όταν βλαστήσει, εγχέει τα περιεχόμενα των σπορίων με τη μορφή ενός μικρού κυττάρου, το «σπορόπλασμα», στο κυτταρόπλασμα ενός κυττάρου ξενιστή μέσω του πολικού σωλήνα (ή πολικό νήμα) (Bigliardi and Sacchi, 2001; Southern et al., 2007; Delbac and Polonais, 2008; Vávra and Lukeš, 2013; Weiss and Bencel, 2014; Han and Weiss, 2017), επίσης οδεύουν και οι πυρήνες (είτε μεμονωμένοι, είτε δίδυμοι αναλόγως το είδος), οι οποίοι εγχέονται στον ξενιστή (Larson, 1986; Υφαντίδης, 2018). Στην συνέχεια, σταδιακά το σπορόπλασμα ωριμάζει σε μερόνιο, το οποίο μετά από μια περίοδο ανάπτυξης και πυρηνικής διαίρεσης, διαιρείται σε θυγατρικά κύτταρα, τους μεροζωΐτες. (Weiss & Bencel, 2014).

Αναλυτικότερα, σύμφωνα με τους Frixione et al., (1997), Keohane and Weiss, (1998), Corradi and Keeling, (2009) και Vávra and Lukeš, (2013) όταν ενεργοποιείται η βλάστηση, το σπόριο:

- A. αρχίζει να απορροφάει νερό μέσω των υδατοπορινών, δημιουργώντας πίεση και πρήξιμο του πρόδρομου κενοτοπίου.
- B. μετά την ενεργοποίηση, η εισροή ιόντων στο σπόριο οδηγεί στην μετατόπιση του ασβεστίου και στην ενεργοποίηση ενός ενζύμου μετατροπής τρεχαλάσης που διασπά την τρεχαλόζη σε γλυκόζη και μεταβολίτες (Undeen, 1990; Keohane and Weiss, 1998).

Στην Α) περίπτωση, λόγω της συγκεκριμένης πίεσης, το σπόριο διαρρηγνύει τελικά το τοίχωμα του στην κορυφή και αναγκάζει την «εκτόξευση» του πολικού νήματος, το οποίο πρέπει να γίνει σωλήνας, μήκους από 50-500 μm (Frixione et al., 1997). Στην συνέχεια, γίνεται μεταφορά του σποροπλάσματος στο κύτταρο του ξενιστή (Frixione et al., 1992; Keohane and Weiss, 1998; Takvorian et al., 2005; Didier and Weiss, 2008; Han & Weiss, 2017; Han et al., 2020). Η ώθηση του σποροπλάσματος στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή, οφείλεται στο ότι το πρόδρομο κενοτόπιο διογκώνεται και έτσι ωθεί την περιεκτικότητα των σπορίων (σπορόπλασμα) μέσω του αυλού του ανεστραμμένου πολικού σωλήνα (Weidner et al., 1984). Με λίγα λόγια, το πολικό νήμα αφαιρείται από το σπόριο για να μολύνει κύτταρα του ξενιστή, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 10**.

Στην Β) περίπτωση αυτή η μετατροπή (δηλαδή της τρεχαλόζης σε γλυκόζη και μεταβολίτες) ευθύνεται για όλο το οσμωτικό συμβάν (συγκεκριμένα την απορρόφηση νερού), το πρήξιμο των

εσωτερικών δομών, καθώς και για τη συσσώρευση σημαντικής πίεσης σπαργής. Η πίεση απελευθερώνεται με τη ρήξη του σπορίου στην κορυφή και την επακόλουθη εκτροπή του πολικού σωλήνα (Keohane and Weiss, 1998).

Πριν από την απελευθέρωση του πολικού σωλήνα, πιστεύεται ότι το σπόριο λαμβάνει ερεθίσματα που πυροδοτούν την ενεργοποίηση και μπορεί να ποικίλλουν από είδος σε είδος, καθώς χρειάζεται να αναφερθεί πως η φύση του ερεθισμάτων δεν είναι γνωστή (Bigliardi and Sacchi, 2001). Όμως υπάρχουν πολλά πρωτόκολλα για τη βλάστηση των σπορίων και την απελευθέρωση των πολικών σωλήνων *in vitro* (Southern et al., 2007). Ύστερα, διαιρείται κατά τη διάρκεια της πολλαπλασιαστικής φάσης (Υφαντίδης, 2018), καθώς αναπτύσσεται σε κύτταρα που ονομάζονται μερόνια, τα οποία διαιρούνται κατά την διάρκεια της μερογονίας σε θυγατρικά κύτταρα, δηλαδή σε μεροζωΐτες και ύστερα εισέρχονται προοδευτικά στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή (Vávra and Lukeš, 2013).

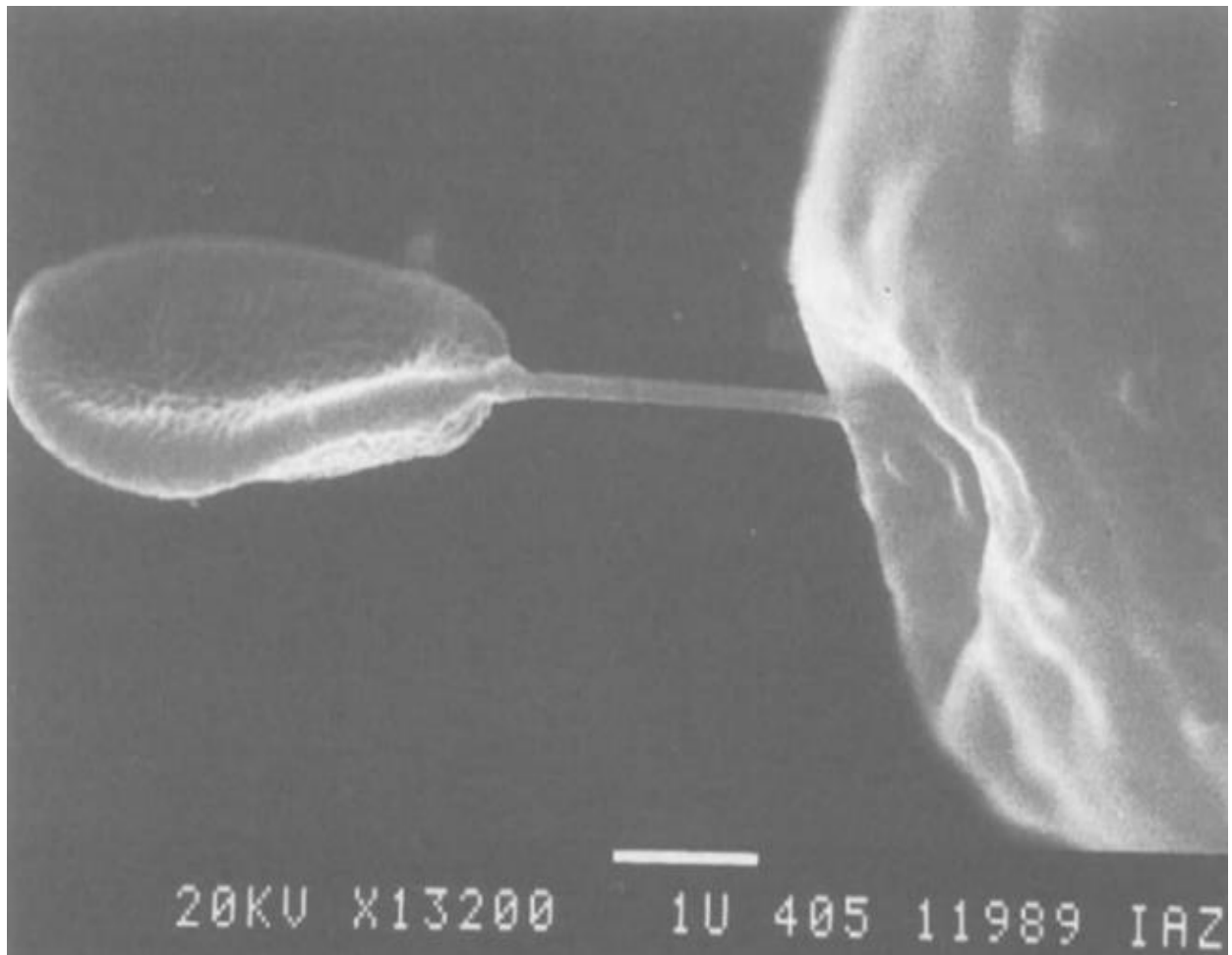
Επίσης κατά τους Cali et al., (2017):

- a) η μορφολογία αυτής της διαίρεσης χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των γενών των μικροσποριδίων και ο αριθμός των κυτταρικών διαιρέσεων που ακολουθούν ποικίλλει, ανάλογα με το εν λόγω γένος.
- b) οι βαριές λοιμώξεις που είναι χαρακτηριστικές των περισσότερων μικροσποριδίων δείχνουν την αφθονία κάποιου είδους διαδικασίας πολλαπλασιασμού στην πολλαπλασιαστική ανάπτυξη.

Η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός λαμβάνει χώρα μέσα στο κυτταρόπλασμα των στοχευόμενων κυττάρων των ιστών ξενιστών και διαφορετικά είδη μπορεί να είναι ειδικά για έναν ή περισσότερους συγκεκριμένους ιστούς ενός ξενιστή (Solter & Bencel, 2000). Οι επιδράσεις στους ξενιστές κυμαίνονται από σχεδόν καλοήθειες έως οξεία κακοήθεια, ανάλογα με τα είδη μικροσποριδίων και το είδος του ξενιστή.

Επιπροσθέτως, μετά από ένα άγνωστο σήμα, ενεργοποιείται η σύνθεση των πρωτεϊνών που θα αποτελούν το τοίχωμα των σπορίων και το υλικό του κυτταρικού τοιχώματος που αποτελείται από χιτίνη και από ειδικές πρωτεΐνες του μικροσποριδίου, όπου αυτές εναποτίθενται προοδευτικά στη πλασματική μεμβράνη των σταδίων που ονομάζονται σπορόνια (Southern et al., 2007).

Τα σπορόνια, ανάλογα με το είδος, μπορεί να συνεχίσουν να διαιρούνται και να παράγουν θυγατρικά σπορόνια, αλλά, τέλος, κάθε κύτταρο σπορονίου ωριμάζει με μια διαδικασία που ονομάζεται σπορογονία σε ένα σύνθετο μολυσματικό σπόριο εξοπλισμένο με το πολικό νήμα (Vávra and Lukeš, 2013).



**Εικόνα 10:** Διαδικασία μόλυνσης όπου παρατηρείται η ηλεκτρονική μικρογραφία ενός μικροσποριδιακού σπορίου να βλασταίνει με την αναστροφή του πολικού νήματος και παρατηρείται επίσης η μόλυνση του περιεχομένου του σπορίου (σπορόπλασμα) σε ένα κύτταρο μέσου εντέρου του ξενιστή (Solter & Bencel, 2000).

Κατά τους Peek et al., (2005), η πρωτεΐνη Ptp1, είναι το πιο άφθονο συστατικό του πολικού σωλήνα, τροποποιείται με την προσθήκη υπολειμμάτων της Ο-συνδεδεμένης μαννόζης, τα οποία πιθανώς παίζουν ρόλο στη προσκόλληση του πολικού σωλήνα στα κύτταρα ξενιστές. Οι Ptp1, ptp2 και οι δύο περιέχουν υπολείμματα κυστεΐνης και φαίνεται να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Η Ptp4 εντοπίζεται στο άκρο του πολικού σωλήνα και μπορεί να έχει ρόλο στη προσκόλληση στο κύτταρο του ξενιστή ή στην τελική διαδικασία εισβολής (Didier and Weiss, 2008).

Πρακτικά, οι πρωτεΐνες του πολικού σωλήνα (PTPs) παρατηρούνται όταν αυτός αυξάνεται σε μήκος, συγκεκριμένα εναποτίθενται και πολυμερίζονται στην άκρη της μεμβράνης του πολικού σωλήνα (Frixione, 1992; Weidner et al., 1984; 1995; Bigliardi and Sacchi, 2001).

Καθώς ο πολυμερισμός των PTPs εξελίσσεται έξω από τη μεμβράνη του πολικού σωλήνα, τα ελάσματα των πολικών πλαστών εισέρχονται στο κοίλο τμήμα του σωλήνα και το πρόδρομο κενοτόπιο ξεκινά να διογκώνεται όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, δημιουργώντας πίεση που ωθεί το σπορόπλασμα και τον πυρήνα στον πολικό σωλήνα (Bigliardi and Sacchi, 2001).

## ΝΟΣΕΜΙΑΣΗ

Η Νοσεμίαση είναι μία από τις πιο σοβαρές παθήσεις των ενηλίκων μελισσών (Giersch et al., 2009) που παρατηρείται σε κάθε χώρα με ενεργό τον μελισσοκομικό κλάδο (Paşca et al., 2019), καθώς είναι μια από τις πέντε πιο γνωστές μεταδοτικές ασθένειες (Barbançon, 2002).

Με βάση τις μοριακές φυλογένειες, τα μικροσπορίδια αυτά ταξινομούνται ως εξής: Υπερβασίλειο: Opisthokonta, Βασίλειο: Fungi, Φύλο: Microsporidia, Κλάση: Dikaryophyta, Τάξη: Dissociodikaryophyta, Οικογένεια: Nosematidae, Γένος: *Nosema* (Paşca et al., 2019).

Το Γένος *Nosema* περιλαμβάνει περισσότερα από 150 είδη (Chen et al., 2009) και συνήθως μολύνει ασπόνδυλα, συμπεριλαμβανομένων τουλάχιστον 12 Τάξεων εντόμων (Higes et al., 2007), αλλά και σπονδυλωτά συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων (Generch, 2010). Με λίγα λόγια, το παράσιτο *Nosema* είναι πανταχού παρόν σε εύκρατες συνθήκες και η Νοσεμίαση θεωρείται ότι έχει σοβαρή αρνητική επίδραση στην παραγωγική ικανότητα των μελισσών και στην ικανότητα επιβίωσης των προσβεβλημένων μελισσών κατά τη διάρκεια του χειμώνα (Dumitru et al., 2017).

Παγκοσμίως δύο μικροσπορίδια ευθύνονται για την ασθένεια την Νοσεμίαση: *N. ceranae* και *N. apis* (Forsgren and Fries, 2010; Θρασυβούλου, 2015, Paşca et al., 2019; Matović et al., 2020). Η αρχική υπόθεση ήταν ότι η ασθένεια προκαλείται αποκλειστικά από ένα είδος μικροσποριδίου, το *N. apis* (Giersch et al., 2009; Paşca et al., 2019) που μολύνει συγκεκριμένα την ευρωπαϊκή μέλισσα, *A. mellifera*, προκαλώντας λοίμωξη. Όντως, μέχρι κάποια περίοδο με βάση τα δεδομένα αλληλουχίας DNA, μπορεί να υποστηριχτεί η άποψη ότι αυτό το μικροσπορίδιο ήταν πράγματι ο μοναδικός αιτιολογικός παράγοντας της ασθένειας της Νοσεμίασης στη δυτική μέλισσα μέχρι τη δεκαετία του 1990 (Klee et al., 2007), καθώς επίσης έχει καταγραφεί η προσβολή του συγκεκριμένου παρασίτου στην μέλισσα *A. mellifera* για περισσότερα από 100 χρόνια (Higes et al., 2007).

Όμως το 1994, περιγράφηκε ένα νέο μικροσπορίδιο, παρόμοιο με τον *N. apis*, στις ασιατικές μέλισσες (*Apis cerana* Fabricius) από την Κίνα, συγκεκριμένα στο Πεκίνο (Fries et al., 1996). Αυτό το νέο είδος ταυτοποιήθηκε και ονομάστηκε *N. ceranae*, (Giersch et al., 2009), καθώς πάλι η αρχική υπόθεση ήταν ότι προκαλεί την ασθένεια της Νοσεμίασης μόνο στις ασιατικές μέλισσες και παράλληλα το *N. apis* μόνο στις ευρωπαϊκές μέλισσες (Generch, 2010; Fries et al., 1996).

Αργότερα αυτή η υπόθεση καταρρίφθηκε, διότι το *N. ceranae* ανιχνεύθηκε και στις ευρωπαϊκές μέλισσες (*Apis mellifera* L.) αρχικά στην Ταϊβάν (Huang et al., 2005) και ύστερα στην Ευρώπη με πρώτη επιβεβαιωμένη καταγραφή προσβολής στην Ισπανία (Higes et al., 2006), ενώ τα τελευταία χρόνια έχει εξαπλωθεί ανά τον κόσμο (Paxton et al., 2007; Giersch et al., 2009).

Είναι αποδεκτό, πως και τα δύο είδη μολύνουν το στομάχι των ενηλίκων μελισσών και μεταδίδονται οριζόντια μέσω της κατάποσης των σπορίων, για παράδειγμα, ενώ οι εργάτριες καθαρίζουν τις κηρήθρες μολυσμένων περιττωμάτων (Fries et al., 1996; Paxton et al., 2007).

Οι μολυσματικές μορφές του παρασίτου είναι τα σπόρια, καθώς αυτά είναι η αιτία που οδηγούν στη μετάδοση ασθενειών μεταξύ ατόμων (Weiss and Becnel, 2014; Generch, 2010; Paşca et al., 2019). Η μόλυνση του κυττάρου του ξενιστή περιλαμβάνει βλάστηση των σπορίων που οδηγεί στη μηχανική έγχυση του εξωθημένου πολικού σωλήνα στο κύτταρο του ξενιστή, ακολουθούμενη από τη μετάδοση του σποροπλάσματος μέσω του πολικού σωλήνα στο κυτόπλασμα του ξενιστή (Generch, 2010; Bigliardi and Sacchi, 2001).

Σε γενικές γραμμές, όμως η μόλυνση έχει δύο μορφές: το παράσιτο πολλαπλασιάζεται μέσα στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου των μελισσών (βλαστική μορφή) και ένα άλλο με μειωμένο μεταβολισμό, που συνήθως βρίσκεται σε νεκρές μέλισσες ή όταν εξαλείφεται στο εξωτερικό περιβάλλον (σποριωμένο σχήμα) (Paşca et al., 2019).

Χρειάζεται να αναφερθεί, πως η καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου, συνεπώς και η καταστροφή του εντερικού επιθηλίου, οδηγεί σε υπερπλασία της εντερικής κρύπτης, με μειωμένη επιφάνεια και δυσασπορρόφηση, η οποία οδηγεί σε υδαρή διάρροια. (Southern et al., 2007). Γι' αυτό το λόγο, η δυσεντερία είναι και το κύριο σύμπτωμα αυτής της ασθένειας.

Στην συνέχεια, δίνονται ορισμένες πληροφορίες για τους αιτιολογικούς παράγοντες της ασθένειας, *N. apis* και *N. ceranae*.

## ***Nosema apis***

Το *N. apis* είναι ένα από τα πρώτα περιγραφέντα μικροσποριδιακά παράσιτα και όπως αναφέρθηκε πριν, θεωρούνταν ότι είναι ο μόνος αιτιολογικός παράγοντας της Νοσεμίας στην ευρωπαϊκή μέλισσα (*A. mellifera*), που μπορεί να μειώσει τη διάρκεια ζωής των εργατριών και να προκαλέσει σημαντικές απώλειες στις χειμερινές αποικίες (Higes et al., 2006; Szawarski et al., 2019; Paşca et al., 2019).

Το *N. apis* μολύνει το επιθηλιακό στρώμα του μεσαίου εντέρου των ενηλίκων μελισσών *A. mellifera*, προκαλώντας πεπτικές διαταραχές (Higes et al., 2006) και συντόμευση της διάρκειας ζωής της μέλισσας, επομένως και μείωση του πληθυσμού της αποικίας (Anderson and Giaccon, 1992; Paxton, 2007), κατά περίπου το ήμισυ στα μελίτσια την άνοιξη και το καλοκαίρι (Giersch et al., 2009).

Οι μολυσμένες μέλισσες δεν αναπτύσσουν πλήρως τους υποφαρυγγικούς αδένες τους, με αποτέλεσμα στις αρχές του καλοκαιριού να παρατηρείται έως και το 15% των ωών να μην μπορούν να εκκολαφθούν, συγκεκριμένα σε σοβαρά μολυσμένα μελίτσια (Wang and Moeller, 1969; Giersch et al.,

2009). Επίσης, οι μολυσμένες βασίλισσες μπορεί να αντικαθίστανται γενικά μέσα σε λίγες εβδομάδες (Giersch et al., 2009).

Οι μολυσμένες αποικίες από *N. apis* υποφέρουν από αυξημένη χειμερινή θνησιμότητα ή φτωχή ανανέωση πληθυσμού την άνοιξη και μειωμένη απόδοση μελιού (Paxton, 2007). Ωστόσο, συχνά γίνεται απαρατήρητο, διότι το *N. apis*, όπως και όλα τα μικροσπορίδια, έχει μικροσκοπικό μέγεθος και δεν είναι ορατό με γυμνό μάτι και σπάνια οδηγεί στο θάνατο ενός προσβεβλημένου μελισσιού (Paxton, 2010).

### ***Nosema ceranae***

Το *N. ceranae* κατάγεται από την Ασία και αρχικά περιγράφηκε ως παθογόνο της ασιατικής μέλισσας *A. cerana* που δημιουργεί αποικίες μέσα σε κοιλότητες (Fries et al., 1996). Πρόσφατα, κατέστη προφανές ότι το *N. ceranae* έχει εισαχθεί στις ευρωπαϊκές μέλισσες τις τελευταίες δεκαετίες (Higes et al., 2006; Klee et al., 2007; Paxton et al., 2007; Chen et al., 2009; Aurori et al., 2011; Paşca et al., 2019) καθώς επίσης ότι είναι διαδεδομένο σε ολόκληρο τον κόσμο (Higes et al., 2006; Klee et al. 2007; Paxton et al. 2007; Chen et al. 2008; Giersch et al., 2009; Genersch, 2010).

Η έλευση μοριακών δοκιμών για το *Nosema spp.* οδήγησε στην ανίχνευση του *N. ceranae* σε παγκόσμιο επίπεδο (Giersch et al., 2009), καθώς η DNA αλληλουχία του *N. ceranae* δημοσιεύθηκε από τα Εθνικά Ινστιτούτα Υγείας (NIH) (Sanford, 2007). Η εξάπλωσή του έχει αναμφισβήτητα προκληθεί από το αυξημένο διεθνές εμπόριο (Paxton, 2010). Αναφορικά για την Ελλάδα, η πρώτη καταγραφή του *N. ceranae* έγινε το 2006 (Θρασυβούλου, 2015).

Όσον αφορά τα σπόρια του *N. ceranae*, είναι πολύ ανθεκτικά στο περιβάλλον και μπορούν να αντέξουν σε πολύ χαμηλές ή πολύ υψηλές θερμοκρασίες, γεγονός που συνεπάγεται την αυξημένη πιθανότητα της εκ νέου μόλυνσης των μελισσιών και την επανεμφάνιση της νόσου μετά από μεγάλο χρονικό διάστημα (FAO, 2015). Επίσης, δεν υπάρχουν ακόμα πληροφορίες για την καταστροφή αυτών των ανθεκτικών σπορίων, όμως σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, υπάρχουν ενδείξεις ότι μειώνεται ο αριθμός σπορίων του μικροσποριδίου από το οξικό οξύ (Θρασυβούλου, 2015).

Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τους Higes et al., (2007) το συγκεκριμένο παράσιτο μετά από πειραματική μόλυνση αναπτύχθηκε καλά στο *A. mellifera* και επίσης αναφέρουν ότι ο ενδοκυτταρικός κύκλος ζωής δύναται να ολοκληρωθεί εντός 3 ημερών. Επίσης, μελέτες δείχνουν ότι το *N. ceranae* μπορεί να είναι πιο μολυσματικό από το *N. Apis* όταν μολύνει το *A. mellifera* (Higes et al., 2007; Paxton et al., 2007; Giersch et al., 2009) και έχει αναφερθεί κατάρρευση μελισσιών σε θερμότερες περιοχές της Ευρώπης (Higes et al., 2008a), αλλά όχι στα βόρεια μέρη της ηπείρου (Gisder et al., 2010a).



Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός, ότι ορισμένοι συγγραφείς (Alaux et al., 2010; Vidau et al., 2011) έχουν περιγράψει πως το *N. ceranae* μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στον γλυκιδικό μεταβολισμό των μελισσών. Απόδειξη αποτελεί ότι η μολυσμένη εργάτρια μέλισσα φαίνεται να είναι ανίκανη να χρησιμοποιήσει την καταναλισκόμενη περίσσεια υδατανθράκων, επειδή οι περισσότεροι από αυτούς καταναλώνονται από το παθογόνο έτσι ώστε να ολοκληρώσει τον κύκλο ζωής του (Mayack and Nang, 2013).

Ωστόσο, οι εντερικές αλλοιώσεις που προκαλούνται από τον πολλαπλασιασμό του *N. ceranae* μπορεί να μειώσουν την πεπτική ικανότητα των μελισσών και να προκαλέσουν σημάδια λιμοκτονίας, όπως η αποδυνάμωση των εκκρίσεων της υποφαρυγγικής πρωτεΐνης στις μέλισσες παραμάνες (Vidau et al., 2014).

Επιπλέον, οι Li et al. (2018) ανέφεραν ότι οι μέλισσες που μολύνθηκαν από το *N. ceranae* παρουσιάζουν επιταχυνόμενη απώλεια λιπιδίων, υποδηλώνοντας ότι τα λιπίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης ως “καύσιμο” για αυξημένες μεταβολικές απαιτήσεις λόγω των λοιμώξεων.

Η έλλειψη σποροφόρων κυστιδίων, η παρουσία διπλοκάρου σε όλα τα στάδια του κύκλου ζωής και ο μοριακός χαρακτηρισμός είναι επίσης τυπικά για αυτό το γένος. (Higes et al., 2007).

Η παρατήρηση με μικροσκοπία φωτός έδειξε ότι τα σπόρια του *N. ceranae* από ευρωπαϊκές μέλισσες έχουν ωοειδές και μάλλον ομοιόμορφο σχήμα. (Chen et al., 2009). Όμως με πιο εξειδικευμένα μέσα, όπως η ηλεκτρονική μικροσκοπία, παρατηρείται ότι το *N. ceranae* περιέχει όλα τα υπερδομικά χαρακτηριστικά του γένους *Nosema* (Larsson 1986), δηλαδή εμφανίζει:

- διπλοκαρυωτικούς πυρήνες που υπάρχουν σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια.
- ένα μακρύ εύκαμπτο πολικό νήμα που εμφανίζεται στα ώριμα σπόρια.
- μερόνια, τα πρώτα στάδια του κύκλου ζωής του παρασίτου, τα οποία βρίσκονται σε άμεση επαφή με το κυτταρόπλασμα των κυττάρων ξενιστών.
- ώριμα σπόρια που οριοθετούνται από ένα πυκνό τοίχωμα που αποτελείται από στρώματα ηλεκτρονιακά πυκνού εξωσπορίου και ηλεκτρονιακά διαυγών ενδοσποριακών στιβάδων.
- και το πάχος του εξωσπορίου είναι 48–52 nm.

### Σύγκριση των δύο ειδών μικροσποριδίων

Ο αριθμός των πολικών σπειρών των νημάτων είναι ένα σημαντικό ταξινομικό κριτήριο για τη διαφοροποίηση των διαφορετικών ειδών *Nosema* (Burgess et al., 1974). Ο αριθμός των σπειρών του πολικού νήματος εντός των σπορίων του *N. ceranae* που μετρήθηκε από τους Fries et al. (1996), ήταν 20-23 σπείρες, καθώς και με μια πιο πρόσφατη έρευνα από τους Chen et al., (2009) όπου μετρήθηκε

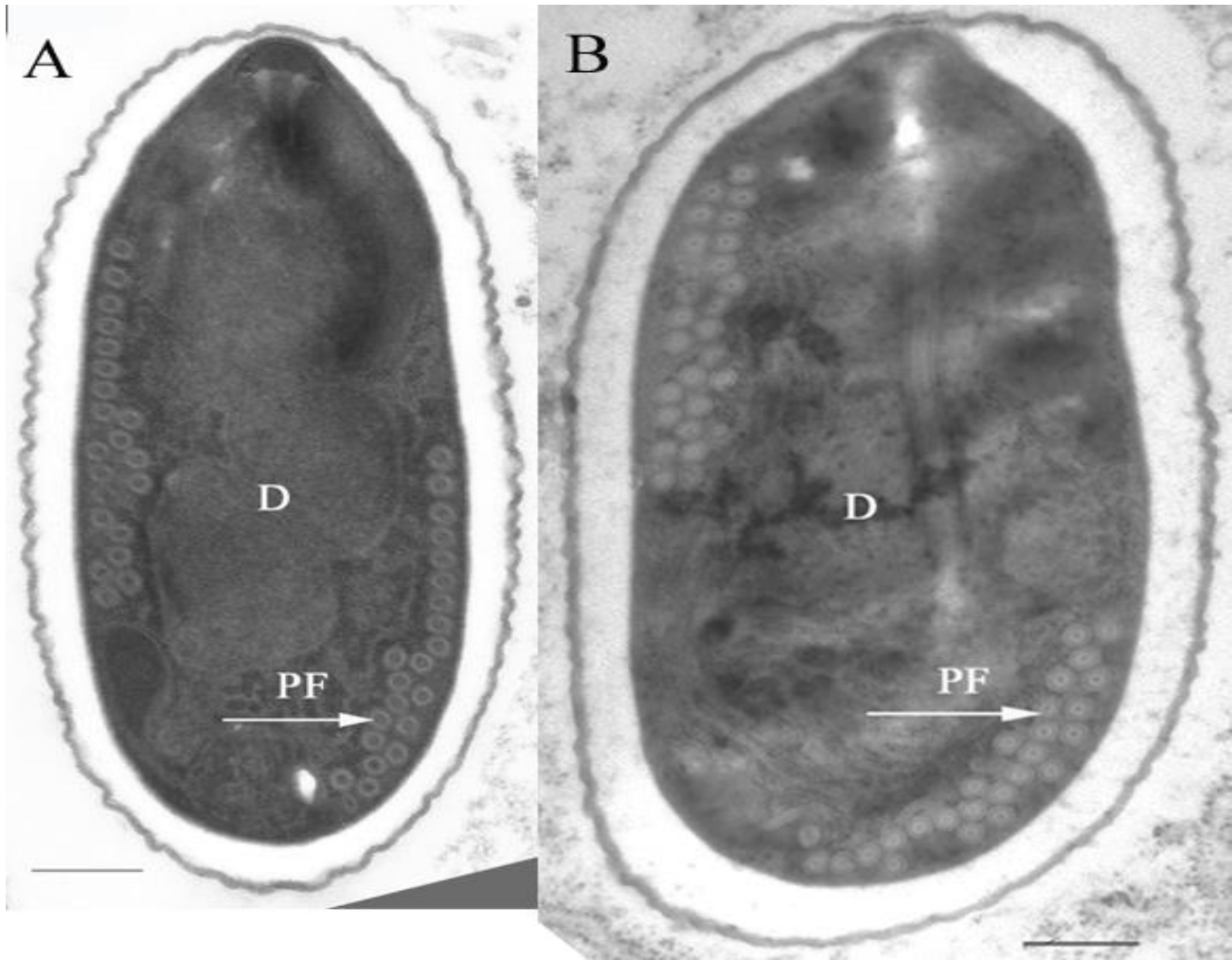
εξίσου ο αριθμός των σπειρών και βρέθηκε στις 18-21, επιβεβαιώνοντας ότι πλησιάζει πολύ το εύρος των 20-23 σπειρών που αναφέρθηκε στην προηγούμενη δημοσίευση, το οποίο είναι πολύ μικρότερο από τις περισσότερες από 30 σπείρες που καταγράφηκαν για το *N. apis* (Liu, 1984).

Ωστόσο, τα σπόρια των *N. ceranae* και *N. apis* έχουν παρόμοιο μέγεθος, με αποτέλεσμα να διαγνωστούν ως τα τελευταία αν και, κατά μέσο όρο, τα σπόρια του *N. ceranae* είναι ελαφρώς μικρότερα (Fries et al., 2006; Υφαντίδης, 2018; Matović et al., 2020). Συγκεκριμένα για το *N. apis* το μέγεθος των σπορίων κυμαίνεται μεταξύ 5-7 και 3-4  $\mu\text{m}$ , ενώ στο *N. ceranae* κυμαίνεται μεταξύ 4.4 x 2.2  $\mu\text{m}$  (Utuk et al., 2016). Επιπλέον, στα σπόρια του *N. apis* παρατηρείται ότι τα άκρα του είναι στρογγυλεμένα και συμμετρικά ενώ στα σπόρια του *N. ceranae* τα άκρα διαθέτουν απότομη κατάληξη (Fries et al. 1996; 2006). Τέλος, αξιοσημείωτο είναι ότι τα σπόρια του *N. ceranae* μπορούν να επιβιώσουν από τον παγετό, σε αντίθεση με του *N. apis* (Paşca et al., 2019).

Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα, χρειάζεται να σημειωθεί πως κατά τους Duquesne et al., (2021), αυτή η μικρή διαφορά στο μέγεθος των σπορίων δεν επαρκεί για διαφορική διάγνωση σε αναλύσεις ρουτίνας μικροσκοπίας, επομένως η μικροσκοπία δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διάκριση μεταξύ των δύο ειδών (Aurori et al., 2011). Η ταυτοποίηση του μικροσποριδίου μέσω μικροσκοπίου αφενός είναι δύσκολη (FAO, 2015) και αφετέρου δεν είναι πάντοτε αξιόπιστη (Υφαντίδης, 2018). Όμως, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί ικανοποιητική διάκριση με μοριακές τεχνικές όπως είναι η PCR, καθώς είναι απαραίτητες για την ταυτοποίηση καθενός από τα δύο είδη (Martin-Hernandez et al., 2007; Chen et al., 2008; Giersch et al., 2009; Aurori et al., 2011; FAO, 2015; Duquesne et al., 2021).

Οι διαφορές μεταξύ των δύο ειδών Μικροσποριδίων, *N. apis* & *N. ceranae*, εντοπίστηκαν και στο μορφολογικό αλλά και στο μοριακό επίπεδο (Fries et al., 2006), συγκεκριμένα έγκειται στην υπερδομή τους και στην ακολουθία γονιδίων rRNA της μικρής υπομονάδας (16S) (Εικόνα 11), επιτρέποντας την ταχεία αναγνώριση με ηλεκτρονική μικροσκοπία μετάδοσης και αλληλούχιση DNA αντίστοιχα. Πράγματι, η γονιδιακή αλληλουχία rRNA φαίνεται να είναι ένας αξιόπιστος να χρησιμοποιηθεί, γραμμωτός κώδικας DNA (Valentini et al., 2009) για τη διαφοροποίηση μεταξύ αυτών και άλλων μικροσποριδιακών ειδών (Klee et al., 2006).

Αναφορικά για τα συμπτώματα, ενώ η μόλυνση από *N. apis* προκαλεί σύνδρομο ταχείας δράσης, βραχείας διάρκειας, αντίθετα δεν συμβαίνει το ίδιο για το *N. ceranae*, το οποίο αντ' αυτού έχει παρατηρηθεί σε συνδυασμό με μη ειδικά συμπτώματα, όπως: σταδιακή μείωση του πληθυσμού, υψηλότεροι φθινοπωρινοί / χειμερινοί θάνατοι μελισσιών ή χαμηλή παραγωγή μελιού (Fries et al., 2006). Επίσης πρόσφατα αποδείχθηκε ότι το *N. ceranae* δεν εμφανίζει την εποχικότητα που διακρίνει το *N. apis*. (Martin-Hernandez et al., 2007). Χρειάζεται να αναφερθεί πως το *N. apis*, χαρακτηρίζεται κυρίως από δυσεντερία (Υφαντίδης, 2018), ενώ η *N. ceranae* περιγράφεται ότι προκαλεί θάνατο ατόμων και αποικιών που δεν προηγούνται ορατών συμπτωμάτων (Higes et al., 2008a; Martin-Hernandez et al., 2007; Genersch, 2010).



**Εικόνα 11:** Τομές σπορίων *Nosema ceranae* (A) και *Nosema apis* (B). D = διπλοκάρυα; PF = σπείρες πολικών νημάτων (βέλη). Ράβδοι (Bars) = 0,5 μm (Fries et al., 2006).

Η μόλυνση από *N. apis* περιορίζεται στο επιθήλιο του μέσου εντέρου (Fries, 1988), ενώ το *N. ceranae*, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως έχει ανιχνευτεί και σε άλλους ιστούς των μελισσών, όπως στα σωληνάρια Malpighi, τους υποφαρυγγικούς αδένες, αλλά και σε κύτταρα του λιποσώματος (Chen & Huang, 2010), με την ανίχνευση αυτή να έχει γίνει μόνο μέσω πολύ ευαίσθητων, μοριακών μεθόδων (Chen et al., 2009).

Αναφορικά για τη μολυσματικότητα, κατά τους Sinpoo et al., (2018), η μόλυνση από το *N. ceranae* δύναται να οδηγήσει σε υψηλότερα φορτία σπορίων από ότι στο *N. apis* και στα δύο είδη ξενιστών, τόσο στη δυτική μέλισσα *A. mellifera*, όσο και στην ασιατική μέλισσα *A. cerana*, όπου στον πρώτο ξενιστή παρατηρήθηκε μεγαλύτερος πολλαπλασιασμός του μικροσποριδίου, συγκριτικά με τον δεύτερο.

Στην συνέχεια γίνεται αναφορά στον βιολογικό κύκλο των μικροσποριδίων που είναι αιτιολογικοί παράγοντες της Νοσεμίας.

## Βιολογικός κύκλος

Ο κύκλος μόλυνσης από *Nosema* φαίνεται στην (Εικόνα 12). Τα σπόρια εισέρχονται μέσω κατάποσης από τις μέλισσες και βλασταίνουν γρήγορα στο μεσαίο έντερο (Odemer et al., 2018). Επίσης, εξωθούν τον πολικό σωλήνα και διεισδύουν στα επιθηλιακά κύτταρα για να απελευθερώσουν το σπορόπλασμα απευθείας στο κυτόπλασμα (Higes et al., 2007; Fries, 2010; Han and Weiss, 2017).

Όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, υπάρχουν δύο ξεχωριστές φάσεις στην ανάπτυξη μικροσποριδίων: μια πολλαπλασιαστική φάση (μερογονία) υπεύθυνη για τη μαζική αύξηση του αριθμού εντός του κυττάρου ξενιστή και μια σπορογονική φάση (σπορογονία), στην οποία τα σπορόνια παράγουν σποροβλάστες που ωριμάζουν σε σπόρια. (Bigliardi and Sacchi, 2001).

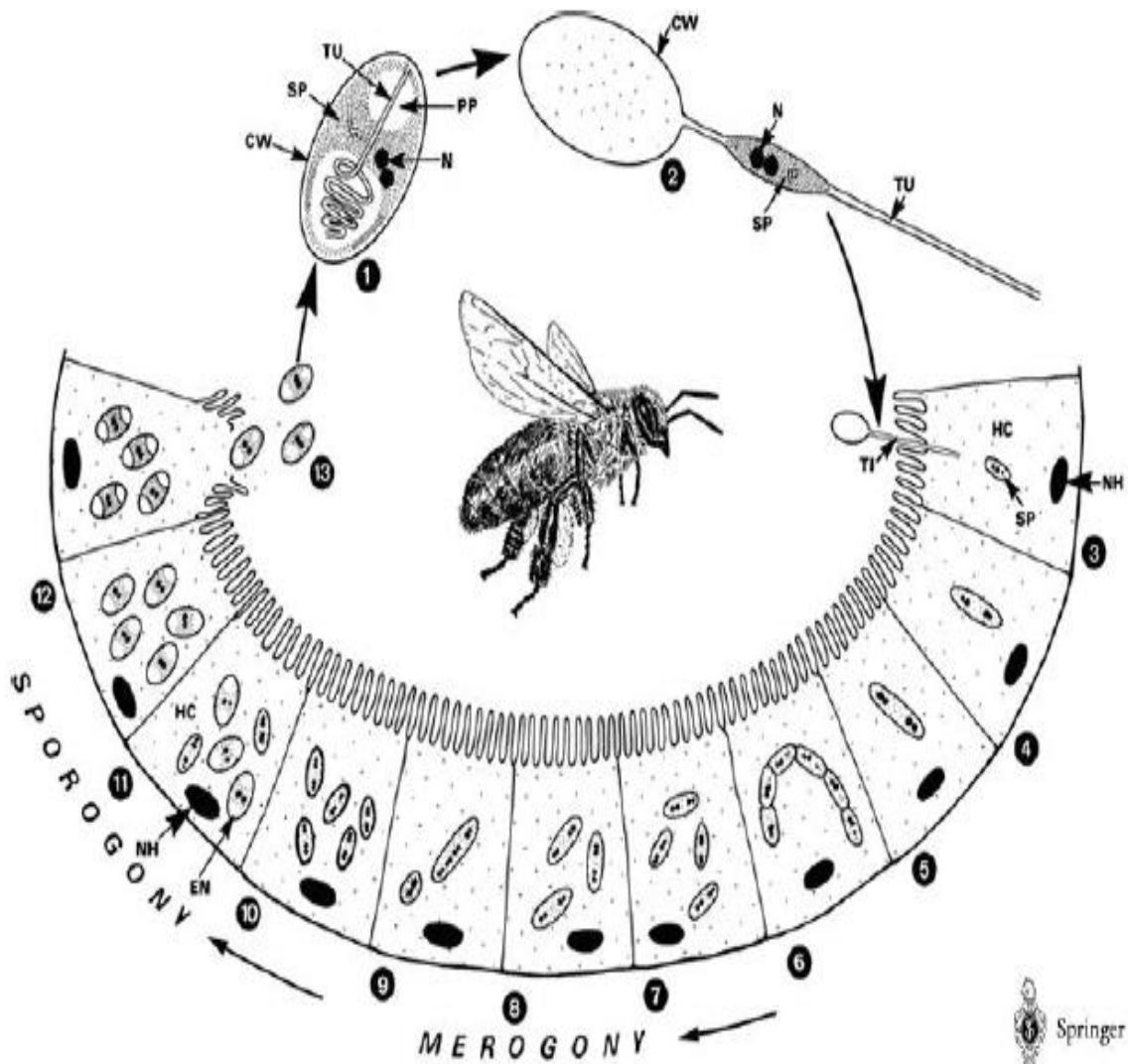
Κατά τους Weiss & Becnel, (2014), τα είδη *Nosema*, αναπαράγονται ασθενώς στην σπορογονία, όπου κάθε κύτταρο που ξεκινά σπορογονία αποδίδει μόνο δύο σπόρια. Τα είδη με ασθενή σπορογονία αναπαράγονται πιο αποτελεσματικά κατά τη διάρκεια της μερογονίας, όπου διάφοροι κύκλοι διαιρέσεων ενδέχεται να ακολουθούν ο ένας τον άλλον.

Η επαναλαμβανόμενη αυτή αναπαραγωγή έχει ως αποτέλεσμα, τα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή να γεμίζουν με σπόρια απογόνων σχεδόν μέσα σε μια εβδομάδα (Gisder et al., 2011), τα οποία εξασθενίζουν την μέλισσα, λόγω ανταγωνισμού σε θρεπτικά συστατικά, καθώς παραμένουν στην περιοχή εκεί έως την πλήρη εξάντληση όλων των αποθεμάτων. (Καραουλάνη, 2017; Υφαντίδης, 2018). Τέλος, τα κύτταρα μπορούν να διαρρηχτούν, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση νέων σπορίων στο έντερο του ξενιστή ή στο περιβάλλον αναλόγως τις συνθήκες (δηλαδή αν θα παραμείνει στην περιβαλλοντική φάση ή αν επικρατούν συνθήκες για να βλαστήσει ο σπόρος, έτσι ώστε να μεταβεί στην πολλαπλασιαστική φάση).

Εάν δεν επικρατούν οι κατάλληλες συνθήκες, τα κύρια σπόρια αναπτύσσονται σε περιβαλλοντικά σπόρια. Αυτά τα σπόρια είναι η έναρξη του νέου κύκλου αναπαραγωγής και πολλαπλασιασμού του παρασίτου για την επόμενη χρονιά (Bailey & Ball, 1991) και τότε με τις κατάλληλες συνθήκες τα πρωτογενή σπόρια θα βλαστήσουν ξανά και θα ξεκινήσει η διαδικασία της μόλυνσης.

Η μόλυνση των ενήλικων μελισσών από το *Nosema* συμβαίνει, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, κυρίως μέσω της κατάποσης σπορίων με τροφή ή νερό, όπου τα σπόρια περνούν από τη μέλισσα στα περιττώματα της, παρέχοντας νέες πηγές μόλυνσης μέσω των δραστηριοτήτων καθαρισμού και σίτισης στις αποικίες. Είναι σημαντικό να αναφερθεί επίσης ότι μπορεί να βρεθούν σπόρια και στη γύρη (Higes et al., 2008b; Chen et al., 2009).

Η μέση μολυσματική δόση για το *N. apis* έχει περιγραφεί ως 94,3 σπόρια ανά μέλισσα (Fries, 1988), ενώ για το *N. ceranae* καθορίστηκε στα 149 σπόρια ανά μέλισσα, αν και η ελάχιστη δόση που είναι ικανή να προκαλέσει ανιχνεύσιμη μόλυνση ήταν 1,28 σπόρια (McGowan et al., 2016).



**Εικόνα 12:** Ο κύκλος ζωής του *Nosema apis*, που προκαλεί τη δυσεντερία των μελισσών. 1 Μολυσματικά σπόρια ( $4-6 \times 2-4 \mu\text{m}$ ) που περιέχουν ένα τυπικά δινουκλεϊκό (διπύρηνο) σπορόπλασμα. Οι μέλισσες μολύνονται με την κατάποση των σπορίων από τα περιττώματα των παρασιτισμένων μελών της αποικίας. 2, 3 Στο εσωτερικό του εντέρου το σωληνοειδές πολικό νήμα εξωθείται, διεισδύει στην περιτροφική μεμβράνη (δεν τραβιέται) και εισέρχεται σε ένα εντερικό κύτταρο. Το σπορόπλασμα (SP) εγχύεται στο επιθηλιακό κύτταρο μέσω του σωληνοειδούς αυλού του πολικού νήματος. 4-12 Το σπορόπλασμα (9) αναπτύσσεται και διαιρείται ασεξουαλικά μέσω τετραπυρηνικών σταδίων στο κύτταρο ξενιστή του (Μερογονία). Τέλος, ο σχηματισμός σπορίων, ξεκινά από ένα στάδιο διπλοκάρυου (10) μέσω μιας τελικής διαίρεσης (Σπορογονία). 13 Όταν υπάρχουν ώριμα σπόρια, τα κύτταρα ξενιστές διασπώνται και απελευθερώνουν τα μολυσματικά σπόρια στον αυλό, τα οποία εκκενώνονται με τα απορρίμματα (ή μολύνουν γειτονικά κύτταρα). Στο τέλος του καλοκαιριού, η ανάπτυξη του *N. apis* μπορεί να μειωθεί (Hyrobiosis - Υποβίωση) και να ξεκινήσει ξανά την άνοιξη. Όπως και το έντερο, όλα τα όργανα των μελισσών παρασιτίζονται. CW (cyst wall) τοίχος κύστης, EN (encystations) εγκύστωση; HC (host cell) κύτταρο ξενιστή; N(nucleus) πυρήνας; NH (nucleus of host cell) (Mehlhorn, 2008).

Για να κατανοηθεί το πόσο μεγάλη αναπαραγωγή υπάρχει κατά την διάρκεια του βιολογικού κύκλου των συγκεκριμένων μικροσποριδίων, οι **Bailey and Ball (1991)** αναφέρουν ότι 30-50 εκατομμύρια σπόρια θα μπορούσαν να βρεθούν μέσα στο μεσαίο έντερο μιας μέλισσας εντός δύο εβδομάδων μετά την αρχική μόλυνση.

## Συμπτώματα

Τα συμπτώματα από την ασθένεια της Νοσεμίαςης είναι τα εξής:

- a. Ένα χαρακτηριστικό, όχι όμως και αποκλειστικό στοιχείο για τη διάγνωση της Νοσεμίαςης, είναι το γεγονός ότι κατά κανόνα αυτή παρουσιάζει έξαρση στο τέλος του χειμώνα έως τα μέσα της άνοιξης (Υφαντίδης, 2018).
- b. Σήμερα, είναι τεκμηριωμένο ότι τα περιττώματα που έχουν αποθεθεί κάποια στιγμή σε διάφορα σημεία μέσα στην κυψέλη (π.χ. στην είσοδο, στις κηρήθρες κ.λ.π.) (FAO, 2020), είναι πιθανότατα προσβεβλημένα από την ασθένεια της Νοσεμίαςης, καθώς αυτά θα αποτελέσουν την κύρια εστία μόλυνσης και συνεπώς την εξάπλωση του μύκητα. Όμως, χρειάζεται να αναφερθεί ότι η δυσεντερία δεν πρέπει να θεωρείται ως αποκλειστικό σύμπτωμα της Νοσεμίαςης, γιατί αυτή μπορεί αυτή να οφείλεται και σε άλλους παράγοντες (Υφαντίδης, 2018).
- c. Παρατηρείται μειωμένη δραστηριότητα των μελισσών (Θρασυβούλου, 2015).
- d. Οι άρρωστες μέλισσες δυσκολεύονται να πετάξουν, ενώ βρέθηκαν να πετούν ή να σύρονται μόνο μπροστά από την κυψέλη, κρεμασμένες σε μικρές συστάδες ζιζανίων (Barbançon, 2002).
- e. Παρατηρείται μείωση του γόνου, διότι οι προσβεβλημένες μέλισσες καταναλώνουν περισσότερες τροφές και μειώνεται η διάρκεια ζωής τους, καθώς επίσης προσφέρουν λιγότερη τροφή στη βασίλισσα, η οποία περιορίζει την ωοτοκία της και συχνά αντικαθίσταται (Θρασυβούλου, 2015; Καραουλάνη, 2017).

Όμως χρειάζεται να σημειωθεί ότι δεν έχουν τα ίδια συμπτώματα το *N. apis* με το *N. ceranae*. Ο λόγος είναι, διότι ο μύκητας *N. ceranae* έχει εξαπλωθεί σε μεγάλο βαθμό, αντικαθιστώντας την ενδογενή μορφή του *N. apis* στην μέλισσα *A. mellifera* και έχει ως αποτέλεσμα εντελώς διαφορετικά κλινικά συμπτώματα (FAO, 2015). Στην συνέχεια αναφέρονται οι διαφορές στα συμπτώματα των δύο ειδών.

### Συμπτώματα *N. apis*

Μετά από επαφή μελισσών με το *N. apis*, κατά τους Θρασυβούλου, (2015) και FAO, (2015) θα εμφανιστούν τα ακόλουθα συμπτώματα μόλυνσης:

- Οι προσβεβλημένες μέλισσες δεν μπορούν να συγκρατήσουν τα περιττώματά τους, τα αφήνουν στα τοιχώματα της κυψέλης, στην είσοδο (Εικόνα 13), ακόμη και στις κηρήθρες (Εικόνα 14) (διάρροια) (FAO, 2020). Οι υγιείς μέλισσες προσπαθούν να καθαρίσουν την κυψέλη, μολύνονται και αυτές και η αρρώστια διασπείρεται (Υφαντίδης, 2018).

- Οι μέλισσες αδυνατούν να εκκρίνουν βασιλικό πολτό και, ως εκ τούτου, δεν μπορούν να τροφοδοτήσουν το γόνο.
- Οι συλλέκτριες μέλισσες μειώνουν τη δραστηριότητά τους έως ότου σταματήσουν εντελώς.
- Στις σπάνιες περιπτώσεις στις οποίες η βασίλισσα είναι άρρωστη, η ωτοκία μειώνεται σημαντικά.
- Παρατηρούνται μπροστά από τις κυψέλες μέλισσες με διογκωμένες κοιλίες που αδυνατούν να πετάξουν και σέρνονται στο έδαφος με τα φτερά ανοιγμένα σε μορφή «Κ», παράλυτα, ενώ άλλες μέλισσες μαζεύονται σε μικρές ομάδες. (Higes et al., 2010).
- Στο κάτω μέρος της κυψέλης βρίσκονται νεκρές μέλισσες με πρησμένη κοιλιά και πόδια που έχουν συρθεί κάτω από το θώρακα.
- Υπάρχει αργή μείωση του πληθυσμού και στη συνέχεια η εργασία μειώνεται ενώ η κατάσταση ανησυχίας της αποικίας αυξάνεται.
- Ο πεπτικός σωλήνας της προσβεβλημένης μέλισσας, αλλάζει χρώμα, από καστανοκόκκινος γίνεται γκριζωπός και στην συνέχεια γαλακτόχρωμος (FAO, 2015).



**Εικόνα 13:** Περιπτώματα στην είσοδο της κυψέλης (FAO, 2015)



Εικόνα 14: Κηρήθρα με εμφανή τα περιττώματα των μελισσών (FAO, 2015).

### Συμπτώματα *N. ceranae*

Η προσβολή από *N. ceranae*, κατά τους [Θρασυβούλου, \(2015\)](#) και [FAO, \(2015\)](#) μπορεί να έχει τα εξής χαρακτηριστικά συμπτώματα:

- I. Η ασθένεια μπορεί να εμφανιστεί καθ' όλη τη διάρκεια του έτους.. Η ασθένεια επιμένει και στους ζεστούς μήνες.
- II. Οι μέλισσες πεθαίνουν γρηγορότερα
- III. Τυπικό σύμπτωμα είναι η απουσία διάρροιας.
- IV. Φαίνεται ότι οι συλλέκτριες μέλισσες πεθαίνουν μακριά από την κυψέλη.
- V. Ο αριθμός των σπορίων σε κάθε μέλισσα είναι υπερβολικά μεγάλος.

Αναφορικά με το σύμπτωμα, όπου οι μέλισσες πεθαίνουν μακριά από το μελίσσι, χρειάζεται να σημειωθεί πως αρχικά δεν γίνεται αντιληπτή η θνησιμότητα από τον μελισσοκόμο, μέχρι να φτάσει σε τέτοιο βαθμό που να έχει χαθεί μεγάλο μέρος των μελισσιών ([Θρασυβούλου, 2015](#)).



Συνοπτικά, οι μέλισσες που προσβάλλονται από το *N. ceranae* πεθαίνουν γρηγορότερα και δεν παρουσιάζουν τα τυπικά γνωστά συμπτώματα της ασθένειας (δυσεντερία, ασύνδετα φτερά κ.ά.) (FAO, 2015), καθώς επίσης η ασθένεια επιμένει και τους ζεστούς μήνες και σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία η κατάρρευση του μελισσιού είναι ταχύτερη (Θρασυβούλου, 2015).

## Παράγοντες εμφάνισης της Νοσεμίας

Οι παράγοντες που καθορίζουν την εμφάνιση αυτής της ασθένειας είναι κυρίως το κλίμα (Sokol and Michalczyk, 2016), συγκεκριμένα οι ξαφνικές μεταβολές της θερμοκρασίας (Chioveanu et al. 2004) και οι υγρές και κρύες περιόδους που αυξάνουν τις πιθανότητες μόλυνσης μεταξύ των ατόμων στο ίδιο μελίσσι, επειδή αναγκάζουν τις μέλισσες να μείνουν εντός αυτού (FAO, 2015).

Η έλλειψη εισροής μελιού και γύρης, μπορεί πάλι να επηρεαστεί από το κλίμα, διότι κατά τη διάρκεια μακρών, κρύων χειμώνων και βροχερών περιόδων την άνοιξη, οι μέλισσες μπορεί να μην βρίσκουν νέκταρ και γύρη (FAO, 2020).

Οι συχνές μετακινήσεις το φθινόπωρο κατά τον Θρασυβούλου, (2015) μπορεί να ευνοήσουν την ασθένεια της Νοσεμίας. Επιπλέον, εκείνη την περίοδο, όταν τα μελίσσια μεταφέρονται στα πεύκα (Εικόνα 15) για την συλλογή του μελιτώματος από το *Marchalina hellenica*, σε πολλές περιπτώσεις «ταλαιπωρούνται», διότι δεν υπάρχει γύρη από άλλες ανθοφορίες (Γκόρας, 2020). Η έλλειψη πρωτεϊνών λόγω απουσίας γύρης, οδηγεί τις μέλισσες να μην ανανεώνουν τον πληθυσμό, επομένως αυξάνεται η πιθανότητα έξαρσης της ασθένειας (Θρασυβούλου, 2015; Γκόρας, 2020).

Η ακατάλληλη υγιεινή της κυψέλης (Chioveanu et al. 2004) και οι συχνές επιθεωρήσεις μελισσιών κατά τη διάρκεια δυσμενών καιρικών συνθηκών (π.χ. χειμερινή περίοδος, θυελλώδεις ή βροχερές καιρικές συνθήκες) (FAO, 2020), μπορούν να προκαλέσουν την εμφάνιση της νόσου καθώς και τη διάδοσή της, λόγω της προκαλούμενης καταπόνησης.

Η αποθήκευση σκουρόχρωμων μελιών (π.χ. από ανθοφορία καστανιάς κ.ά.) κατά τη χειμερινή περίοδο στην κυψέλη, καθώς είναι πλούσια σε μέταλλα που μπορεί να προκαλέσει διάρροια στις μέλισσες, επομένως και μετάδοση της Νοσεμίας (Chioveanu et al. 2004).

Η παρουσία άλλων ασθενειών (όπως η βαρροϊκή ακαρίαση, ιοί κ.ά.) επιδεινώνει τα συμπτώματα της ασθένειας, διότι προκαλεί συνθήκες καταπόνησης (stress) στο μελίσσι (Θρασυβούλου, 2015).

Κυρίως όμως, η ικανότητα βλάστησης των σπορίων και ο πολλαπλασιασμός της Νοσεμίας εξαρτώνται ουσιαστικά από τη θερμοκρασία (FAO, 2015), δηλαδή 30 °C-35 °C (*N. apis*), και πάνω από 35 °C (*N. ceranae*), κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Τα σπόρια εισέρχονται στη διαδικασία της βλάστησης στο μέσο έντερο και έπειτα μολύνουν τα επιθηλιακά κύτταρα του όπου πολλαπλασιάζονται

έντονα για να παράγουν νέα περιβαλλοντικά σπόρια που απελευθερώνονται στον αυλό του εντέρου (Fries, 2010).



**Εικόνα 15:** Εγκατάσταση μελισσιών στα πεύκα για την μελιτοέκκριση του *Marchalina hellenica* (Γκόρας, 2020).

Όσον αφορά τη μετάδοση της ασθένειας, τα σπόρια των μικροσποριδίων μπορεί να εξαπλωθούν από μελίσει σε μελίσει: α) μέσω μολυσμένης τροφής, καθώς στη συνέχεια μεταδίδεται μέσω τροφάλλαξης ή μολυσμένου νερού (Θρασυβούλου, 2015; FAO, 2015; FAO, 2020), β) με μολυσμένο υλικό κυρίως από τους μελισσοκόμους και γ) μέσω μόλυνσης από τα περιττώματα (Υφαντίδης, 2018), καθώς η συγκεκριμένη περίπτωση ισχύει μόνο για το μικροσπορίδιο *N. apis* (Θρασυβούλου, 2015).

Εκτός από τη τροφάλλαξη, άλλη μια περίπτωση να μεταφερθεί η ασθένεια από μέλισσα σε μέλισσα είναι όταν αυτές εκτελούν τα καθήκοντα καθαρισμού τους (Υφαντίδης, 2018). Επίσης, παρατηρείται ότι οι κηφήνες και η βασίλισσα προσβάλλονται λιγότερο συχνά από ότι οι εργάτριες, επειδή ο καταμερισμός των εργασιών στο μελίσει διαφέρει, συνεπώς υπάρχει μικρότερη πιθανότητα προσβολής από την ασθένεια (Υφαντίδης, 2018).

Όσον αφορά τους λανθασμένους χειρισμούς από τους μελισσοκόμους, η πιθανή εξάπλωση της ασθένειας μπορεί να γίνει, είτε με την εναλλαγή μολυσμένων κηρήθρων από το ένα μελίσει στο άλλο

(Sokół and Michalczyk, 2016), είτε με τη χρήση μολυσμένων εργαλείων ή εξοπλισμού (FAO, 2020). Επιπλέον, η τροφοδότηση μελισσών με μολυσμένο μέλι (FAO, 2020) ή γύρη (Θρασυβούλου, 2015) δύναται να εξαπλώσει την ασθένεια. Συγκεκριμένα η γύρη από κηρήθρες, που είναι αποθηκευμένη, αποτελεί μια «δεξαμενή σπορίων» του *N. ceranae* (Higes et al., 2008b). Επίσης, η τροφοδότηση των μελισσών με ακατάλληλες τροφές όπως είναι το «ξινισμένο μέλι» ή γενικά τροφές με υψηλά ποσοστά δεξτρινών αυξάνουν την πιθανότητα έξαρσης της Νοσεμίας (Θρασυβούλου, 2015).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως στην περίπτωση της παρουσίας του *N. apis*, οι μέλισσες δεν μπορούν να συγκρατήσουν τα περιττώματά τους και έτσι τα εξαπλώνουν τόσο μέσα στην κυψέλη (κηρήθρες κ.λπ.), όσο και στην είσοδο του μελισσιού. Είναι αντιληπτό πως τα ώριμα σπόρια που απεκκρίνονται με τα περιττώματα μπορούν να μολύνουν τόσο άλλους ξενιστές όσο και καινούργιες αποικίες μελισσών (Smith, 2012). Αξιοσημείωτο είναι, ότι κατά τους Chen et al., (2009) είναι πιθανό ο βασιλικός πολτός, δηλαδή η έκκριση των υποφαρυγγικών και σιελογόνων αδένων των εργατριών μελισσών που χρησιμοποιούνται για τη διατροφή της βασίλισσας και των προνυμφών, να είναι ένας άλλος τρόπος μετάδοσης της ασθένειας.

Χρειάζεται να σημειωθεί πως η ταχύτητα της εξάπλωσης της Νοσεμίας μέσα στο μελίσι, ποικίλει ανάλογα με την εποχή. Την άνοιξη παρατηρείται μια σημαντική αύξηση του ποσοστού των προσβεβλημένων μελισσών σε ένα μελίσι, που είχε ήδη μολυνθεί από το προηγούμενο έτος (Υφαντίδης, 2018).

## Επιπτώσεις από την Νοσεμίαση

Η ασθένεια της Νοσεμίας προκαλεί τις εξής επιπτώσεις:

1. Παρατηρείται σημαντική οικονομική απώλεια στους μελισσοκόμους παγκοσμίως (Delbac and Polonais, 2008; Giersch et al., 2009; Paşca et al., 2019).
2. Μειώνει τη διάρκεια ζωής των εργατριών κατά 22-44% (Yucel and Dogaroglu, 2005; Paşca et al., 2019) σε μεγάλη έξαρση στο μελισσοκομείο μέχρι και 78% (Καραουλάνη, 2017).
3. Έχει κατηγορηθεί πως το *N. ceranae* ευθύνεται για την κατάρρευση αποικιών των μελισσιών ("Colony Collapse Disorder") (Paxton, 2010; Καραουλάνη, 2017).
4. Επηρεάζει επίσης και την ανάπτυξη του λιποσώματος (Chen et al., 2009).
5. Μειώνει την παραγωγή μελιού. (Paşca et al., 2019)
6. Προσβάλλονται οι υποφαρυγγικοί αδένες των μελισσών, με αποτέλεσμα να μην αναπτύσσονται κανονικά και να υπολειπώνονται (Θρασυβούλου, 2015; Υφαντίδης, 2018).
7. Επηρεάζει τα επίπεδα πρωτεϊνών και λιπαρών οξέων στην αιμόλεμφο (Chen et al., 2009).
8. Προκαλεί ατελή επικονίαση των καλλιεργειών (Paşca et al., 2019).

9. Τέλος, παρατηρείται δυσεντερία (μόνο για το *N. apis*), συχνή αντικατάσταση των βασιλισσών και μείωση του πληθυσμού του μελισσιού (Hassanein, 1951; Rinderer and Sylvester, 1978; Malone et al., 1995; Giersch et al., 2009; Καραουλάνη, 2017).

## Αντιμετώπιση

Κατά τους McCowen et al., (1951), Υφαντίδης, (2018) και Paşca et al., (2019) μια από τις λίγες δραστικές ουσίες, που δρούσαν κατά των μικροσποριδίων της Νοσεμίας ήταν η φουμαγγιλίνη (fumagillin), ένα αντιβιοτικό, που παράγεται από το μύκητα *Aspergillus fumigates*. Ο τρόπος δράσης του συγκεκριμένου αντιβιοτικού ήταν η καταστροφή ή αδρανοποίηση όλων των βλαστικών μορφών του παρασίτου, καταστέλλοντας την αναπαραγωγή και τον πολλαπλασιασμό του σε συνιστώμενες συγκεντρώσεις. καθώς το παρεμποδίζει από το να διπλαπλασιάζει το γονιδίωμα του (Higes et al., 2011; Huang et al., 2013).

Η φουμαγγιλίνη χρησιμοποιήθηκε εκτενώς για τον έλεγχο της νόσου του *Nosema* στη μελισσοκομία για πάνω από 60 χρόνια και αναστέλλει τη δράση του ενζύμου μεθειονίνη αμινοπεπτιδάση-2 (MetAP2) (Martín-Hernández et al., 2012). Στην εμπορική σύνθεση, η φουμαγγιλίνη υπήρχε ως άλας σε ισομοριακή ποσότητα με δικυκλοεξυλαμίνη (DCH) και σε σκεύασμα με την ονομασία Fumidil.

Έχει επίσης αναφερθεί ότι το *N. ceranae* φαίνεται να αναπαράγεται ακόμη καλύτερα σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις φουμαγγιλίνης, η οποία επηρεάζει επίσης τη φυσιολογία των μελισσών, έτσι ώστε η χρήση της να μπορεί να αυξήσει τον επιπολασμό (επικράτηση) του *N. ceranae* (Huang et al., 2013). Αρκετά ημισυνθετικά και συνθετικά ανάλογα φουμαγγιλίνης αποδείχθηκε ότι έχουν βιολογική δραστηριότητα κατά του *N. ceranae* κάτω από εργαστηριακές συνθήκες, αλλά κανένα δεν ήταν τόσο αποτελεσματικό όσο το Fumagillin-BVR (van den Heever et al., 2016a).

Σήμερα, έχει αποδειχθεί πως η τοξικότητα της φουμαγγιλίνης μπορεί να προκαλέσει κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου, λόγω των υπολειμμάτων σε προϊόντα κυψέλης (van den Heever et al., 2014). Για το λόγο αυτό, η φουμαγγιλίνη δεν είναι πλέον διαθέσιμη στην αγορά της ΕΕ από την 1η Ιανουαρίου 2000 (van den Heever et al., 2016), και στην συνέχεια καταργήθηκαν όλα τα αντιβιοτικά που είχαν χρήση στη μελισσοκομία (Υφαντίδης, 2018).

Ωστόσο, αφού καταργήθηκαν τα αντιβιοτικά, οι τρέχουσες τάσεις τείνουν σε ορισμένα φυσικά προϊόντα με αντιμικροβιακές δράσεις. Οι πιο δημοφιλείς εναλλακτικές θεραπείες κατά της Νοσεμίας στην Ευρώπη είναι το Api Herb, το Nozevit, το Vita Feed Gold, το Protofil, το Hive Alive και το Nosestat (Πίνακας 1).

**Πίνακας 1:** Σκευάσματα και ουσίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον περιορισμό της Νοσεμίας (Τροποποιημένο από [Θρασυβούλου, χ.η.](#)).

Vita Feed Gold	Φυτικό εκχύλισμα τεύτλων.
Protofil	Φυτικό εκχύλισμα από θυμάρι.
Nosestat	Δύο φιαλίδια με σκοπό την ανάμιξη ιωδιούχου καλίου και μυρμηκικού οξύ .
Api Herb	Εκχυλίσματα βοτάνων.
Nozevit	Εκχυλίσματα φλοιών βελανιδιάς, με βιταμίνες, αιθέρια έλαια και κιτρικό οξύ.
HiveAlive	Περιέχει θυμόλη, εκχυλίσματα φυκών και λεμονόχορτου.
Θυμόλη	Κρύσταλλοι θυμόλης.

Οι [Gajger et al. \(2009\)](#) έχουν αποδείξει ότι η θεραπεία με Nozevit σε σύγκριση με τις αποικίες μελισσών που δεν έχουν υποστεί αγωγή, είχε σημαντική μείωση των σπορίων: 48,73% την 10η ημέρα, 50,46% την 15η ημέρα και 70,91% την 22η ημέρα μετά από τεχνητή μόλυνση με σπόρια του *N. Apis*.

Μια άλλη μελέτη για τα φαρμακευτικά, τα πρεβιοτικά και τα προβιοτικά έδειξαν το κόμμα της ακακίας ως το πιο αποτελεσματικό πρεβιοτικό, αν και είχε υψηλή θνησιμότητα ως παρενέργεια, και το προβιοτικό Protexin ConcentrateVC single-strain (ProtexinC1) ως ικανό να μειώσει τα σπόρια, αυξάνοντας την επιβίωση των μελισσών ([Borges, 2015](#)).

Οι [Dumitru et al. \(2017\)](#) δοκίμασαν ένα μείγμα φαρμακευτικών βοτάνων και αιθέριων ελαίων που λαμβάνονται από διάφορα φυτά κατά της Νοσεμίας, συγκεκριμένα από τα φυτά *Mentha pepper*, *Melissa officinalis*, *Coriander sativum*, *Satureja hortensis*. Η παραπάνω πειραματική μελέτη είχε καλά αποτελέσματα στο ποσοστό επιβίωσης των μελισσών, διότι επαληθεύτηκε από τους συγγραφείς ότι δεν υπάρχουν τοξικολογικές επιπτώσεις για τις μέλισσες, καθώς επίσης ήταν αποτελεσματικό και στον έλεγχο της ασθένειας της Νοσεμίας.

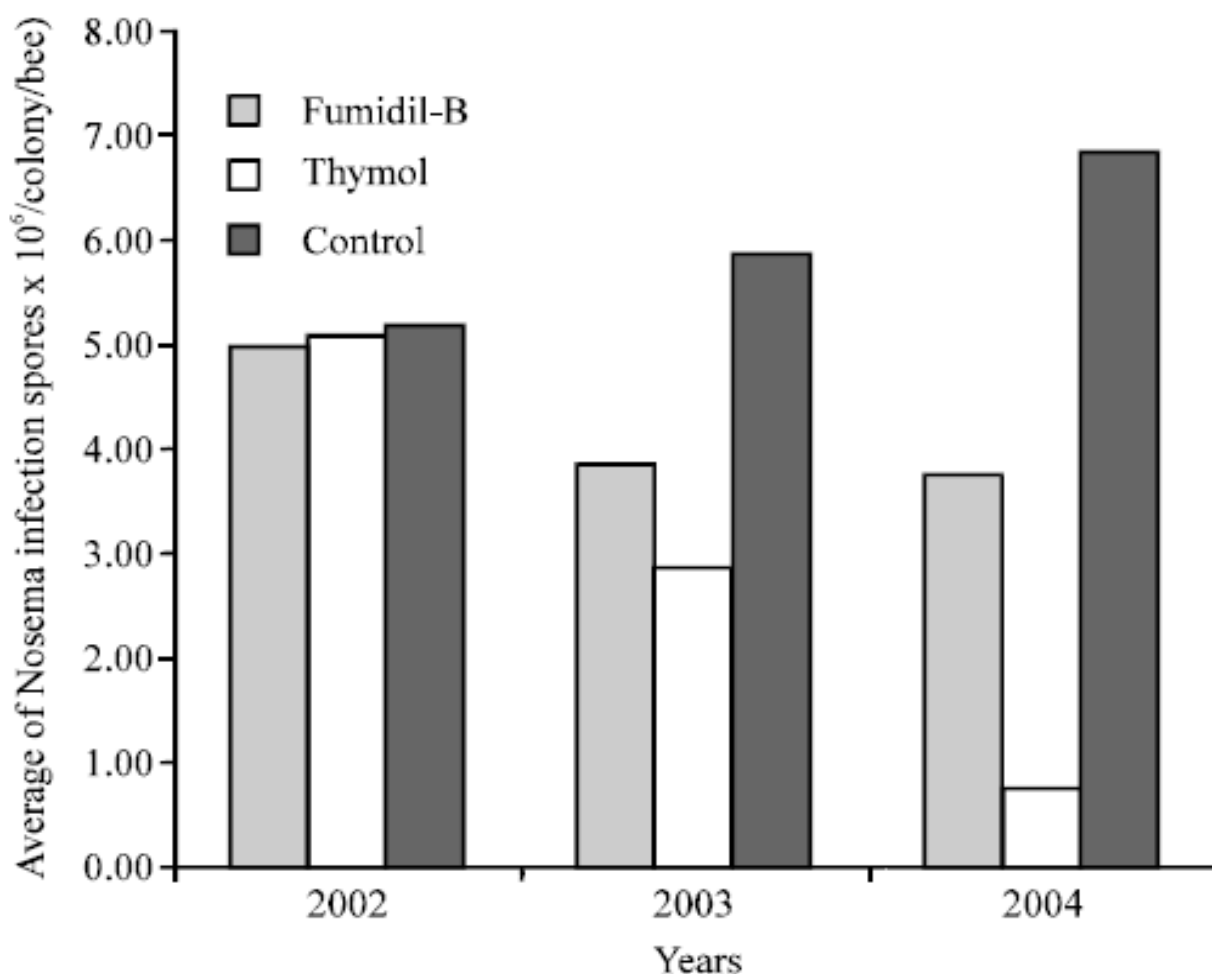
Επιπλέον, σε άλλη μια προσέγγιση θεραπείας της Νοσεμίας, συγκεκριμένα με τις πορφυρίνες (παράγωγα της πορφίνης), οι [Ptaszyńska et al. \(2018\)](#) απέδειξαν ότι το PP (Asp) 2 δεν έχει δυσμενείς επιπτώσεις στη διάρκεια ζωής της μέλισσας και η εισαγωγή του PP (Asp) 2 στη διατροφή των μελισσών που έχουν μολυνθεί με Νοσεμία είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση στον αριθμό των σπορίων *Nosema*, για αυτόν τον λόγο θεωρούν ότι οι πορφυρίνες είναι μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση έναντι των συμβατικών αντιβιοτικών.

Για τον περιορισμό των σπορίων Νοσεμίας στις μέλισσες, κατά τους [Yucel and Dogaroglu, \(2005\)](#), ως αποδοτικότερο μέτρο εμφανίζεται να είναι η συνεχόμενη επί σειρά ετών χρήση της θυμόλης. Σύμφωνα με την μελέτη τους, χρησιμοποίησαν την θυμόλη σε 55 μολυσμένα μελίτσια και

συνέκριναν την αποτελεσματικότητα της με το Fumidil το οποίο επίσης εφαρμόστηκε σε 55 μελίσσια για τρεις συνεχόμενες χρονιές. Συγκεκριμένα χρησιμοποίησαν 1 gr θυμόλης διαλυμένο σε 15 λίτρα σιρόπι (1:1). Η αποτελεσματικότητα της θυμόλης στην μείωση των σπορίων Νοσεμίας (Γράφημα 8), βρέθηκε ότι ήταν καλύτερη από εκείνη του Fumidil. Η χορήγηση θυμόλης αύξησε το γόνο και τον πληθυσμό των μελισσιών και προτάθηκε για την θεραπεία της Νοσεμίας αντί για του Fumidil.

Στην συνέχεια, υπάρχουν επίσης ορισμένες ενδείξεις ότι ο υποκαπνισμός με μυρμηκικό οξύ μπορεί να βοηθήσει στην καταστολή του *Nosema* (Underwood and Currie, 2009). Επιπλέον, οι Costa et al. (2010) ανέφεραν ότι η θυμόλη και η δραστική ουσία coumarhos που χρησιμοποιήθηκαν κατά του βαρρόα μπορεί να υποτεθεί ότι αυξάνουν την ευαισθησία σε μόλυνση από την ασθένεια, συγκεκριμένα για το *N. ceranae*. Αποδείχθηκε επίσης, από πρόσφατη μελέτη, ότι οι θεραπευτικές δόσεις οξαλικού οξέος που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο του βαρρόα, θα μπορούσαν να εμποδίσουν την ανάπτυξη του *N. ceranae* σε εργαστηριακές συνθήκες και στον αγρό τόσο σε ατομικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο αποικίας (Nanetti et al., 2015).

Γράφημα 8: Προσβολή από Νοσεμία σε αποικίες μελισσών (Yucel and Dogaroglu, 2005).



Όλα τα παραπάνω αφορούν είτε σκευάσματα που είναι εγκεκριμένα για κάποιες χώρες αυτήν την περίοδο, είτε πειραματικές μελέτες για την εύρεση θεραπείας της Νοσεμίας, σύμφωνα με την άποψη του συγγραφέα, μπορεί σε επόμενο χρονικό διάστημα να καταργηθούν τα εγκεκριμένα σκευάσματα και να αντικατασταθούν με άλλα. Επίσης, όσον αφορά τις πειραματικές μελέτες, μπορεί να μην είναι αποτελεσματικές προς την μείωση της ασθένειας σε πραγματικές συνθήκες στα μελισσοκομεία ή να μην φτάσουν σε σημείο να εγκριθούν για διάφορους λόγους.

Συνεπώς, το μόνο σταθερό που μπορεί να κάνει ο μελισσοκόμος είναι να κάνει έγκαιρη πρόγνωση και άμεση διάγνωση της ασθένειας πριν φτάσει σε μεγάλη έξαρση, καθώς επίσης να κάνει σωστούς χειρισμούς, ώστε να παρεμποδιστεί η εξάπλωση της ασθένειας.

### **Παρεμπόδιση μετάδοσης ασθένειας**

Ο κύριος ρόλος που καλείται να διαδραματίσει ο μελισσοκόμος από την δική του πλευρά, στη συγκεκριμένη πάθηση, είναι να συνδράμει στην διαδικασία της ελάττωσης του αριθμού των σπορίων στο μελίσι. (Υφαντίδης, 2018).

Σύμφωνα, με τους Barbançon, (2002) και Θρασυβούλου, (2015) ο μύκητας παράγει σπόρια που διατηρούν την βιωσιμότητα τους:

- a) για 2 χρόνια στα περιττώματα της μέλισσας,
- b) για 2 μήνες στο έδαφος
- c) για 4 μήνες στο μέλι
- d) για 5-6 εβδομάδες σε νεκρές μέλισσες.

Επιπλέον, τα σπόρια καταστρέφονται όταν εκτεθούν:

- I. στις ηλιακές ακτίνες για 15-30 λεπτά,
- II. στο φαινικό οξύ (4%) για 10 λεπτά,
- III. στους ατμούς του οξικού οξέος (15%) για δύο ημέρες,
- IV. στους ατμούς της φορμόλης για 48 ώρες,
- V. στο φλόγιστρο.

Καταστρέφονται επίσης όταν οι προσβεβλημένες κηρήθρες θερμανθούν στους 49°C για 24 ώρες και οι κυψέλες και τα πλαίσια εμβαπτιστούν για 15 λεπτά σε καυστική σόδα (0,5kg σε 50 λίτρα νερό), αλλά προϋποθέτει και πάλι χώρους με ρυθμιζόμενη ατμόσφαιρα και ακόμη και απαλλαγή των κηρηθρών από τυχόν μέλια πριν από την τοποθέτησή τους στον κατάλληλο χώρο (Θρασυβούλου, 2015; Υφαντίδης, 2018). Η θερμότητα, καθώς και η ηλιακή υπεριώδης ακτινοβολία, μπορούν να μειώσουν τον πληθυσμό σε λίγες ώρες (FAO, (2015), αν και δεν μπορεί να θεωρηθεί σημαντικός παράγοντας, διότι το *N. ceranae* εμφανίζεται και τους θερινούς μήνες, λόγω της ανθεκτικότητας του σε

υψηλές θερμοκρασίες (Huang et al., 2011). Οι Botias et al. (2012b) και Simeunovic et al. (2014) έδειξαν τον σημαντικό ρόλο της ηλικίας της βασίλισσας για τις αποικίες των μελισσών και πρότειναν να αντικατασταθεί μια παλιά βασίλισσα από μια νεότερη, για να μειωθεί το ποσοστό της έξαρσης από τα είδη *Nosema spp* στην κυψέλη.

## Διάγνωση της ασθένειας

Έχοντας υπόψη όσα αναφέρθηκαν στο υποκεφάλαιο **Συμπτώματα**, ένας μελισσοκόμος μπορεί να υποψιαστεί ότι υπάρχει η ασθένεια της Νοσεμίας, με την παρατήρηση της μείωσης του πληθυσμού των μελισσών. Επίσης, αν πρόκειται για το μικροσπορίδιο *N. apis*, χαρακτηριστικό σύμπτωμα είναι η παρατήρηση των περιττωμάτων μπροστά στην είσοδο της κυψέλης. Βασική επισήμανση είναι ότι αυτό το σύμπτωμα δεν ισχύει για το *N. ceranae*, επομένως η μοναδική οδός είναι η εργαστηριακή διάγνωση.

Χρειάζεται να αναφερθεί πως όλα τα παραπάνω δεν αποτελούν μοναδικά συμπτώματα της ασθένειας της Νοσεμίας, διότι υπάρχει πιθανότητα να οφείλεται και σε άλλους παράγοντες όπως δηλητηρίαση από φυτοπροστατευτικές ουσίες, τοξικότητα λόγω τροφοδοτήσεων, οξεία ή χρόνια παράλυση μελισσών που προκαλεί το άκαρι βαρρόα (*Varroa destructor*). Γι' αυτό το λόγο ο μελισσοκόμος μπορεί να ξεκινήσει τη διαδικασία διάγνωσης: 1) είτε παρατηρώντας ορισμένα συμπτώματα και ύστερα να προχωρήσει στις διαγνωστικές μεθόδους, 2) είτε απλώς κάνοντας προληπτικούς ελέγχους για την ύπαρξη ασθένειας (χωρίς την παρουσία συμπτωμάτων). Πάντα όμως είναι επιθυμητό να γίνεται προληπτική διάγνωση κατά τη διάρκεια του χειμώνα ή της άνοιξης (Randy, 2021) ή και μετά την μελιτοέκκριση του πεύκου το φθινόπωρο (Γκόρας, 2020).

Οι διαγνωστικές μέθοδοι θα περιγραφούν στη συνέχεια.

## Διάγνωση στο μελισσοκομείο

Ένα ανατομικό γνώρισμα κατά τους FAO, (2015) και Υφαντίδη, (2018) , που μπορεί υπό όρους να βοηθήσει στη διάγνωση της Νοσεμίας, είναι το χρώμα του στομάχου της άρρωστης μέλισσας (οι μελισσοκόμοι μπορούν να εξαγάγουν το έντερο τραβώντας το κεντρί με λαβίδα). Στη μη προσβεβλημένη μέλισσα το στομάχι είναι καστανό-κίτρινο (FAO, 2020), αλλά παραμένει έτσι για αρκετό διάστημα και σε μέλισσες, που τυχαίνει να έχουν προσβληθεί από το μικροσπορίδιο του *N. apis*.

Μόνο όταν θα έχει προχωρήσει πολύ η πάθηση, το χρώμα του στομάχου αλλάζει προς το γαλακτώδες λευκό (FAO, 2015; Υφαντίδης, 2018; FAO, 2020), (Εικόνα 16 και Εικόνα 17), λόγω του ότι τα μικροσπορίδια εξασθενούν τον ξενιστή λόγω του ανταγωνισμού σε θρεπτικά συστατικά, και



τότε πλέον αυτό αποκτά διαγνωστική ισχύ (Υφαντίδης, 2018). Εκτός από την αλλαγή στο χρώμα, το στομάχι της άρρωστης μέλισσας παρουσιάζεται επιπλέον και διογκωμένο. Η διάγνωση της Νοσεμίας με βάση τις μακροσκοπικές αλλοιώσεις του στομάχου τίθεται κατά την ώρα της επιθεώρησης του μελισσιού.



**Εικόνα 16:** Θετική δοκιμή πεδίου: γαλακτώδες λευκό έντερο μιας μέλισσας που επηρεάζεται από τη λοίμωξη (FAO, 2020).



**Εικόνα 17:** Αρνητική δοκιμή πεδίου: το έντερο μιας υγιούς μέλισσας έχει κοκκινωπό χρώμα (FAO, 2020).

## Εργαστηριακή διάγνωση

Η διαδικασία της εργαστηριακής διάγνωσης είναι: Α) **Δειγματοληψία**, Β) **Προετοιμασία δειγμάτων** και Γ) **Μικροσκοπική εξέταση**, όπου και θα αναλυθούν στην συνέχεια:

### Α) Δειγματοληψία

Το δείγμα των μελισσών που θα χρησιμοποιηθεί για ανάλυση θα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό. Γι' αυτό το λόγο κατά τον [Γκόρα, \(2020\)](#) πρέπει να ληφθούν υπόψη τα εξής:

- Χρειάζεται να παρθούν, οι συλλέκτριες μέλισσες, διότι αποτελούν το πιο αντιπροσωπευτικό δείγμα της αποικίας.
- Προτιμούνται μέλισσες από τα ακριανά πλαίσια με 10 μέλισσες ανά κηρήθρα.
- Δεν είναι επιθυμητό να λαμβάνονται δείγματα μόνο από νεκρές μέλισσες έξω από τη κυψέλη, διότι υπάρχει η πιθανότητα να δώσουν υψηλότερο βαθμό προσβολής, κάτι που μπορεί να μην αντιπροσωπεύει όλη την αποικία.
- Η δειγματοληψία να γίνεται σε κάθε μέλισσι ξεχωριστά, λόγω του ότι υπάρχει μεγάλη παραλλακτικότητα μεταξύ των μελισσιών στο μελισσοκομείο, καθώς γίνεται αποθήκευση του κάθε δείγματος ξεχωριστά.

Η δειγματοληψία των μελισσών πραγματοποιείται τόσο από το εσωτερικό, όσο και από την είσοδο της κυψέλης ([Cantwell, 1970](#); [Γκόρας, 2020](#)), όπου στην πρώτη περίπτωση, η δειγματοληψία γίνεται συγκεκριμένα κάτω από το καπάκι ή περιφερειακά από μια κηρήθρα ([Randy, 2021](#)).

Η υιοθέτηση ότι ο αριθμός των 10 μελισσών είναι ένα ικανοποιητικό δείγμα, εξελίχθηκε από μια δήλωση του Dr. White Gershom Franklins τον 20ο αιώνα ([Randy, 2021](#)). Έτσι μέχρι σήμερα, είναι επιθυμητή, η συλλογή τουλάχιστον 10 μελισσών από κάθε κηρήθρα, όπου με χρήση μιας μελισσοκομικής βούρτσας πραγματοποιείται η ρίψη των μελισσών σε μία πλαστική σακούλα ([Γκόρας, 2020](#)). Εάν δεν είναι πάντοτε εφικτή η συλλογή μεγάλου αριθμού μελισσών για δειγματοληψία, εναλλακτικά κατά τον [Cantwell, \(1970\)](#), πρέπει να χρησιμοποιηθεί δείγμα τουλάχιστον 25 μελισσών από μία κυψέλη. Συνοψίζοντας, για την εργαστηριακή εξέταση χρειάζονται 30-60 μέλισσες ανά κυψέλη για να είναι αντιπροσωπευτικό το δείγμα ([Reuter & Spivak, 2019](#)).

Αναφορικά με τις συλλέκτριες μέλισσες πρέπει να λαμβάνονται από την είσοδο της κυψέλης λίγο πριν ή μετά την πτήση ([Cantwell, 1970](#)). Κατά τον [Γκόρα, \(2020\)](#), ένας δεύτερος τρόπος συλλογής μελισσών (κυρίως συλλεκτριών) είναι με το κλείσιμο της εισόδου του μελισσιού, με ταυτόχρονη

συλλογή 60 μελισσών με όποιο τρόπο είναι εύκολα διαχειρίσιμο προς τον μελισσοκόμο είτε με αυτοσχέδια συσκευή αναρρόφησης είτε οτιδήποτε άλλο.

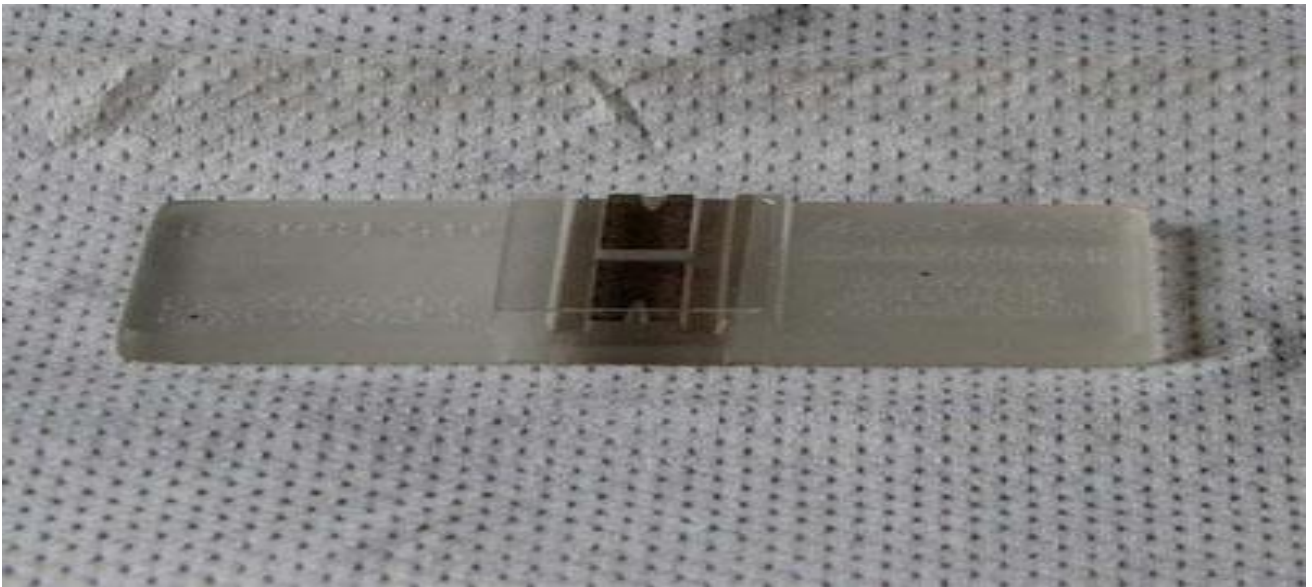
## B) Προετοιμασία δειγμάτων

Μετά τη συλλογή τα δείγματα τοποθετούνται σε διάλυμα οίνοπνεύματος ή σε κατάψυξη (μέχρι την αποστολή τους σε εξειδικευμένα εργαστήρια), όπου για την ανάλυση αφαιρούνται οι κοιλίες των μελισσών (Γκόρας, 2020), κυρίως γιατί τα σπόρια του *Nosema* αναπτύσσονται στα κύτταρα του επιθηλίου του στομάχου, διότι ως μικροσπορίδιο στοχεύει έναν ιστό που έχει υψηλή αναγεννητική ικανότητα (έντερο ή εκκριτικά επιθήλια) (Vávra and Lukeš, 2013).

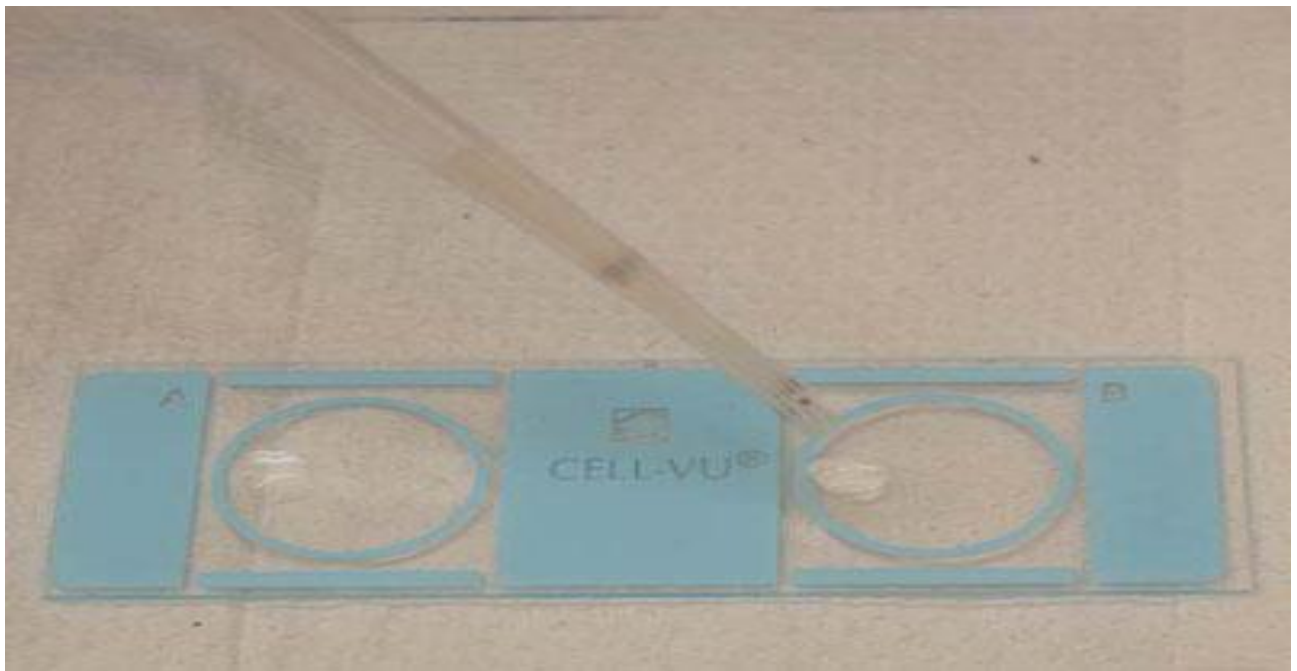
Αφού οι μέλισσες ακινητοποιηθούν με ψύξη και ύστερα αφαιρεθούν οι κοιλίες, τοποθετούνται σε κοίλο δίσκο (γουδί) (Cantwell, 1970), καθώς όπως αναφέρθηκε προηγουμένως ο ελάχιστος αριθμός του δείγματος είναι 25, αλλά υπάρχει μεγαλύτερη ακρίβεια αν είναι 50 κοιλίες μελισσών (Reuter & Spivak, 2019).

Όσον αφορά την χορήγηση απιονισμένου νερού στις κοιλίες, η ποσότητα εξαρτάται από τη μέθοδο του εργαστηριακού εξοπλισμού που έχει επιλεγεί, όπου σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ο εξοπλισμός είναι ο εξής: α) χρήση απλής αντικειμενοφόρου πλάκας, β) χρήση αιμοκυτταρόμετρου (Εικόνα 18) και γ) χρήση μετρητή σπερματοζωαρίων (Εικόνα 19). Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται μόνο απλή αντικειμενοφόρος πλάκα τότε μία σταγόνα αρκεί για κάθε κοιλία (Γκόρας, 2020). Αντίθετα, αν χρησιμοποιείται αιμοκυτταρόμετρο, τότε κατά τον Cantwell, (1970) προστίθεται 1 mL ανα κοιλία, ενώ για τους Reuter & Spivak, (2019) είναι: α) 0.5 mL ανά κοιλία αν χρησιμοποιείται αιμοκυτταρόμετρο (12,5 mL νερό για δείγμα 25 μελισσών ή 25 mL για δείγμα 50 μελισσών) ή β) 0.1 mL αν χρησιμοποιείται μετρητής σπερματοζωαρίων (2,5 mL νερό για δείγμα 25 μελισσών ή 5 mL για δείγμα 50 μελισσών). Ανεξαρτήτως της μεθόδου που θα χρησιμοποιηθεί από τα ανωτέρω, στη συνέχεια, ακολουθεί λειοτρίβηση στο γουδί, όπου χορηγείται στον επιλεγμένο εξοπλισμό (αντικειμενοφόρος πλάκα, αιμοκυτταρόμετρο, μετρητής σπερματοζωαρίων) μικρή ποσότητα του εναιωρήματος (Γκόρας, 2020).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, χρειάζεται να επισημανθεί πως στα περισσότερα εργαστήρια χρησιμοποιείται το αιμοκυτταρόμετρο, όπου κατά τον Cantwell, (1970), είναι μια τροποποίηση της μεθόδου που χρησιμοποιείται στον ιατρικό κλάδο για τον υπολογισμό των ανθρώπινων αιμοσφαιρίων. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 18, αποτελείται από ένα γυαλί κάλυψης και έναν θάλαμο που συγκρατεί έναν συγκεκριμένο όγκο υγρού και έχει γραμμές χαραγμένες για ευκολία κατά τη μέτρηση.



**Εικόνα 18:** Αιμοκυτταρόμετρο (Reuter & Spivak, 2019).



**Εικόνα 19:** Μετρητής σπερματοζωαρίων (Reuter & Spivak, 2019).

### Γ) Μικροσκοπική εξέταση,

Η εργαστηριακή μέθοδος που παρέχει απόλυτη βεβαιότητα για τη διάγνωση της Νοσεμίας είναι η μικροσκοπική εξέταση, όπου η χρήση του μικροσκοπίου προϋποθέτει τις εξής απαιτήσεις:

1. Αφού γίνει η προετοιμασία του δείγματος τοποθετείται μικρή ποσότητα του εναιωρήματος στην αντικειμενοφόρο πλάκα (ή αιμοκυτταρόμετρο) (Brock, 2015).
2. Τοποθετείται καλυπτρίδα πάνω στο εναιώρημα (Brock, 2015).

3. Αναμονή τριών λεπτών για να μην υπάρχει συνεχής κίνηση των σπορίων στο εναιώρημα. (Cantwell, 1970).
4. Αποφεύγεται η ύπαρξη φυσαλίδων αέρα στο παρασκεύασμα (Cantwell, 1970).
5. Τα σπόρια αναζητούνται κάτω από το μικροσκόπιο από το εναιώρημα των μελισσών. (Barbançon, 2002).
6. Η ρύθμιση του μικροσκοπίου ως προς τη μεγέθυνση είναι από 400x και άνω (Υφαντίδης, 2018).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, αναφέρθηκε μια τυπική διαδικασία διάγνωσης που συμβαίνει και στο εργαστήριο. Χρειάζεται να σημειωθεί πως υπάρχει άλλη μια μέθοδος για να διαγνωστεί η ασθένεια της Νοσεμίας, όπου είναι η συλλογή περιττωμάτων. Χρειάζεται να σημειωθεί, πως αποφεύγεται η συλλογή περιττωμάτων από μέλισσες ηλικίας μικρότερης των έξι έως οχτώ ημερών, καθώς δεν υπάρχουν ακόμη σπόρια Νοσεμίας ελεύθερα μέσα στον εντερικό σωλήνα τους (Fries, 1989; Υφαντίδης, 2018).

Για τη σχετική διάγνωση της πάθησης στην περίπτωση της βασίλισσας, δεν εφαρμόζεται η μακροσκοπική εξέταση του εντέρου, όπως αναφέρθηκε στη «**Διάγνωση στο μελισσοκομείο**». Επιπλέον, ούτε μικροσκοπική εξέταση, διότι θα έχει πεθάνει ήδη η βασίλισσα δημιουργώντας «ορφάνια» στο μελίσι (δηλαδή να μείνει η αποικία χωρίς βασίλισσα), και δεν είναι πάντοτε οικονομική η συνεχής αλλαγή της βασίλισσας καθώς δεν προτείνεται να θανατωθεί η βασίλισσα για την υποψία και μόνο της ύπαρξης της ασθένειας. Επομένως, κατά τον Υφαντίδης, (2018), μόνο αν είναι πρακτικά εφικτό να συλλεχθούν δείγματα από τα περιττώματα της, όσο αυτή είναι ακόμα ζωντανή, (π.χ. με ελαφριά πίεση στην κοιλία της). Επίσης, όπως αναφέρθηκε στα «**Συμπτώματα**», αν παρατηρηθεί μείωση του πληθυσμού, μπορεί να οφείλεται σε μόλυνση από τον μύκητα, συμπεριλαμβανομένης και της βασίλισσας.

Επιπροσθέτως, όπως επισημάνθηκε προηγουμένως, αποφεύγεται η δειγματοληψία μελισσών νεαρής ηλικίας (Υφαντίδης, 2018), διότι πιθανότατα θα δώσουν πολύ χαμηλούς βαθμούς προσβολής (μικρή ή καθόλου) άρα δεν θα αντιπροσωπεύουν την πραγματική κατάσταση στο μελισσοκομείο (Γκόρας, 2020). Υπάρχει η άποψη ότι μόνο οι ηλικιωμένες εργάτριες πρέπει να αποτελούν το δείγμα (Cantwell, 1970; Reuter & Spivak, 2019). Αντίθετα, κατά τον Υφαντίδη, (2018), το δείγμα δεν πρέπει να περιέχει μόνο μεγάλης ηλικίας μέλισσες, διότι θα οδηγήσει στο παραπλανητικό συμπέρασμα ότι ο βαθμός προσβολής είναι πολύ μεγάλος. Συμπερασματικά, κατά την άποψη του συγγραφέα πρέπει να λαμβάνεται όλο το φάσμα των ηλικιών για να υπάρχει ποικιλία όλων των βαθμών προσβολής, όπου ήταν και ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης.

## Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την προσέγγιση του βαθμού προσβολής από *Nosema spp.*

Το πρωτόκολλο που επικρατεί μέχρι και σήμερα για τον προσδιορισμό του βαθμού προσβολής για τη Νοσεμίαση είναι εκείνο του [Cantwell, \(1970\)](#) το οποίο θα αναλυθεί στη συνέχεια.

### Πρωτόκολλο Cantwell με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου.

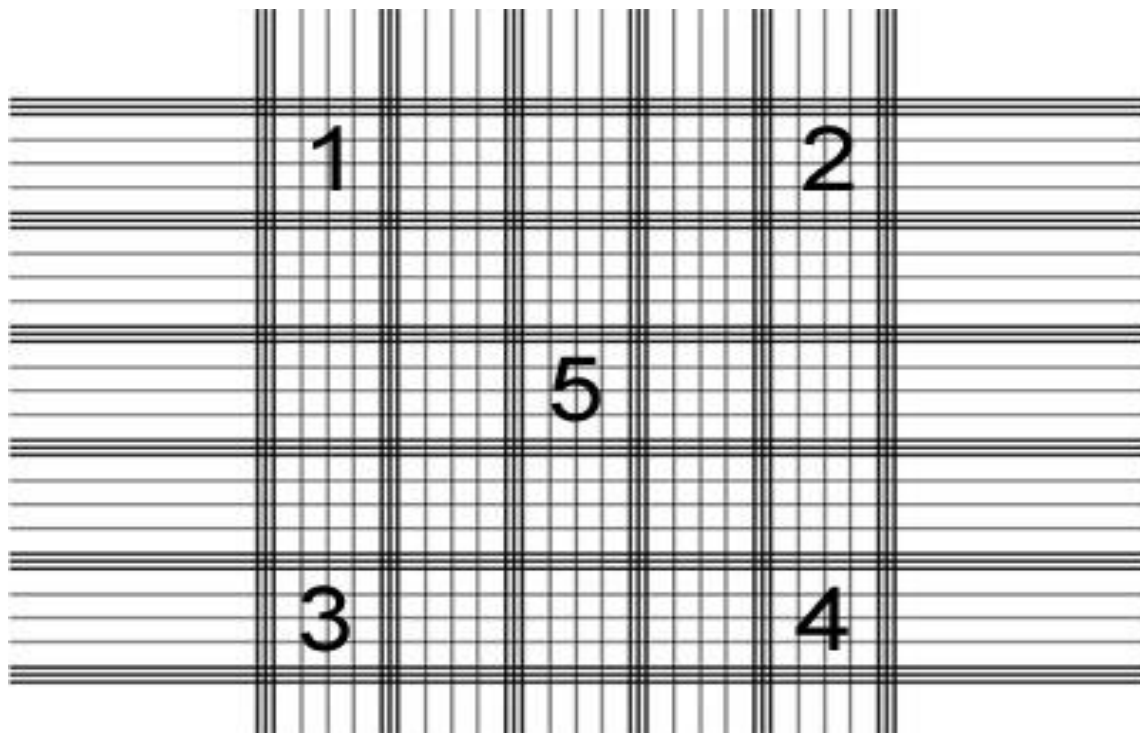
Κατά τον [Cantwell, \(1970\)](#), η μέθοδος προσδιορισμού του βαθμού προσβολής Νοσεμίασης και η μέτρηση των σπορίων *Nosema* περιλαμβάνει έναν ειδικό εξοπλισμό που ονομάζεται αιμοκυτταρόμετρο, καθώς όπως αναφέρθηκε στην «**Εργαστηριακή διάγνωση**», χρησιμοποιείται ευρύτατα στον ιατρικό κλάδο και αποτελείται από ένα γυαλί κάλυψης και έναν θάλαμο που συγκρατεί έναν συγκεκριμένο όγκο υγρού και έχει γραμμές χαραγμένες για ευκολία στην μέτρηση (**Εικόνα 18**). Η διαδικασία αυτής της μεθόδου είναι η εξής:

- a) Με την διαδικασία που περιεγράφηκε προηγουμένως, συλλέγονται (με ελάχιστο αριθμό 25) μέλισσες, για να γίνει η προετοιμασία δείγματος με την λειοτρίβηση των κοιλιών.
- b) Ύστερα ένα δείγμα του εναιωρήματος σπορίων αφαιρείται με ένα βρόχο (βακτηριολογικός κρίκος), και τοποθετείται κάτω από το κάλυμμα γυαλιού (καλυπτρίδα).
- c) Όταν το σταγονίδιο αγγίζει τον θάλαμο και το κάλυμμα, θα ρέει κάτω από το γυαλί κάλυψης γεμίζοντας έτσι τον θάλαμο και διασφαλίζοντας το σωστό όγκο.
- d) Αποφεύγεται η υπερφόρτωση του δείγματος στο αιμοκυτταρόμετρο και επίσης προτείνεται να μην ρέει το εναιώρημα στις σχισμές και στις δύο πλευρές.
- e) Επίσης, προτείνεται να μην υπάρχουν κενά αέρος (φυσαλίδες) κάτω από το γυάλινο κάλυμμα.
- f) Είναι ωφέλιμο να υπάρξει αναμονή περίπου τρία λεπτά για να «ηρεμήσουν» τα σπόρια πριν από τη μέτρηση.
- g) Βρίσκοντας την χαραγμένη περιοχή που φαίνεται στην **Εικόνα 20**, έπειτα γίνεται εστίαση του μικροσκοπίου στα σπόρια έτσι ώστε να είναι ευκρινή (**Εικόνα 21**).
- h) Στη συνέχεια γίνεται μέτρηση όλου του συνόλου των σπορίων σε 80 από τα μικρότερα τετράγωνα.

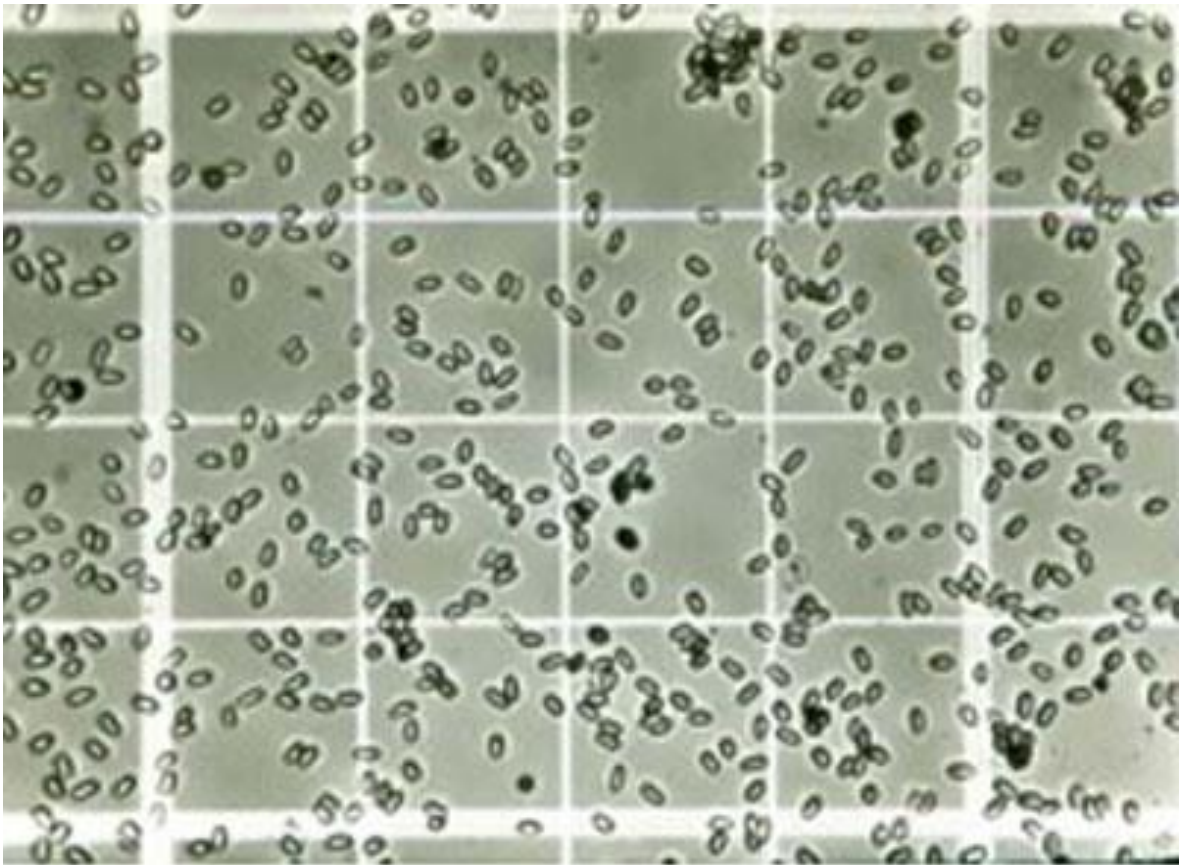
Χρειάζεται να σημειωθεί πως τα τετράγωνα είναι διατεταγμένα σε ομάδες των 16 με κάθε ομάδα να οριοθετείται από διπλές γραμμές. Πρέπει να συμπεριληφθούν στην καταμέτρησή εκείνα τα σπόρια που αγγίζουν την αριστερή και την άνω γραμμή αλλά όχι εκείνα που αγγίζουν τη δεξιά και τις κάτω γραμμές (**Εικόνα 21**).

Δεδομένου ότι καθένα από τα μικρότερα τετράγωνα στο θάλαμο έχει διαστάσεις 0,05 x 0,05 x 0,1 mm, ο συνολικός όγκος είναι 0,00025 mm<sup>3</sup>, δηλαδή 1/4000 mm<sup>3</sup>. Επομένως, για να βρεθεί ο μέσος αριθμός σπορίων ανά τετράγωνο, χρειάζεται να πολλαπλασιαστεί αυτός ο αριθμός με 4000 για να ληφθεί ο αριθμός των σπορίων ανά mm<sup>3</sup>. Στη συνέχεια, για να προσδιοριστεί ο αριθμός cm<sup>3</sup> ή mL πραγματοποιείται πολλαπλασιασμός του αριθμού 1000 με τον αριθμό ανα mm<sup>3</sup>. Εάν προστεθεί αρχικά 1 mL νερού για κάθε μέλισσα, ο αριθμός των σπορίων ανά cm<sup>3</sup> είναι ίσος με τον αριθμό ανά μεμονωμένη μέλισσα. Επίσης, εάν προστεθεί αρχικά 1 mL νερού ανά μέλισσα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ακόλουθη εξίσωση για τον προσδιορισμό του αριθμού των σπορίων ανά μέλισσα (Υπολογισμός Α-**Εικόνα 22**), όπου είναι η διαίρεση του συνολικού αριθμού μετρημένων σπορίων με τον αριθμό των τετραγώνων που μετρήθηκαν, καθώς το αποτέλεσμα θα πολλαπλασιαστεί με τον αριθμό “4 x 10<sup>6</sup>”.

Είναι κατανοητό πως το πρωτόκολλο του [Cantwell, \(1970\)](#), είναι αξιόπιστο και γι’ αυτό το λόγο πολλά εργαστήρια έχουν υιοθετήσει τη μεθοδολογία και τον εξοπλισμό του. Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 2** παρουσιάζονται οι βαθμοί προσβολής που προτείνονται στη συγκεκριμένη μελέτη. Αξίζει να σημειωθεί πως δεν υπάρχει σαφής διαχωρισμός των βαθμών προσβολής από Νοσεμίαση, κάτι που δημιουργεί κενό στη βιβλιογραφία.



**Εικόνα 20:** αριθμημένη (χαραγμένη) περιοχή ([Reuter & Spivak, 2019](#)).



**Εικόνα 21:** Λήψη φωτογραφίας σε ένα τυχαίο σημείο της αριθμημένης περιοχής του αιματοκυτταρόμετρου (Reuter & Spivak, 2019).

<u>Calculation A</u>	
Total number of spores counted	$\times \frac{4 \times 10^6}{\text{Number of squares counted}} = \text{No. spores/bee}$

**Εικόνα 22:** Υπολογισμός A: Συνολικός αριθμός σπορίων που έχουν μετρηθεί (Total number of spores counted)/Αριθμός των τετραγώνων που έχουν μετρηθεί (Number of squares counted), Αριθμός σπορίων ανα μέλισσας (No. spores/bee). (Cantwell, 1970).

**Πίνακας 2:** Βαθμοί προσβολής κατά Cantwell, (1970).

ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
+	++	+++



## Ανάγκη δημιουργίας κοινού πρωτόκολλο

Είναι ωφέλιμο να υπάρχει κοινή προσέγγιση των ερευνητών για τον βαθμό προσβολής των ασθενειών στον κλάδο της Γεωπονίας, συγκεκριμένα στην παθολογία παραγωγικών εντόμων. Στη σημερινή εποχή, ακόμη και με την παρουσία αξιόπιστων πρωτοκόλλων, όπως αναφέρθηκε πριν στο υποκεφάλαιο «**Πρωτόκολλο Cantwell με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου**» ο προσδιορισμός του βαθμού προσβολής της Νοσεμίας γίνεται μέσω του μέσου αριθμού σπορίων ανά μέλισσα σε ένα συγκεντρωτικό δείγμα (Cantwell, 1970; OIE, 2008; Fries et al., 2013). Υπάρχουν όμως σε ορισμένες μελέτες που υποδεικνύουν ότι ο καλύτερος τρόπος για τον προσδιορισμό του βαθμού προσβολής είναι η εκτίμηση της αναλογίας των μολυσμένων μελισσών στην αποικία (Fries et al., 2013). Σύμφωνα με τα παραπάνω αποδεικνύεται ότι μέχρι και σήμερα υπάρχουν ακόμη διαφωνίες στη συγκεκριμένη περίπτωση, κάτι που είναι άξιο προς προβληματισμό δεδομένου το ότι έχει εξελιχθεί ραγδαία η σύγχρονη μελισσοκομία σε πολλά επιστημονικά ζητήματα.

Είναι φανερό πως η αξιολόγηση του κάθε ερευνητή είναι υποκειμενική, διότι για το ίδιο δείγμα με σχεδόν τον ίδιο βαθμό προσβολής, δύναται να υπάρξει διαφορά στην αξιολόγηση από εργαστήριο σε εργαστήριο (Cantwell, 1970). Επομένως, η ανάγκη για δημιουργία ενός πρωτοκόλλου που αποδεδειγμένα θα λύνει αυτό το πρόβλημα και πιθανότατα χρειάζεται να υιοθετηθεί στα περισσότερα εργαστήρια, είναι αναγκαία.

Επιπλέον, ο κυριότερος λόγος που χρειάζεται η εργαστηριακή εναρμόνιση σε θέματα παθολογίας της μέλισσας, (στην προκειμένη περίπτωση για την Νοσεμίαση) είναι διότι μέσω ενός κοινού πρωτοκόλλου μπορεί να υπάρξει έγκαιρη και αντικειμενική ενημέρωση των μελισσοκόμων για τη κατάσταση που επικρατεί στο μελισσοκομείο, ώστε να προβούν στους κατάλληλους χειρισμούς.

## Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι να εκτιμηθούν οι αξιολογήσεις των προσβολών από Νοσεμίαση. Αυτό πραγματοποιήθηκε μέσω συνεργασίας με έγκριτους επιστήμονες του κλάδου στην Ελλάδα που προσφέρθηκαν να συμμετάσχουν, προκειμένου να εντοπιστούν τόσο κοινοί τόποι, όσο και δυσκολίες. Ειδικότερα, για αυτές τις δυσκολίες, χρειάζεται να σημειωθεί πως προκύπτουν από την υποκειμενικότητα του κάθε αξιολογητή. Ο κυριότερος στόχος όμως είναι η δημιουργία μιας ενιαίας πρότασης για τη διαχείριση των δειγμάτων ώστε κατά τις αναλύσεις ρουτίνας που πραγματοποιούν τα σχετικά εργαστήρια και απευθύνονται στους μελισσοκόμους, να ακολουθούν ένα κοινό πρωτόκολλο με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αντικειμενικότητα. Η μέθοδος που ακολουθείται, έχει ως γνώμονα την ευκολία στη χρήση και στην αποτελεσματικότητα, ως προς την αντικειμενική αξιολόγηση των βαθμών

προσβολής των ενήλικων μελισσών από την ασθένεια της Νοσεμίας. Επιμέρους στόχοι της διπλωματικής είναι η εναρμόνιση των εργαστηριακών ελέγχων, λαμβάνοντας υπόψη την υποκειμενικότητα της μεθόδου και προτείνοντας κατευθυντήριες γραμμές, σε εξειδικευμένα εργαστήρια.

## **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **Διεξαγωγή μελέτης**

Η διεξαγωγή της μελέτης πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Σηροτροφίας και Μελισσοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά τα έτη 2018-2020, καθώς η δειγματοληψία μελισσών για την αξιολόγηση και ομαδοποίηση των εκτιμήσεων ποσοτικοποίησης του βαθμού προσβολής από Νοσεμία έγινε από μελίτσια που βρίσκονται στα μελισσοκομεία του εργαστηρίου (με συνολικά περίπου 50 μελίτσια). Επιπλέον, εκτός από τα δείγματα μελισσών που προσκομίστηκαν από τα πειραματικά μελισσοκομεία του Γ.Π.Α., συμπεριλήφθηκαν και δείγματα από μελισσοκόμους που τα έστειλαν στο εργαστήριο για μικροσκοπική εξέταση.

### **Υλικά**

Τα απαιτούμενα υλικά είναι τα εξής:

- I. Δείγματα μελισσών (τουλάχιστον 25 μέλισσες/δείγμα)
- II. Οπτικό μικροσκόπιο με μεγέθυνση 400X
- III. Αντικειμενοφόρος πλάκα
- IV. Καλυπτρίδα
- V. Γουδί - γουδοχέρι
- VI. Λαβίδα
- VII. Υδροβολέας
- VIII. Κινητό τηλέφωνο Alcatel Pop 4S

### **Μεθοδολογία**

#### **Δειγματοληψία στα πλαίσια της πειραματικής διαδικασίας**

Όπως αναφέρθηκε και στην «**Εργαστηριακή Διάγνωση**», η μέθοδος δειγματοληψίας που υιοθετήθηκε ήταν η συλλογή 10 μελισσών από κάθε κηρήθρα του μελισσιού, αλλά και η συλλογή

ικανοποιητικού αριθμού ατόμων (περίπου 20) από την είσοδο της κυψέλης. Λήφθηκαν υπόψιν οι βιβλιογραφικές αναφορές (Reuter & Spivak, 2019; Γκόρας, 2020; Randy, 2021), τόσο για το ότι δεν πρέπει να συλλέγονται μέλισσες από την περιοχή του γόνου (λόγω του ότι θα είναι μικρότερης ηλικίας, επομένως μικρότερο φορτίο *Nosema spp.* ή και καθόλου), όσο και να μην συλλέγονται μέλισσες μόνο μεγαλύτερης ηλικίας, (διότι θα είναι παραπλανητικό το αποτέλεσμα, καθώς μόνο μεγάλες προσβολές θα προκύψουν στη μικροσκοπική εξέταση). Όμως στην συγκεκριμένη μελέτη δεν δημιουργήθηκε κάποιο δίλλημα, διότι ο σκοπός ήταν να βρεθούν όλοι οι βαθμοί προσβολής, επομένως συμπεριλήφθηκε σχεδόν όλο το εύρος ηλικιών των μελισσών. Συνεπώς, ο ελάχιστος αριθμός του δείγματος οριοθετήθηκε στις 30 μέλισσες, ενώ το μέγιστο εξαρτώνταν από τον αριθμό των κηρηθρών που υπήρχε σε κάθε μέλισσι, όπου κυμαίνονταν από 50-100 μέλισσες ανά κυψέλη.

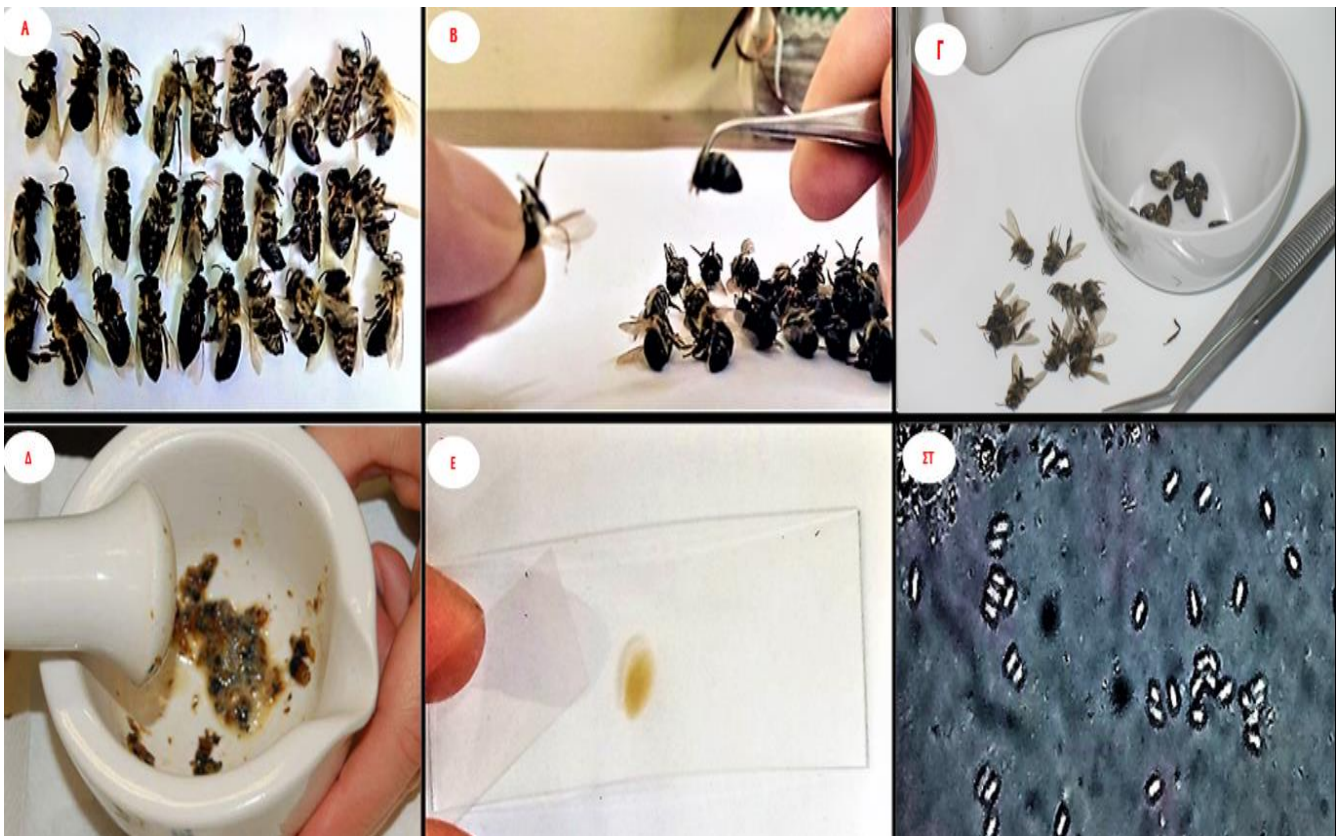
Ο χώρος που έγινε η δειγματοληψία (όπως αναφέρθηκε και στην «**Διεξαγωγή μελέτης**») ήταν στο μελισσοκομείο του εργαστηρίου Σηροτροφίας & Μελισσοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Επίσης, ζητήθηκε από τους μελισσοκόμους που είχαν σκοπό να στείλουν δείγματα για μικροσκοπική εξέταση στο εργαστήριο Σηροτροφίας & Μελισσοκομίας του Γ.Π.Α., να ακολουθήσουν την ίδια μέθοδο δειγματοληψίας, ώστε να ακολουθηθεί η διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων. Ο σκοπός ήταν να μην υπάρχουν μόνο τα δείγματα του εργαστηρίου του Γ.Π.Α. για την διεξαγωγή της έρευνας, όπου πιθανότατα να μην υπήρχαν στο συγκεκριμένο μελισσοκομείο όλοι οι βαθμοί προσβολής. Γι' αυτό το λόγο προτιμήθηκαν και δείγματα μελισσοκόμων από διάφορες περιοχές της Ελλάδας (Βόρεια & Νότια Ελλάδα), όπου ήταν μεγαλύτερη η πιθανότητα παρουσίας διαφορετικών βαθμών προσβολής.

### **Προετοιμασία δειγμάτων**

Για να υπολογιστεί ο βαθμός προσβολής από Νοσεμίαση (**Εικόνα 23** & **Εικόνα 24**) χρησιμοποιήθηκε δείγμα μελισσών. Το δείγμα αρχικά, τοποθετήθηκε σε πλαστικό δοχείο και ύστερα αποθηκεύτηκε σε ψυκτικό θάλαμο στους  $-20^{\circ}\text{C}$ , με σκοπό να θανατωθούν οι μέλισσες. Στην συνέχεια σε 30 από τις μέλισσες αυτές, αρχικά απομακρύνονταν οι κοιλίες με την χρήση λαβίδας και τοποθετήθηκαν σε γουδί, όπου με υδροβολέα έγινε προσθήκη μιας σταγόνας απιονισμένου νερού για κάθε κοιλία και έπειτα πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση του διαλύματος (Reuter & Spivak, 2019). Το τελικό διάλυμα του κάθε δείγματος ελεγχόταν σε μικροσκόπιο (**Εικόνα 25**) με μεγέθυνση 400X με τη χρήση απλής αντικειμενοφόρου πλάκας, όπου είχε χορηγηθεί μικρή ποσότητα δείγματος καλυμμένη με καλυπτρίδα.



Εικόνα 23: Υλικά: Α) Γουδί, Β) Υδροβολέας, Γ) Δείγματα μελισσών σε πλαστικό δοχείο, Δ) Λαβίδα.



Εικόνα 24: Μεθοδολογία: Α) δείγματα 30 μελισσών, Β) απομάκρυνση κοιλίας από κάθε μέλισσα, Γ) τοποθέτηση κοιλιών στο γουδί, Δ) ομογενοποίηση του διαλύματος ύστερα από χορήγηση απιονισμένου νερού, Ε) τοποθέτηση μικρής ποσότητας διαλύματος σε αντικειμενοφόρο πλάκα, όπου καλύπτεται με καλυπτρίδα, ΣΤ) τροποποιημένη φωτογραφία αποτελέσματος από φορητή συσκευή σε οπτικό μικροσκόπιο με ρυθμισμένη μεγέθυνση 400X.



Εικόνα 25: Οπτικό μικροσκόπιο Olympus CX31

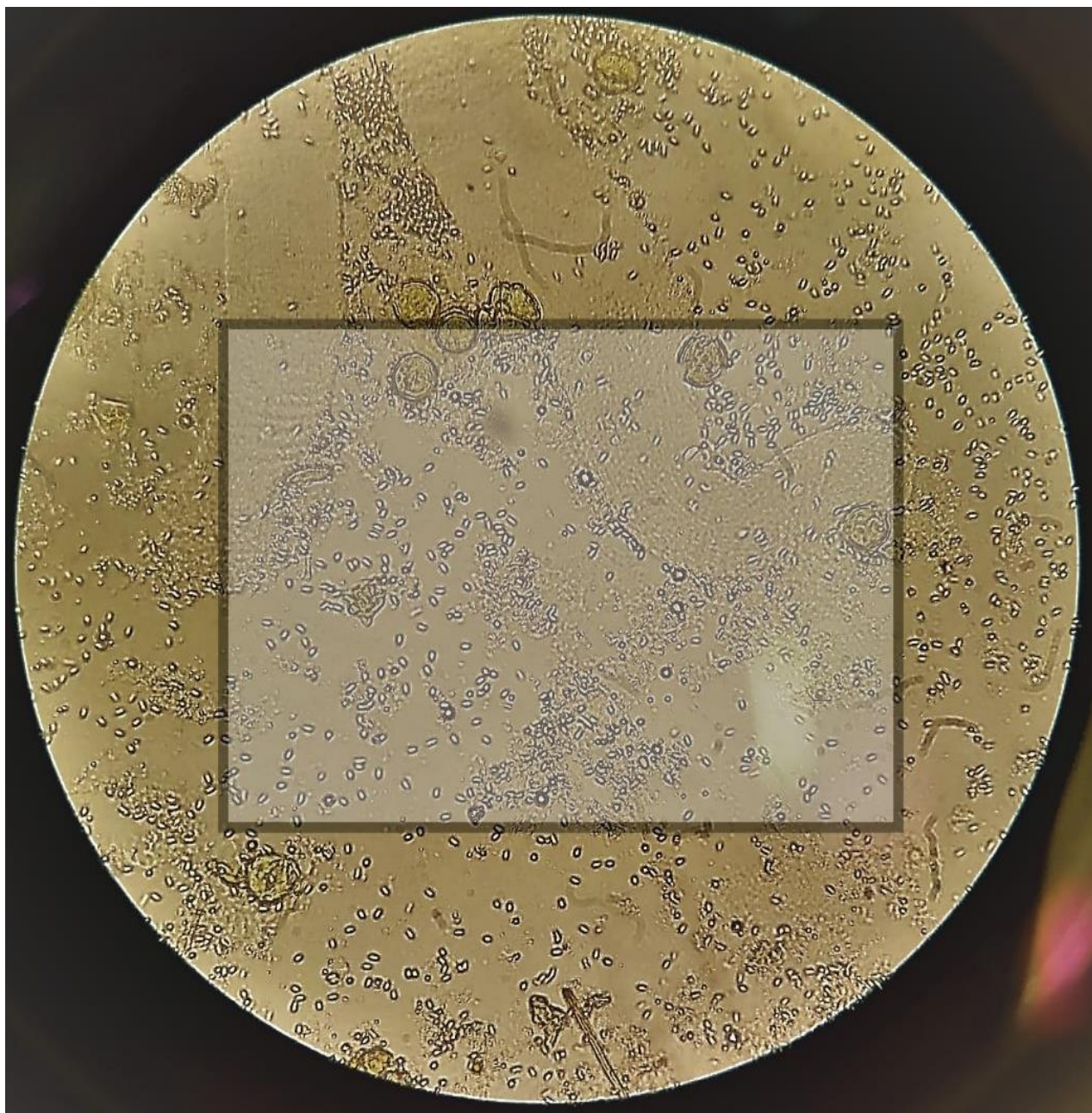
### Επιλογή μεθόδου για τη λήψη φωτογραφίας των δειγμάτων

Όσον αφορά τη φωτογράφιση των δειγμάτων, αξίζει να αναφερθεί ότι αρχικά πραγματοποιήθηκε προσπάθεια λήψης των εικόνων των σπορίων μέσω του λογισμικού προγράμματος LUMENERA Infinity 1, που διαθέτει το μικροσκόπιο του εργαστηρίου Σηροτροφίας και Μελισσοκομίας του Γ.Π.Α. Παρ' όλα αυτά, παρουσιάστηκε πρόβλημα στην αποτύπωση με φωτογράφιση των εικόνων (real time) που παρατηρεί ο ερευνητής απευθείας από το μικροσκόπιο. Ειδικότερα, το πρόβλημα εστιάζεται στο γεγονός ότι με τη χρήση του LUMENERA Infinity 1, έχει συγκεκριμένη οριοθέτηση του οπτικού πεδίου και περιορίζει αυτό που πραγματικά παρατηρείται στο οπτικό μικροσκόπιο (Εικόνα 26).

Συμπερασματικά, απορρίπτεται η χρήση του συγκεκριμένου λογισμικού, καθώς η εικόνα που συλλέγεται δεν θεωρείται αντιπροσωπευτική όλου του παρασκευάσματος, διότι δεν συμπεριλαμβάνονται όλα τα σπόρια που κανονικά θα παρατηρούσε ο ερευνητής στο μικροσκόπιο, λόγω της «περικοπής» που έχει υλοποιηθεί από το πρόγραμμα. Για παράδειγμα, εφόσον ο σκοπός της μελέτης είναι οι φωτογραφίες να είναι όσο πιο κοντά γίνεται με την πραγματική οπτική παρατήρηση στο μικροσκόπιο, αυτό δεν θα μπορούσε να γίνει αν χρησιμοποιούνταν το λογισμικό πρόγραμμα LUMENERA Infinity 1. Αυτό αποδεικνύεται από τον ίδιο τον συγγραφέα, καθώς όπως φαίνεται και στην Εικόνα 26 η λήψη φωτογραφίας από το κινητό είναι πιο κοντά σε αυτό που βλέπει ο ερευνητής στη μικροσκοπική εξέταση (όπου είναι όλη η εικόνα), συγκριτικά με το ορθογώνιο παραλληλεπίπεδο

(αφορά το λογισμικό πρόγραμμα) που έχει κατά προσέγγιση οριοθετηθεί σχηματικά, μέσω επεξεργασίας της εικόνας με την εφαρμογή «Ζωγραφική 3D» των Microsoft Windows 10 Professional.

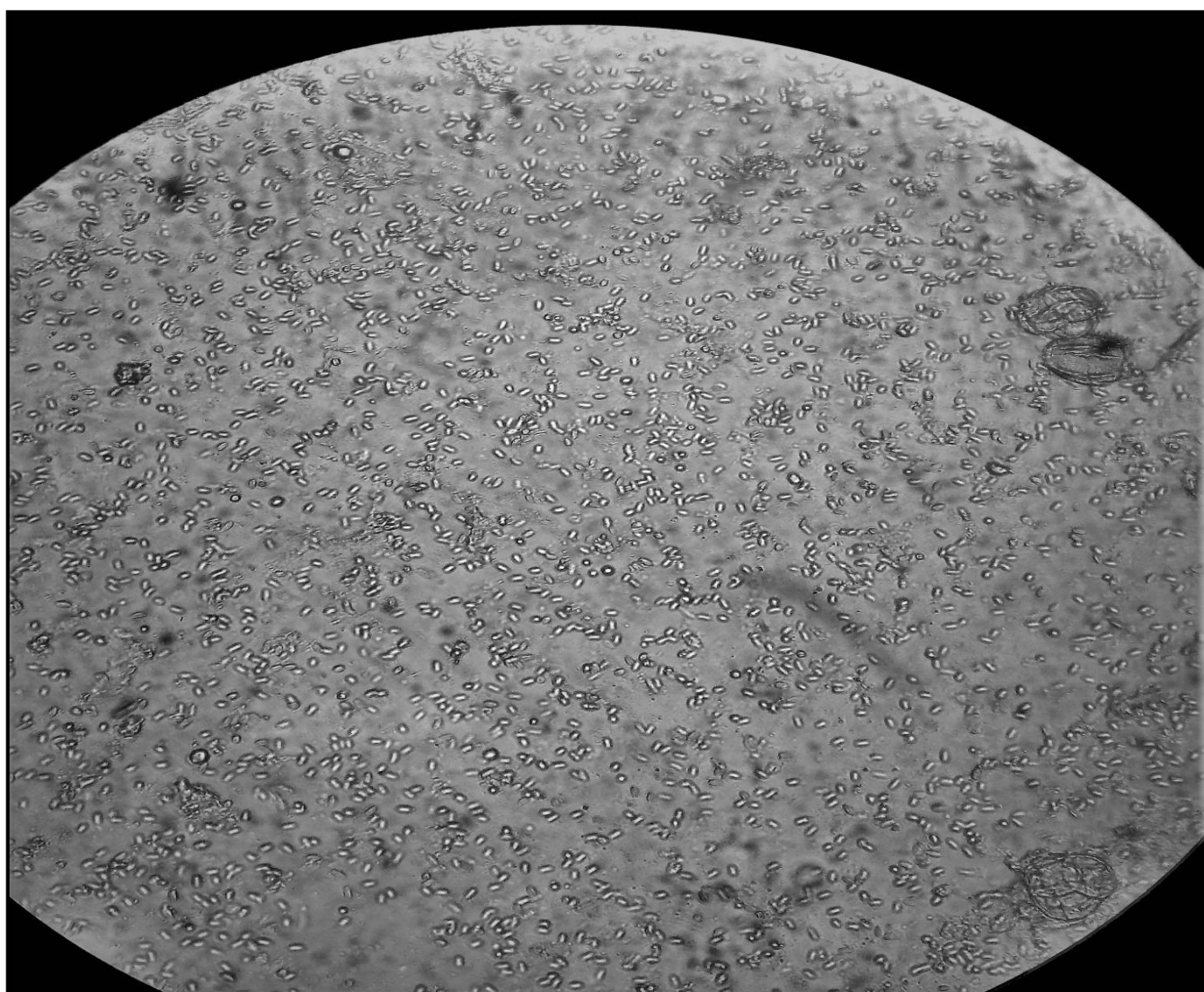
Επομένως, αποφασίστηκε σαν μέθοδος λήψης φωτογραφίας των παρασκευασμάτων, η φορητή συσκευή, συγκεκριμένα το κινητό Alcatel Pop 4S (με ανάλυση κάμερας 13 MP) (**Εικόνα 27**). Στην περίπτωση που δεν εντοπίζονταν σπόρια Νοσεμίας, λαμβάνονταν τρεις φωτογραφίες, ενώ στην περίπτωση που υπήρχε ακόμα και μικρή προσβολή, φωτογραφίζονταν πέντε διαφορετικά σημεία του παρασκευάσματος (δείγμα σε αντικειμενοφόρο πλάκα) (**Εικόνα 28**).



**Εικόνα 26:** Σύγκριση λήψης φωτογραφίας από φορητή συσκευή (κινητό) με το λογισμικό πρόγραμμα LUMENERA Infinity 1. Στη συγκεκριμένη εικόνα φαίνεται όλο το οπτικό πεδίο σε real time, δηλαδή αυτό που βλέπει ο ερευνητής στο μικροσκόπιο που έχει ληφθεί με το κινητό, ενώ με τη χρήση του LUMENERA Infinity 1, έχει συγκεκριμένη οριοθέτηση, όπως φαίνεται και στο σχήμα με ορθογώνιο παραλληλεπίπεδο.



Εικόνα 27 : Κινητό τηλέφωνο Alcatel Pop 4S (μπροστινή και πίσω όψη)



Εικόνα 28: Απεικόνιση από την λήψη φωτογραφίας μέσω κινητού τηλεφώνου

## Εγκυρότητα της μεθόδου

Η διαδικασία λήψης όπως αναφέρθηκε προηγουμένως ήταν μέσω μιας φορητής συσκευής (κινητό), διότι παρατηρήθηκε να απεικονίζει την εικόνα που βλέπει το «ανθρώπινο μάτι» στο προσοφθάλμιο του μικροσκοπίου. Όμως, είναι ορθό να ελεγχθεί η πιθανότητα, μήπως ο αριθμός σπορίων από τη λήψη της φωτογραφίας διαφέρει σημαντικά από την απευθείας μέτρηση στο μικροσκόπιο. Είναι σημαντικό να ξεκαθαριστεί αυτό το ενδεχόμενο για να οριστεί ως αντικειμενική μέθοδος η χρήση φορητής συσκευής για την φωτογράφιση παρασκευασμάτων. Συνεπώς ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων και μικροσκοπικής εξέτασης ξεχωριστά από τα παρασκευάσματα που επρόκειτο να χορηγηθούν οι φωτογραφίες στο ερωτηματολόγιο. Ειδικότερα λήφθηκε ένας συγκεκριμένος αριθμός δειγμάτων μελισσών (με ελάχιστο 30 μέλισσες), έπειτα πραγματοποιήθηκε αφαίρεση κοιλίων και λειοτρίβηση σε γουδί πορσελάνης και τέλος μεταφέρθηκε μια ποσότητα εναιωρήματος σε μια απλή αντικειμενοφόρο πλάκα. Επομένως, για την εξακρίβωση της εγκυρότητας της μεθόδου, συγκεκριμένα την αντικειμενική απεικόνιση του οπτικού μικροσκοπίου σε σχέση με τη λήψη της φωτογραφίας από φορητή συσκευή, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- 1) αφού πρώτα λήφθηκε η φωτογραφία στο μικροσκόπιο σε ένα τυχαίο σημείο του παρασκευάσματος,
- 2) μετρήθηκαν τα σπόρια στο μικροσκόπιο κατά προσέγγιση.
- 3) στην συνέχεια τυπώθηκε η φωτογραφία και μετρήθηκαν εξίσου τα σπόρια.

## Διαδικασία δημιουργίας ερωτηματολογίου

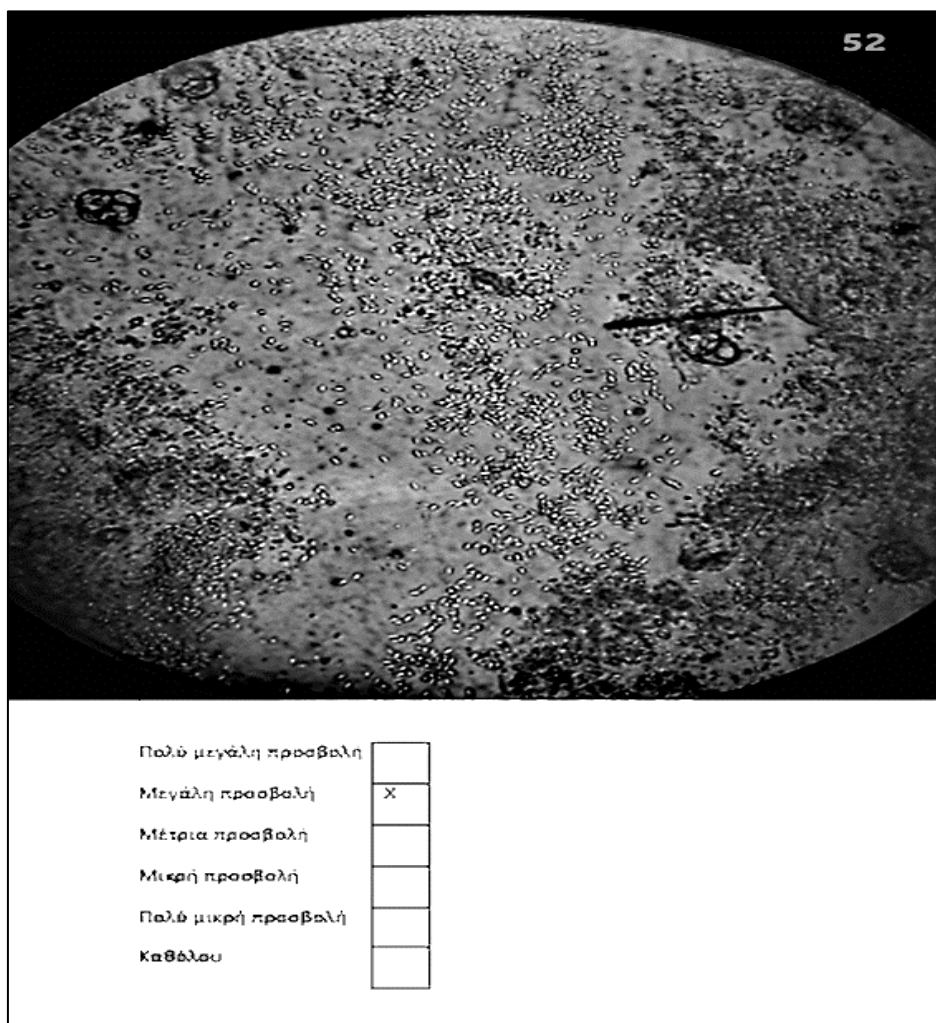
Συνολικά, δημιουργήθηκαν 102 παρασκευάσματα, και λήφθηκαν 536 φωτογραφίες, από τις οποίες οι 200 επιλέχθηκαν για να σταλθούν σε μορφή ερωτηματολογίου (**Εικόνα 29**) σε 12 αξιολογητές-ερευνητές, προκειμένου να παρατηρηθεί αν υπάρχουν διαφορές στην αξιολόγηση σε κάθε φωτογραφία. Η διαδικασία δημιουργίας του ερωτηματολογίου είχε ως εξής:

1. εφόσον λήφθηκαν οι φωτογραφίες με τη φορητή συσκευή,
2. έπειτα αποθηκεύτηκαν ως αρχείο “.JPG” σε φορητό υπολογιστή, όπου πρώτα επεξεργάστηκαν με την εφαρμογή «Ζωγραφική 3D» για την αρίθμηση της κάθε εικόνας.
3. ύστερα, οι επεξεργασμένες εικόνες χορηγήθηκαν σε αρχείο Κειμένου Word,
4. στο κείμενο Word έγινε εισαγωγή πίνακα, όπου η κάθετη στήλη αριστερά αφορά τους βαθμούς προσβολής και η δεξιά κάθετη στήλη αφορά την αξιολόγηση που δόθηκε από τους ερευνητές με το σύμβολο «X» (**Εικόνα 29**),



5. στο σύνολο υπήρχαν 200 εικόνες μέσα στο ερωτηματολόγιο.
6. στη συνέχεια το υλικό αποστάλθηκε στους αξιολογητές

Χρειάζεται να αναφερθεί πως τόσο η «Ζωγραφική 3D», όσο και το Κείμενο Word, ήταν και οι δύο εφαρμογές των Microsoft Windows 10 Professional. Επίσης, ο αριθμός των βαθμών προσβολής που δόθηκε σαν επιλογή στους αξιολογητές ήταν: α) Καθόλου, β) Πολύ μικρή, γ) Μικρή, δ) Μέτρια, ε) Μεγάλη, στ) Πολύ μεγάλη προσβολή.



**Εικόνα 29:** Παράδειγμα ερωτηματολογίου προς αξιολόγηση

### Προφίλ αξιολογητών

Στην συνέχεια, το ερωτηματολόγιο που δημιουργήθηκε με τις φωτογραφίες των βαθμών προσβολής, εστάλησαν σε αξιολογητές-ερευνητές, όπου διαθέτουν εμπειρία στην παθολογία της μέλισσας και είναι γνώστες του αντικειμένου, καθώς το ακαδημαϊκό και ερευνητικό προφίλ των αξιολογητών ήταν: Ομότιμοι Καθηγητές, Καθηγητές, Επίκουροι Καθηγητές, Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό,

Διδάκτορες και υποψήφιοι Διδάκτορες Ελληνικών Πανεπιστημίων και τέλος μέχρι και Ερευνητές αξιολογών ινστιτούτων πάντα σχετιζόμενοι με τον Κλάδο της Μελισσοκομίας.

Συγκεκριμένα, τα Ελληνικά Πανεπιστήμια και Ινστιτούτα ήταν: εργαστήριο Σηροτροφίας & Μελισσοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, εργαστήριο Γεωργικής Φαρμακολογίας του Γ.Π.Α., εργαστήριο Μελισσοκομίας & Σηροτροφίας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και το Εργαστήριο Μελισσοκομίας του Ινστιτούτου Μεσογειακών και Δασικών Οικοσυστημάτων. Είναι κατανοητό, ότι η επιλογή εξειδικευμένων ατόμων για την αξιολόγηση των βαθμών προσβολής στα ερωτηματολόγια, αφενός επιτυγχάνει τον σκοπό της μελέτης, δηλαδή να υπάρξει μια απεικόνιση πραγματικών συνθηκών, όπου θα συνυπάρχουν ίδιες ή διαφορετικές απόψεις ερευνητών απέναντι σε ένα επιστημονικό θέμα και αφετέρου δίνει την επιστημονική βάση και το κύρος που χρειάζεται η Διπλωματική μελέτη. Άλλωστε το σύνολο των συγκεκριμένων ερευνητών είναι και αυτό που σε τακτική βάση εξετάζει αντίστοιχα δείγματα μελισσών καλούμενο να ορίσει τον βαθμό προσβολής προς ενημέρωση του κάθε ενδιαφερόμενου μελισσοκόμου.

### **Εγκυρότητα αξιολογήσεων**

Είναι ωφέλιμο να αναφερθεί ότι σκοπό αποτελεί να μελετηθεί όχι μόνο η διακρίβωση της μεθόδου μέσω της φωτογράφισης από φορητή συσκευή, αλλά και η αντικειμενικότητα των αξιολογήσεων, ώστε να είναι αξιόπιστη όλη η παρουσίαση των αποτελεσμάτων. Ο τρόπος για να ελεγχθεί η εγκυρότητα της οπτικής παρατήρησης των αξιολογητών στο ερωτηματολόγιο με τις φωτογραφίες που τους δόθηκαν ήταν:

- a) επιλέχθηκαν 16 εικόνες, που κατά τον συγγραφέα ο βαθμός προσβολής κυμαινόταν από Μικρή, Μέτρια και Μεγάλη προσβολή,
- b) η κάθε φωτογραφία αντιγράφηκε δύο φορές και ύστερα χορηγήθηκαν όλες (σύνολο 32 εικόνων διασκορπισμένα τυχαία μέσα στο ερωτηματολόγιο), με σκοπό να παρατηρηθούν πιθανές διαφορές στις αξιολογήσεις από τον κάθε αξιολογητή ξεχωριστά.

Συγκεκριμένα στην αρίθμηση b), έγινε χρήση της εφαρμογής «Ζωγραφική 3D» των Microsoft Windows 10 Professional. για να γίνει περιστροφή των αντιγραμμένων εικόνων, καθώς και παραπάνω επεξεργασία για να δημιουργηθεί «σύγχυση» στους αξιολογητές και να μην καταλάβουν ότι πρόκειται για τις ίδιες φωτογραφίες.

## Επεξεργασία δεδομένων

Όταν λήφθηκαν οι απαντήσεις των αξιολογητών, στη συνέχεια, μετρήθηκε ο αριθμός των σπορίων για κάθε εικόνα που χρησιμοποιήθηκε στο ερωτηματολόγιο. Η διαδικασία ήταν η εξής: 1) εκτυπώθηκαν όλες οι εικόνες μέσω του εκτυπωτή HP Color LaserJet M479fdw και 2) με υπογραμμιστικό Textliner μετριόταν το κάθε σπόριο.

Ύστερα, όσον αφορά την επεξεργασία δεδομένων, οι τελικές απαντήσεις των βαθμών προσβολής και ο αριθμός των σπορίων *Nosema spp*, αρχειοθετήθηκαν σε μορφή excel. Χρειάζεται να σημειωθεί, πως πραγματοποιήθηκε ομαδοποίηση των δεδομένων αναλόγως των δύο διαφορετικών περιπτώσεων, όπου μελετήθηκαν, αναφορικά με τους διαφορετικούς βαθμούς προσβολής, οι οποίες είναι:

I. **Έξι βαθμοί προσβολής:** σε αυτή την περίπτωση, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, δόθηκε σε μορφή ερωτηματολογίου για να αξιολογηθούν οι βαθμοί προσβολής:

- 1) Καθόλου.
- 2) Πολύ μικρή προσβολή.
- 3) Μικρή προσβολή.
- 4) Μέτρια προσβολή.
- 5) Μεγάλη προσβολή .
- 6) Πολύ μεγάλη προσβολή.

Ο σκοπός ήταν να μελετηθούν όλα τα πιθανά επίπεδα προσβολής, πέραν από τα ήδη υπάρχοντα που από ορισμένα εργαστήρια ελέγχου χρησιμοποιούνται και συμβολίζονται ως εξής: + (Μικρή προσβολή), ++ (Μέτρια προσβολή), +++ (Μεγάλη προσβολή) (Πίνακας 2) (Cantwell, 1970).

II. **Τέσσερις βαθμοί προσβολής:** σε αυτή την περίπτωση επεξεργάστηκαν οι ήδη υπάρχουσες αξιολογήσεις συγκριτικά με την πρώτη περίπτωση, όπου συγχωνεύτηκε η «Πολύ μικρή προσβολή» με την «Μικρή προσβολή», καθώς επίσης η «Πολύ Μεγάλη προσβολή» με τη «Μεγάλη προσβολή», συνεπώς μελετήθηκαν οι εξής βαθμοί προσβολής:

1. Καθόλου.
2. Μικρή προσβολή.
3. Μέτρια προσβολή.
4. Μεγάλη προσβολή.

Ο σκοπός ήταν να συγκριθούν οι πιθανές αλλαγές με την περίπτωση των έξι βαθμίδων προσβολής.

## Μέθοδοι προσέγγισης δεδομένων

Η κάθε αξιολόγηση προσεγγίστηκε με δύο διαφορετικούς μεθόδους:

## 1. Πλειοψηφία των αξιολογήσεων (Majority of Ratings-MR):

Ο τελικός βαθμός προσβολής για κάθε εικόνα έγινε βάση της πλειοψηφίας των αξιολογήσεων που αυτή έλαβε. Με λίγα λόγια, σε αυτή τη προσέγγιση, πραγματοποιήθηκε ομαδοποίηση των βαθμών προσβολής, όπου η τελική αξιολόγηση των φωτογραφιών έγινε σύμφωνα με την επικράτηση των περισσότερων απόψεων. Στη μέθοδο αυτή, υπήρχαν και περιπτώσεις ισοψηφίας ορισμένες φορές, όπως είναι αναμενόμενο.

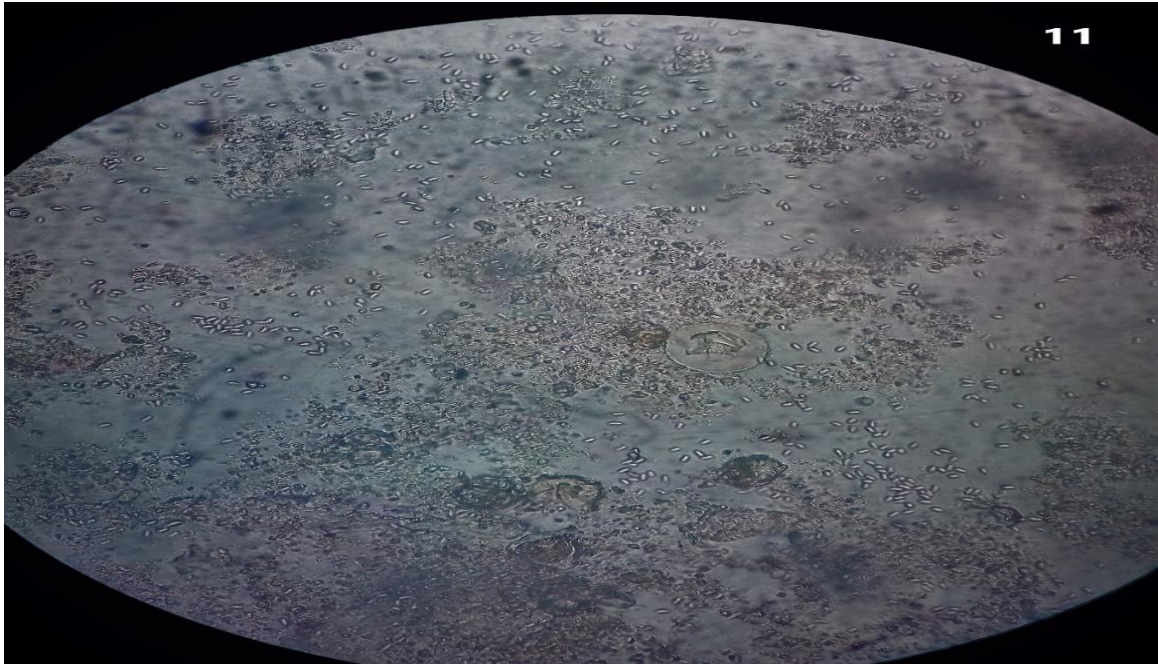
Για παράδειγμα, στο ερωτηματολόγιο αξιολογήθηκε η Εικόνα 11 (**Εικόνα 30**), όπου οι επτά από τους δώδεκα αξιολογητές θεώρησαν ότι είναι Μέτρια προσβολή (**Πίνακας 3**). Στην περίπτωση που υπήρχε αποτέλεσμα ισοψηφίας, όπως για παράδειγμα στην εικόνα 12 του ερωτηματολογίου (**Εικόνα 31**), όπου οι έξι αξιολογητές θεώρησαν ότι είναι «Μεγάλη προσβολή» και οι υπόλοιποι έξι ότι είναι «Πολύ μεγάλη προσβολή», η καταχώρηση για την περίπτωση αυτή ήταν διπλή και περιελάμβανε και τις δύο κατατάξεις. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα, το αποτέλεσμα καταχωρούνταν ως Μεγάλη- Πολύ μεγάλη προσβολή (**Πίνακας 3**).

## 2. Μέσος όρος των αξιολογήσεων (Average of Ratings-AR):

Σε αυτή την προσέγγιση, ο τελικός βαθμός προσβολής που λήφθηκε για κάθε εικόνα, έγινε βάση του μέσου όρου των αξιολογήσεων. Συγκριτικά με την πλειοψηφία, στον μέσο όρο αξιολογήσεων δύναται να πραγματοποιηθεί ομαδοποίηση των βαθμών προσβολής, χωρίς να υπάρχουν περιπτώσεις ισοψηφίας, όπου θεωρείται πλεονέκτημα. Η διαδικασία ήταν να γίνει αρχικά κωδικοποίηση όλων των αξιολογήσεων, όπου για την περίπτωση με τους έξι βαθμούς προσβολής ήταν: 1=Καθόλου, 2=Πολύ μικρή προσβολή, 3=Μικρή προσβολή, 4=Μέτρια προσβολή, 5=Μεγάλη προσβολή και 6=Πολύ μεγάλη προσβολή. Αντίθετα για την περίπτωση που ήταν τέσσερις βαθμοί προσβολής η κωδικοποίηση ήταν η εξής: 1=Καθόλου, 2=Μικρή προσβολή, 3=Μέτρια προσβολή, 4=Μεγάλη προσβολή. Στη συνέχεια βρέθηκε ο μέσος όρος των αξιολογήσεων, με τη βοήθεια του τύπου Average στην εφαρμογή υπολογιστικού φύλλου Excel Office Microsoft Windows 10 Professional, ύστερα έγινε στρογγυλοποίηση του μέσου όρου και τέλος ο αριθμός που προέκυψε, έδωσε και την τελική αξιολόγηση, σύμφωνα με τον κωδικό που ορίστηκε προηγουμένως.

Για παράδειγμα, στο ερωτηματολόγιο αξιολογήθηκαν οι εικόνες 11 & 12, (**Εικόνα 30 & Εικόνα 31**), έχοντας κωδικοποιήσει τις προσβολές, έγινε εύρεση του μέσου όρου των κωδικοποιημένων αριθμών, όπου με στρογγυλοποίησή του εξάγεται το τελικό αποτέλεσμα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση (**Πίνακας 4**), ο μέσος όρος των αξιολογήσεων της Εικόνας 11 του ερωτηματολογίου είναι 4,41667 όπου με στρογγυλοποίηση είναι 4, άρα με την κωδικοποίηση που αναφέρθηκε προηγουμένως είναι μέτρια προσβολή. Αντίστοιχα και στην εικόνα 12 στον ίδιο πίνακα, ο μέσος όρος είναι 5,5, όπου γίνεται 6 με την στρογγυλοποίηση, επομένως «Πολύ μεγάλη προσβολή». Στην τελευταία περίπτωση

παρατηρείται απόλυτη ομαδοποίηση της προσβολής χωρίς τον περιορισμό που προκύπτει στις περιπτώσεις της πλειοψηφίας (MR) (Πίνακας 3).



**Εικόνα 30:** Παράδειγμα εικόνας για την κατανόηση των στατιστικών προσεγγίσεων MR & AR. Σε αυτή την περίπτωση υπήρχαν 12 αξιολογητές που μέσω του ερωτηματολογίου ερωτήθηκαν για το τι βαθμό προσβολής θεωρούσαν ότι είναι η συγκεκριμένη εικόνα. Οι επτά θεώρησαν ότι είναι «Μέτρια προσβολή» και οι υπόλοιποι πέντε θεώρησαν ότι είναι «Μεγάλη προσβολή».



**Εικόνα 31:** Παράδειγμα εικόνας για την κατανόηση των στατιστικών προσεγγίσεων MR & AR. Σε αυτή την περίπτωση υπήρχαν 12 αξιολογητές που μέσω του ερωτηματολογίου ερωτήθηκαν για το τι βαθμό προσβολής θεωρούσαν ότι είναι η

συγκεκριμένη εικόνα. Οι έξι θεώρησαν ότι είναι «Μεγάλη προσβολή», και οι υπόλοιποι έξι θεώρησαν ότι είναι «Πολύ μεγάλη προσβολή».

**Πίνακας 3:** Παράδειγμα κατανόησης της πλειοψηφίας των αξιολογήσεων (MR).

	<b>Εικόνα 11</b>	<b>Εικόνα 12</b>
<b>Αξιολογητής 1</b>	<b>4</b>	5
<b>Αξιολογητής 2</b>	<b>4</b>	5
<b>Αξιολογητής 3</b>	<b>4</b>	<b>6</b>
<b>Αξιολογητής 4</b>	5	<b>6</b>
<b>Αξιολογητής 5</b>	5	<b>6</b>
<b>Αξιολογητής 6</b>	<b>4</b>	5
<b>Αξιολογητής 7</b>	<b>4</b>	5
<b>Αξιολογητής 8</b>	<b>4</b>	<b>6</b>
<b>Αξιολογητής 9</b>	5	<b>6</b>
<b>Αξιολογητής 10</b>	5	5
<b>Αξιολογητής 11</b>	5	<b>6</b>
<b>Αξιολογητής 12</b>	<b>4</b>	5
<b>Πλειοψηφία</b>	Μέτρια προσβολή	Μεγάλη-Πολύ μεγάλη προσβολή

4= ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ, 5= ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ, 6= ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ

**Πίνακας 4:** Παράδειγμα κατανόησης του μέσου όρου των αξιολογήσεων (AR).

	<b>Εικόνα 11</b>	<b>Εικόνα 12</b>
<b>Αξιολογητής 1</b>	4	<b>5</b>
<b>Αξιολογητής 2</b>	4	<b>5</b>
<b>Αξιολογητής 3</b>	4	6
<b>Αξιολογητής 4</b>	5	6
<b>Αξιολογητής 5</b>	5	6
<b>Αξιολογητής 6</b>	4	5
<b>Αξιολογητής 7</b>	4	5
<b>Αξιολογητής 8</b>	4	6
<b>Αξιολογητής 9</b>	5	6
<b>Αξιολογητής 10</b>	5	5
<b>Αξιολογητής 11</b>	5	6
<b>Αξιολογητής 12</b>	4	5
<b>Μέσος όρος</b>	4,41667	5,5
<b>Στρογγυλοποίηση Μέσου όρου</b>	<b>4</b>	<b>6</b>
<b>Αποτέλεσμα αξιολόγησης</b>	Μέτρια προσβολή	Πολύ μεγάλη προσβολή

4= ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ, 5= ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ, 6= ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ

Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα, η διαδικασία με την οποία επεξεργάστηκαν τα δεδομένα ήταν η εξής: μετά τη λήψη των αξιολογήσεων από τα ερωτηματολόγια και τις μετρήσεις σπορίων, το επόμενο βήμα ήταν η ομαδοποίηση των κατηγοριών προσβολής τόσο με τη μέθοδο **MR** (Majority of Ratings-Πλειοψηφία των Αξιολογήσεων), όσο και με τη μέθοδο **AR** (Average of Ratings-Μέσος όρος των Αξιολογήσεων) με τη χρήση των υπολογιστικών φύλλων Excel των Microsoft Office Windows 10 Professional. Επίσης, η ομαδοποίηση πραγματοποιήθηκε και στις δύο περιπτώσεις, δηλαδή και στις έξι, αλλά και στις τέσσερις βαθμίδες προσβολής από Νοσεμίαση.

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

### **Στατιστική ανάλυση**

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος IBM SPSS Statistics Ver. 21, συγκεκριμένα με τη στατιστική μέθοδο του Independent Samples T-test (T-test ανεξάρτητων μεταβλητών). Ο σκοπός ήταν η σύγκριση των δύο μεθόδων προσέγγισης των αποτελεσμάτων, όπου είναι η πλειοψηφική μέθοδος (**MR**) & ο κατά μέσος όρος μέθοδος (**AR**), τόσο για την περίπτωση των έξι βαθμίδων, όσο και των τεσσάρων βαθμίδων προσβολής.

### **Πρωτογενή αποτελέσματα**

#### **Διακρίβωση μεθόδου**

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως στο υποκεφάλαιο «**Εγκυρότητα της μεθόδου**», απαραίτητη είναι η διακρίβωση της μεθόδου. Του ελέγχου δηλαδή ταύτισης του αριθμού σπορίων Νοσεμίασης όπως προκύπτει στην φωτογράφιση με τον τρόπο που επιλέχθηκε και του αριθμού σπορίων που καταμετρώνται την ίδια στιγμή με την παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Τα αποτελέσματα δίνονται στους **Πίνακες 5, 6 & 7**.

Όπως φαίνεται από τους ανωτέρω πίνακες (**Πίνακες 5, 6 & 7**), ο αριθμός των σπορίων στην εικόνα που λήφθηκε και στάλθηκε ως ερωτηματολόγιο στους αξιολογητές, ήταν χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές, με τον αριθμό των σπορίων που θα παρατηρούσε ένας ερευνητής στο οπτικό μικροσκόπιο και άρα θα λάμβανε υπόψιν του. Ειδικότερα, είναι πλέον κατανοητό, ότι μέσω της φωτογράφισης από φορητή συσκευή, δημιουργείται η αίσθηση στους αξιολογητές ότι βρίσκονται μπροστά στο

μικροσκόπιο (real time) και εφόσον δεν υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ μικροσκοπίου και φωτογραφίας, δύναται να προσεγγίσουν ακριβώς τον βαθμό προσβολής

**Πίνακας 5:** Διακρίβωση μεθόδου για την υποκειμενικά θεωρούμενη «Μεγάλη προσβολή»

Αριθμός εικόνων	Μεγάλη προσβολή	
	Αριθμός спорίων στο μικροσκόπιο	Αριθμός спорίων στη φωτογραφία
1	500	326
2	589	557
3	609	642
4	709	684
5	801	779
6	810	843
7	861	977
8	1218	1196
<b>Mean</b>	762,13 <sup>a*</sup>	750,50 <sup>a</sup>
<b>Std. Deviation (s)</b>	222,4	265,4
<b>CV%</b>	29,2	35,4
<b>Εύρος</b>	500-1218	326-1196

\*: όπου διαφορετικό λατινικό γράμμα, υπάρχουν σημαντικά στατιστικές διαφορές, σύμφωνα με τον έλεγχο t (t-test) ( $p=0,702$ ,  $t=0,399$ ), s= Τυπική Απόκλιση, CV= Συντελεστής Παραλλακτικότητας %.

**Πίνακας 6:** Διακρίβωση μεθόδου για την υποκειμενικά θεωρούμενη «Μέτρια προσβολή»

Αριθμός εικόνων	Μέτρια προσβολή	
	Αριθμός спорίων στο μικροσκόπιο	Αριθμός спорίων στη φωτογραφία
1	214	228
2	289	270
3	490	479
4	305	323
5	350	423
6	203	158
7	168	274
8	159	264
<b>Mean</b>	272,25 <sup>a*</sup>	302,38 <sup>a</sup>
<b>Std. Deviation (s)</b>	111,3	104,1
<b>CV%</b>	40,9	34,4
<b>Εύρος</b>	159-490	158-479

\*: όπου διαφορετικό λατινικό γράμμα, υπάρχουν σημαντικά στατιστικές διαφορές, σύμφωνα με το Independent Samples T-test (όπου  $p=0,184$ ,  $t=-1,475$ ). s= Τυπική Απόκλιση, CV= Συντελεστής Παραλλακτικότητας %.



**Πίνακας 7:** Διακρίβωση μεθόδου για την υποκειμενικά θεωρούμενη «Μικρή προσβολή»

Αριθμός εικόνων	Μικρή προσβολή	
	Αριθμός σπορίων στο μικροσκόπιο	Αριθμός σπορίων στη φωτογραφία
1	18	9
2	34	25
3	60	62
4	62	57
5	110	185
6	70	25
7	160	121
8	126	90
<b>Mean</b>	80 <sup>a*</sup>	71,75 <sup>a</sup>
<b>Std. Deviation (s)</b>	48,1	58,8
<b>CV%</b>	60,1	82,0
<b>Εύρος</b>	18-160	9-185

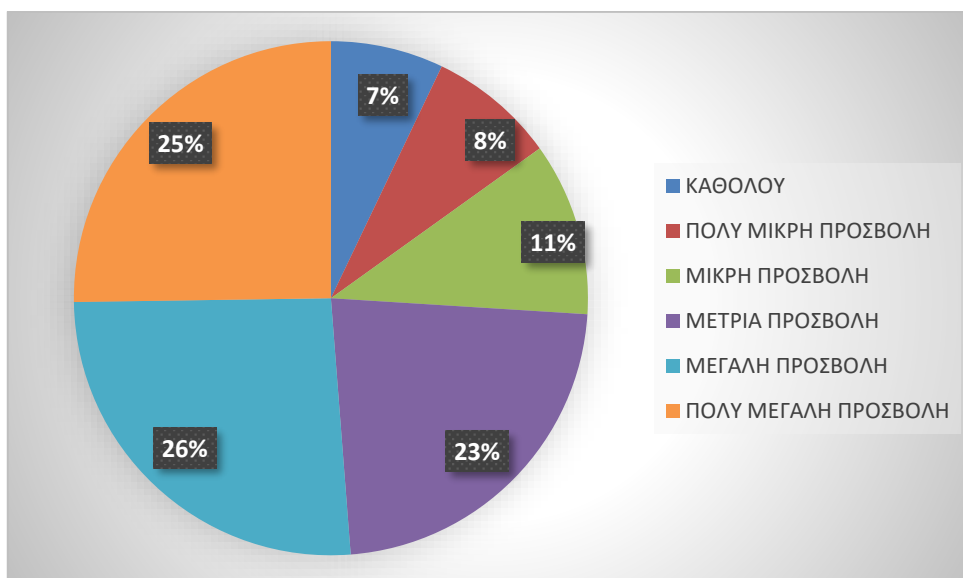
\*: όπου διαφορετικό λατινικό γράμμα, υπάρχουν σημαντικά στατιστικές διαφορές, σύμφωνα με τον έλεγχο t (t-test) ( $p=0,559$ ,  $t=0,614$ ), s= Τυπική Απόκλιση, CV= Συντελεστής Παραλλακτικότητας %.

#### **Εύρος σπορίων *Nosema spp.***

Σύμφωνα με όσα αναλύθηκαν στη «**Μεθοδολογία**», από τις 200 εικόνες που στάλθηκαν στα ερευνητικά εργαστήρια, έγινε ταυτόχρονη μέτρηση σπορίων *Nosema spp.* Οι ακραίες τιμές σπορίων που παρατηρήθηκαν σε τυχαία δείγματα μέσω των 102 παρασκευασμάτων κυμαίνονταν από 0-4871 σπόρια. Στη συνέχεια θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα των αξιολογήσεων των βαθμών προσβολής, τόσο για την περίπτωση με τις έξι βαθμίδες, όσο και με τις τέσσερις βαθμίδες προσβολής.

#### **Αποτελέσματα με βάση τις έξι βαθμίδες προσβολής**

Όπως περιγράφηκε και στο υποκεφάλαιο «**Επεξεργασία δεδομένων**», μελετήθηκαν δύο διαφορετικές περιπτώσεις: η πρώτη με έξι και η δεύτερη με τέσσερις βαθμίδες προσβολής. Αρχίζοντας από την πρώτη περίπτωση, η αξιολόγηση για κάθε εικόνα έγινε με τους εξής βαθμούς προσβολής: Καθόλου, Πολύ Μικρή, Μικρή, Μέτρια, Μεγάλη και Πολύ μεγάλη προσβολή. Ειδικότερα από τις συνολικές αξιολογήσεις ερευνητών, όπου ήταν 2239, το 7% ήταν «Καθόλου», το 8% ήταν «Πολύ μικρή προσβολή», το 11% ήταν «Μικρή προσβολή», το 23% ήταν «Μέτρια προσβολή», το 26% ήταν «Μεγάλη προσβολή» και το 25% ήταν «Πολύ μεγάλη προσβολή» (**Γράφημα 9**).



**Γράφημα 9:** Αποτελέσματα αξιολογήσεων που στάλθηκε με ερωτηματολόγιο στους ερευνητές-αξιολογητές, καθώς οι βαθμίδες προσβολής είναι έξι.

Στον **Πίνακα 8** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ομαδοποίησης των αξιολογήσεων με τις δύο μεθόδους που αναφέρθηκαν (MR & AR) και η σύγκριση των μέσων όρων αριθμών σπορίων Νοσεμίας στην κάθε μία περίπτωση και για κάθε βαθμό προσβολής χωριστά.

Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 8** ακολουθώντας την πλειοψηφική μέθοδο (MR), οι αξιολογητές «συμφώνησαν» ότι η προσβολή είναι μηδενική όταν κατά μέσο όρο, ο αριθμός αυτός ήταν 10,19, με εύρος από 0-46. Παρόμοια για την πολύ μικρή προσβολή ο μέσος όρος ήταν 67,87 με εύρος από 2-180. Για την μικρή προσβολή ο μέσος όρος 160,85 με εύρος από 38-352. Για την μέτρια προσβολή ο μέσος όρος ήταν 355,22 με εύρος από 107-747. Για τη μεγάλη προσβολή ο μέσος όρος ήταν 743,90 με εύρος από 224-1594 και για την πολύ μεγάλη, ο μέσος όρος ήταν 1840,28 με εύρος από 725-4871 σπόρια.

Επιπλέον, συνεχίζοντας στην κατά μέσο όρο μέθοδο (AR) οι αξιολογητές «συμφώνησαν» ότι η προσβολή είναι μηδενική όταν κατά μέσο όρο, ο αριθμός αυτός ήταν 2,92 με εύρος από 0-10. Παρόμοια για την Πολύ μικρή προσβολή ο μέσος όρος ήταν 61,75 με εύρος από 2-152. Για την μικρή προσβολή ο μέσος όρος 157,06 με εύρος από 38-353. Για την μέτρια προσβολή ο μέσος όρος ήταν 389,5 με εύρος από 119-747. Για τη μεγάλη προσβολή ο μέσος όρος ήταν 712,67 με εύρος από 212-1729 και για την Πολύ μεγάλη, ο μέσος όρος ήταν 1870,13 με εύρος από 731-4871 σπόρια.

Χρειάζεται να σημειωθεί, ότι από τον **Πίνακα 8** και τη σύγκριση των μέσων όρων μεταξύ της πλειοψηφικής και της κατά μέσο όρο μεθόδου, σε κάθε βαθμό προσβολής, διακρίνεται πως δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Η επιλογή δηλαδή της μεθόδου που ακολουθήθηκε προκειμένου να διακριθούν οι ομάδες και να προταθούν τα όρια με βάση τον αριθμό των σπορίων, δεν παρουσιάζει στατιστικό σφάλμα στην μία ή στην άλλη περίπτωση.

**Πίνακας 8:** Απεικόνιση και στατιστική ανάλυση των αξιολογήσεων με την πλειοψηφική (MR) και κατά μέσο όρο μέθοδο (AR) με έξι βαθμίδες προσβολής

Αριθμός εικόνων	Αριθμός σπορίων Νοσεμίας											
	Καθόλου		Πολύ μικρή		Μικρή		Μέτρια		Μεγάλη		Πολύ μεγάλη	
	MR	AR	MR	AR	MR	AR	MR	AR	MR	AR	MR	AR
1	0	0	2	2	38	38	107	119	224	212	725	731
2	0	0	3	3	46	46	119	168	232	224	729	742
3	0	0	4	4	53	70	121	173	271	232	742	756
4	0	0	10	35	70	72	126	204	319	263	756	814
5	2	2	35	36	77	77	133	210	337	271	814	855
6	2	2	36	46	81	81	156	261	353	319	855	903
7	2	2	46	47	101	101	168	271	354	337	903	997
8	3	3	47	53	104	101	173	287	381	353	977	1076
9	4	4	69	69	116	104	180	287	381	354	997	1233
10	4	4	72	146	119	107	199	292	384	381	1076	1269
11	8	8	101	148	126	116	210	304	409	381	1269	1271
12	35	10	121	152	125	119	212	310	429	384	1271	1289
13	36		144		146	121	212	311	465	409	1289	1308
14	46		148		152	125	261	313	479	429	1308	1342
15			180		156	126	263	313	510	458	1342	1384
16					182	126	269	319	573	465	1384	1387
17					189	133	271	319	654	479	1387	1426
18					204	144	271	323	654	510	1426	1466
19					207	156	287	323	663	573	1466	1496
20					223	180	287	341	675	654	1496	1511
21					223	182	287	346	676	654	1511	1569
22					237	189	292	349	676	663	1569	1604
23					237	199	304	355	684	672	1604	1728
24					269	207	310	362	712	675	1728	1755
25					349	212	311	371	727	676	1755	1774
26					352	223	313	371	742	676	1774	1844
27						223	313	374	742	684	1844	1864
28						237	319	379	747	712	1864	2045
29						237	319	388	768	725	2045	2064
30						269	323	397	769	727	2064	2069
31						352	323	422	769	747	2069	2103
32						353	341	468	779	768	2103	2186
33							346	498	787	769	2186	2232
34							352	508	826	769	2232	2359
35							355	521	826	779	2359	2368
36							362	526	851	787	2368	2387
37							371	557	853	826	2387	2389
38							371	573	853	826	2389	2392
39							374	573	905	851	2392	2510
40							379	576	962	853	2510	2546

41							388	653	977	853	2546	2663
42							397	688	1079	905	2663	2706
43							422	688	1097	962	2706	3263
44							458	747	1151	977	3263	3299
45							468		1151	742	3299	4180
46							498		1164	1079	4180	4871
47							508		1196	1097	4871	
48							521		1233	1151		
49							526		1307	1151		
50							557		1589	1164		
51							573		1594	1196		
52							573			1344		
53							576			1607		
54							653			1729		
55							672					
56							688					
57							688					
58							747					
<b>Mean</b>	<b>10,14<sup>a*</sup></b>	<b>2,92<sup>a</sup></b>	<b>67,87<sup>a</sup></b>	<b>61,75<sup>a</sup></b>	<b>160,85<sup>a</sup></b>	<b>157,06<sup>a</sup></b>	<b>355,22<sup>a</sup></b>	<b>389,50<sup>a</sup></b>	<b>743,90<sup>a</sup></b>	<b>712,67<sup>a</sup></b>	<b>1840,28<sup>a</sup></b>	<b>1870,13<sup>a</sup></b>
<b>s</b>	15,97	3,23	58,38	56,42	85,60	78,93	115,62	147,11	328,90	337,58	878,72	867,35
<b>CV%</b>	157,5	110,6	86,0	91,4	53,2	50,3	32,6	37,8	44,2	47,4	47,8	46,4
<b>Εύρος</b>	0-46	0-10	2-180	2-152	38-352	38-353	107-747	119-747	224-1594	212-1729	725-4871	731-4871

\*: όπου διαφορετικό λατινικό γράμμα, υπάρχουν σημαντικά στατιστικές διαφορές, σύμφωνα με τον έλεγχο t (t-test). Η σύγκριση γίνεται για κάθε βαθμό προσβολής ξεχωριστά. s= Τυπική Απόκλιση, CV= Συντελεστής Παραλλακτικότητας %.

Καθόλου προσβολή:  $p=0,120$ ,  $t=1,654$

Πολύ μικρή προσβολή:  $p=0,786$ ,  $t=0,275$

Μικρή προσβολή:  $p=0,862$ ,  $t=0,175$

Μέτρια προσβολή:  $p=0,269$ ,  $t=-1,111$

Μεγάλη προσβολή:  $p=0,632$ ,  $t=0,480$

Πολύ μεγάλη προσβολή:  $p=0,869$ ,  $t=-0,165$

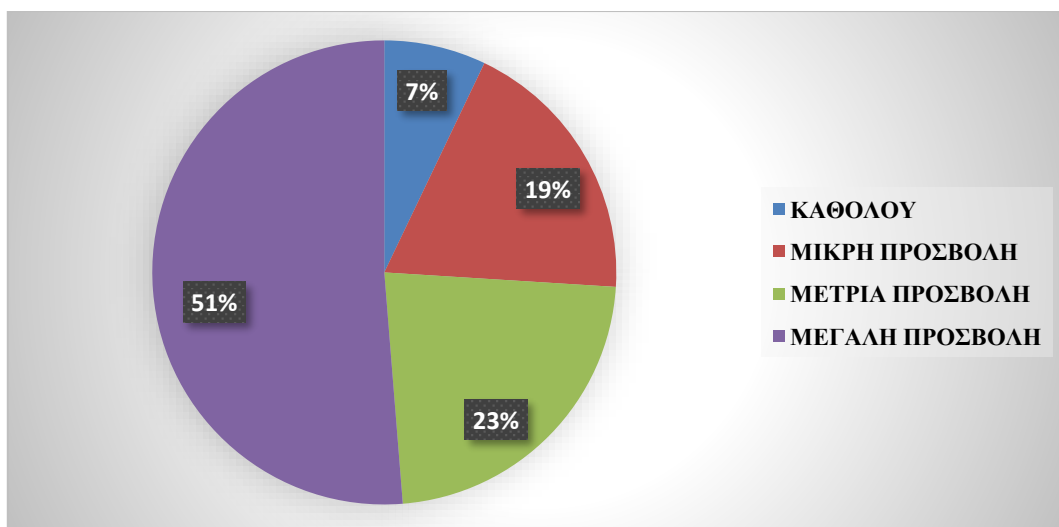
Σύμφωνα με αυτό, θα μπορούσε να προταθεί σε ένα σχετικό παρασκεύασμα μελισσών που ελέγχεται σε μικροσκόπιο και μεγέθυνση 400X, ο χαρακτηρισμός του βαθμού προσβολής να γίνεται με βάση τον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 9).

**Πίνακας 9:** Οριοθέτηση βαθμών προσβολής με βάση τον αριθμό των σπορίων (έξι βαθμίδες προσβολής).

Αριθμός σπορίων	Χαρακτηρισμός
0-10 (μ.ο. 3)	Καθόλου
10-150 (μ.ο. 60)	Πολύ μικρή προσβολή
40-350 (μ.ο. 160)	Μικρή προσβολή
100-750 (μ.ο. 360)	Μέτρια προσβολή
200-1700 (μ.ο. 700)	Μεγάλη προσβολή
700+ (μ.ο. 1800)	Πολύ μεγάλη προσβολή

## Αποτελέσματα με βάση τις τέσσερις βαθμίδες προσβολής

Εκτός από τις έξι βαθμίδες, μελετήθηκε, με τα ίδια αποτελέσματα αξιολογήσεων και αριθμού σπορίων, και η περίπτωση των τεσσάρων βαθμίδων προσβολής, όπου εν συντομία αφαιρέθηκαν οι κατηγορίες «Πολύ μικρή προσβολή και» και «Πολύ μεγάλη προσβολή». Εφόσον είναι ο ίδιος αριθμός αξιολογήσεων, δηλαδή 2239, συγκριτικά με το **Γράφημα 9**, οι βαθμοί προσβολής βάση αξιολογήσεων σε ποσοστό ήταν: 7% «Καθόλου», 19%, «Μικρή προσβολή», 23% «Μέτρια προσβολή» και 51% «Μεγάλη προσβολή» (**Γράφημα 10**).



**Γράφημα 10:** Αποτελέσματα αξιολογήσεων μετά την συγχώνευση «Πολύ μικρής προσβολής» στην «Μικρή προσβολή» και της «Πολύ Μεγάλης προσβολής» στην «Μεγάλη προσβολή».

Στον **Πίνακα 10** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ομαδοποίησης των αξιολογήσεων με τις δύο μεθόδους που αναφέρθηκαν (MR & AR) και η σύγκριση των μέσων όρων αριθμών σπορίων Νοσεμίας στην κάθε μία περίπτωση και για κάθε βαθμό προσβολής χωριστά.

**Πίνακας 10** Απεικόνιση και στατιστική ανάλυση των αξιολογήσεων με την πλειοψηφική (MR) και κατά μέσο όρο μέθοδο (AR) με τέσσερις βαθμίδες προσβολής

Αριθμός εικόνων	Αριθμός σπορίων Νοσεμίας							
	Καθόλου		Μικρή		Μέτρια		Μεγάλη	
	MR	AR	MR	AR	MR	AR	MR	AR
1	0	0	2	2	126	119	224	224
2	0	0	3	3	133	126	232	232
3	0	0	4	4	168	133	263	271
4	0	0	35	35	173	156	271	319
5	2	2	36	36	199	168	319	337
6	2	2	38	38	210	173	337	353
7	2	2	46	46	212	189	353	354

8	3	3	46	46	212	199	354	381
9	4	4	47	47	261	204	381	381
10	4	4	53	53	263	210	381	384
11	8	8	69	69	271	212	384	409
12	10	10	69	69	271	212	409	429
13			70	70	287	223	429	465
14			72	72	287	261	465	479
15			77	77	292	263	479	510
16			81	81	304	271	510	573
17			101	101	310	287	573	654
18			101	101	311	287	654	654
19			104	104	313	292	654	663
20			107	107	313	304	663	675
21			116	116	319	310	675	676
22			119	121	319	311	676	676
23			121	125	323	313	676	684
24			125	126	323	313	684	712
25			126	144	341	319	712	725
26			126	146	346	319	725	727
27			144	148	353	323	727	731
28			146	152	355	323	731	742
29			148	180	362	341	742	747
30			152	207	371	346	747	756
31			156	223	371	349	756	768
32			180	237	374	355	768	769
33			189	237	379	362	769	769
34			204	269	388	371	769	779
35			207	352	397	371	779	787
36			223	353	422	374	787	814
37			223		458	379	814	826
38			237		468	388	826	826
39			237		498	397	826	851
40			269		508	422	851	853
41			349		521	458	853	853
42			352		526	468	853	855
43			353		557	498	855	903
44					573	508	903	905
45					573	521	905	962
46					576	526	962	977
47					653	557	977	742
48					672	573	742	997
49					688	573	997	1076
50					688	576	1076	1079
51					719	653	1079	1097
52					747	672	1097	1151
53						688	1151	1151

54					688		1151	1164
55					719		1164	1196
56					747		1196	1233
57							1233	1269
58							1269	1271
59							1271	1289
60							1289	1308
61							1308	1342
62							1342	1344
63							1344	1384
64							1384	1387
65							1387	1426
66							1426	1466
67							1466	1496
68							1496	1511
69							1511	1569
70							1569	1604
71							1604	1607
72							1607	1728
73							1728	1729
74							1729	1755
75							1755	1774
76							1774	1844
77							1844	1864
78							1864	2045
79							2045	2064
80							2064	2069
81							2069	2103
82							2103	2186
83							2186	2232
84							2232	2359
85							2359	2368
86							2368	2387
87							2387	2389
88							2389	2392
89							2392	2510
90							2510	2546
91							2546	2663
92							2663	2706
93							2706	3263
94							3263	3299
95							3299	4180
96							4180	4871
97							4871	
<b>Mean</b>	<b>2,92a*</b>	<b>2,92a</b>	<b>131,70 a*</b>	<b>119,36a</b>	<b>386,23a*</b>	<b>369,64a</b>	<b>1269,77a*</b>	<b>1280,26a</b>
<b>s</b>	3,23	3,23	91,3	89,4	158,4	163,7	860,6	858,8

<b>CV%</b>	110,6	110,6	69,3	74,9	41	44,3	67,8	67,1
<b>Εύρος</b>	0-10	0-10	2-353	2-353	126-747	119-747	224-4871	224-4871

\*: όπου διαφορετικό λατινικό γράμμα, υπάρχουν σημαντικά στατιστικές διαφορές, σύμφωνα με τον έλεγχο t (t-test). Η σύγκριση γίνεται για κάθε βαθμό προσβολής ξεχωριστά. s=Τυπική Απόκλιση, CV=Συντελεστής Παραλλακτικότητας %.

Καθόλου προσβολή:  $p=1$ ,  $t=0$

Μικρή προσβολή:  $p=0,548$ ,  $t=0,604$

Μέτρια προσβολή:  $p=0,594$ ,  $t=0,534$

Μεγάλη προσβολή:  $p=0,933$ ,  $t=-0,085$

Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 10** ακολουθώντας την πλειοψηφική μέθοδο (MR), οι αξιολογητές «συμφώνησαν» ότι η προσβολή είναι μηδενική όταν κατά μέσο όρο, ο αριθμός αυτός ήταν 2,92 με εύρος από 0-10 Παρόμοια για την μικρή προσβολή ο μέσος όρος ήταν 131,7 με εύρος από 2-353. Για την μέτρια προσβολή ο μέσος όρος ήταν 386,23 με εύρος από 126-747. Για τη μεγάλη προσβολή ο μέσος όρος ήταν 1269,77 με εύρος από 224-4871 σπόρια.

Επιπλέον, συνεχίζοντας στην κατά μέσο όρο μέθοδο (AR) οι αξιολογητές «συμφώνησαν» ότι η προσβολή είναι μηδενική όταν κατά μέσο όρο, ο αριθμός αυτός ήταν 2,92 με εύρος από 0-10. Παρόμοια για την μικρή προσβολή ο μέσος όρος ήταν 119,36 με εύρος από 2-353. Για την μέτρια προσβολή ο μέσος όρος ήταν 369,64 με εύρος από 119-747. Για τη μεγάλη προσβολή ο μέσος όρος ήταν 1280,26 με εύρος από 224-4871 σπόρια.

Χρειάζεται να σημειωθεί, ότι από τον **Πίνακα 10** και τη σύγκριση των μέσων όρων μεταξύ της πλειοψηφικής και της κατά μέσο όρο μεθόδου, σε κάθε βαθμό προσβολής, διακρίνεται πως δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Η επιλογή δηλαδή της μεθόδου που ακολουθήθηκε προκειμένου να διακριθούν οι ομάδες και να προταθούν τα όρια με βάση τον αριθμό των σπορίων, δεν παρουσιάζει στατιστικό σφάλμα στην μία ή στην άλλη περίπτωση. Σύμφωνα με αυτό, θα μπορούσε να προταθεί σε ένα σχετικό παρασκεύασμα μελισσών που ελέγχεται σε μικροσκόπιο και μεγέθυνση 400X, ο χαρακτηρισμός του βαθμού προσβολής να γίνεται με βάση τον ακόλουθο πίνακα (**Πίνακας 11**).

**Πίνακας 11:** Οριοθέτηση βαθμών προσβολής με βάση τον αριθμό των σπορίων (τέσσερις βαθμίδες προσβολής).

<b>Αριθμός σπορίων</b>	<b>Χαρακτηρισμός</b>
0-10 (μ.ο. 3)	Καθόλου
2-353 (μ.ο. 120)	Μικρή προσβολή
120-750 (μ.ο. 370)	Μέτρια προσβολή
800 + (μ.ο. 1270)	Μεγάλη προσβολή



## Δευτερογενή αποτελέσματα

### Περίπτωση ίδιων εικόνων

Όπως αναφέρθηκε στη «Μεθοδολογία», για την εγκυρότητα των αξιολογήσεων επιλέχθηκαν 16 εικόνες, που κατά τον συγγραφέα ο βαθμός προσβολής κυμαινόταν από Μικρή, Μέτρια και Μεγάλη προσβολή, όπου έγινε αντιγραφή δύο φορές η κάθε φωτογραφία και χορηγήθηκαν όλες μέσα στο ερωτηματολόγιο. Ο σκοπός ήταν να παρατηρηθούν τυχόν διαφοροποιήσεις στις απαντήσεις των αξιολογητών για την ίδια εικόνα ξεχωριστά, καθώς επίσης να παρατηρηθεί εάν οι όποιες διαφορές εμφανιστούν, συνδέονται περισσότερο με συγκεκριμένους βαθμούς προσβολής οι οποίοι και ενδεχομένως δημιουργούν σύγχυση.

Όπως προκύπτει, το ποσοστό αντικειμενικής αξιολόγησης από τον Αξιολογητή 1 έως τον Αξιολογητή 12 είναι: 100%, 94%, 38%, 31%, 63%, 69%, 56%, 38%, 50%, 31%, 50% και 56% αντίστοιχα (Πίνακας 12). Ο μέσος όρος των σωστών αξιολογήσεων, δηλαδή το ποσοστό που έμεινε σταθερό στην αξιολόγηση του, τόσο στην κανονική εικόνα, όσο και σε εκείνη που αντιγράφηκε και ύστερα επεξεργάστηκε, ήταν 56,3% (Πίνακας 12). Επίσης στον ίδιο πίνακα παρατηρείται ότι στους Αξιολογητές 4 & 10 μόνο το 31% των αξιολογήσεων τους δεν διαφοροποιήθηκε, ενώ στο 69% υπήρξαν αλλαγές στην αξιολόγηση για τις ίδιες εικόνες αντίστοιχα.

Πίνακας 12: Ποσοστό αντικειμενικής αξιολόγησης για την ίδια εικόνα.

	Αριθμός εικόνων που άλλαξε η αξιολόγηση στην ίδια εικόνα	Αριθμός εικόνων που δεν άλλαξε η αξιολόγηση στην ίδια εικόνα	Ποσοστό σταθερής αξιολόγησης	Ποσοστό διαφορετικής αξιολόγησης
Αξιολογητής 1	0	16	100%	0
Αξιολογητής 2	1	15	94%	6%
Αξιολογητής 3	10	6	38%	62%
Αξιολογητής 4	11	5	31%	69%
Αξιολογητής 5	2	10	63%	37%
Αξιολογητής 6	5	11	69%	31%
Αξιολογητής 7	7	9	56%	44%
Αξιολογητής 8	10	6	38%	62%
Αξιολογητής 9	8	8	50%	50%
Αξιολογητής 10	11	5	31%	69%
Αξιολογητής 11	8	8	50%	50%
Αξιολογητής 12	7	9	56%	44%
ΜΟ	-	-	56,3%	43,7%

Στη συνέχεια, αφού είχε μετρηθεί ο αριθμός σπορίων στις ίδιες εικόνες, παρατηρήθηκε και ο αριθμός των αξιολογητών που διαφοροποίησαν την απάντησή τους σε ένα εύρος σπορίων. Ο λόγος ήταν να παρατηρηθεί σε ποιον αριθμό σπορίων, πιθανόν να προκλήθηκαν οι περισσότερες διαφορετικές

αξιολογήσεις στις ίδιες εικόνες. Σύμφωνα με τον **Πίνακα 13**, το εύρος σπορίων που προκάλεσε τις περισσότερες διαφορετικές αξιολογήσεις για τις ίδιες εικόνες είναι: 101, 237, 313, 319, 573, 747 σπόρια *Nosema spp.* Αξιοσημείωτο είναι στον ίδιο πίνακα, ότι το 70% των αξιολογητών είχαν διαφορετικές απόψεις στο εύρος σπορίων *Nosema spp.* των 101, 237 και 313.

**Πίνακας 13:** Αριθμός αξιολογητών που διαφοροποίησαν την απάντησή τους στην ίδια εικόνα ανάλογα με τον αριθμό σπορίων που είχε μετρήσει ο συγγραφέας.

Αριθμός σπορίων	Αξιολογητές	Ποσοστό αξιολογητών %
101	7	70%
126	6	60%
223	5	50%
237	7	70%
313	7	70%
319	6	60%
371	4	40%
381	4	40%
573	6	60%
676	3	30%
688	4	40%
747	6	60%
852	5	50%
853	4	40%
977	6	60%
1151	4	40%

### Περίπτωση διχογνωμίας

Χρειάζεται να σημειωθεί, πως από το σύνολο των 200 εικόνων, το 7% (12 εικόνες) βρέθηκε το φαινόμενο της ισοψηφίας των αξιολογήσεων. Αναλυτικότερα, ο όρος ισοψηφία αξιολογήσεων σε αυτή την περίπτωση δηλώνει το διχασμό των αξιολογητών σε ορισμένες εικόνες του ερωτηματολογίου. Παρουσιάζει ενδιαφέρον η διχογνωμία αυτή, καθώς στην συνέχεια θα παρουσιαστούν συγκεντρωτικά οι απαντήσεις που δόθηκαν από τον κάθε αξιολογητή (**Πίνακας 14**), ύστερα να παρατηρηθούν αντιπροσωπευτικές εικόνες με ισοψηφία

αξιολογήσεων. Τέλος θα δοθούν ορισμένες παρατηρήσεις από τον συγγραφέα, αναφορικά με τους πιθανούς παράγοντες που οδήγησαν στην «σύγχυση» απόψεων.

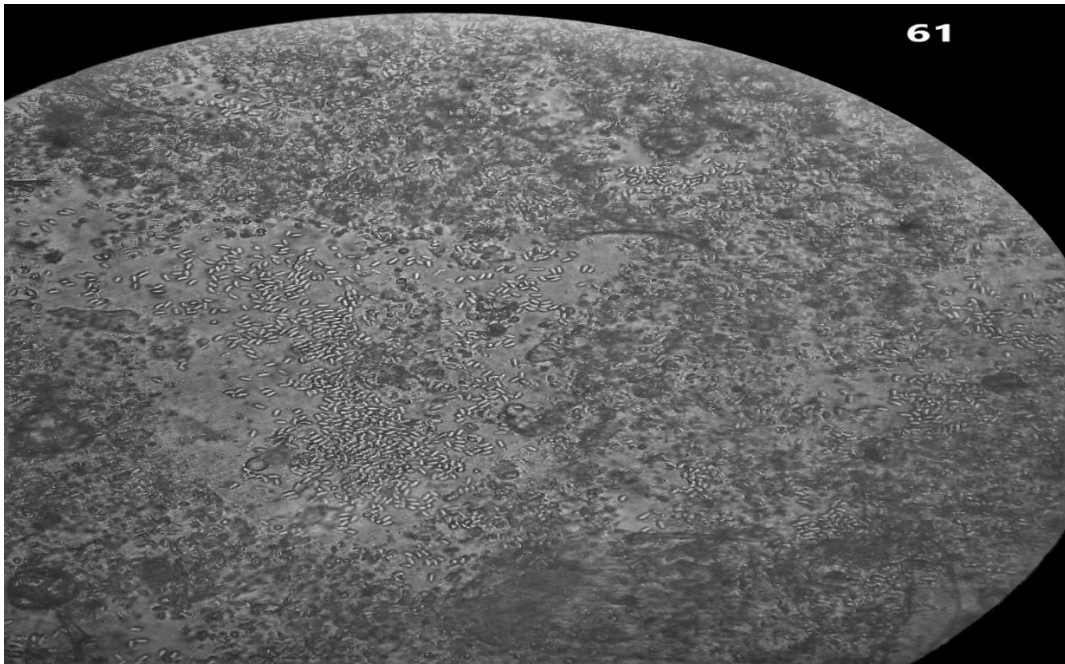
Σύμφωνα με τον **Πίνακα 14**, υπάρχουν από 11 έως 12 αξιολογήσεις, όπου και στις δύο περιπτώσεις δημιουργήθηκε ισοψηφία. Παρατηρείται επίσης ότι υπάρχει διαχωρισμός των αξιολογήσεων κατά το ήμισυ για τους αξιολογητές με ζυγό αριθμό. Αντίθετα, στην περίπτωση του ακέραίου αριθμού αξιολογητών υπήρχαν τόσο περιπτώσεις ισοψηφίας κατά το ήμισυ, όσο και ισοβαθμία δύο απόψεων που επικρατούσαν πλειοψηφικά με το υπόλοιπο αριθμό αξιολογήσεων. Χρειάζεται να αναφερθεί πως είναι άξιο προς συζήτηση και η τελευταία περίπτωση που παρατηρούνται παραπάνω από δύο διαφορετικές απόψεις.

**Πίνακας 14:** Παρουσία διχογνωμίας σε ορισμένες εικόνες του ερωτηματολογίου από τους αξιολογητές

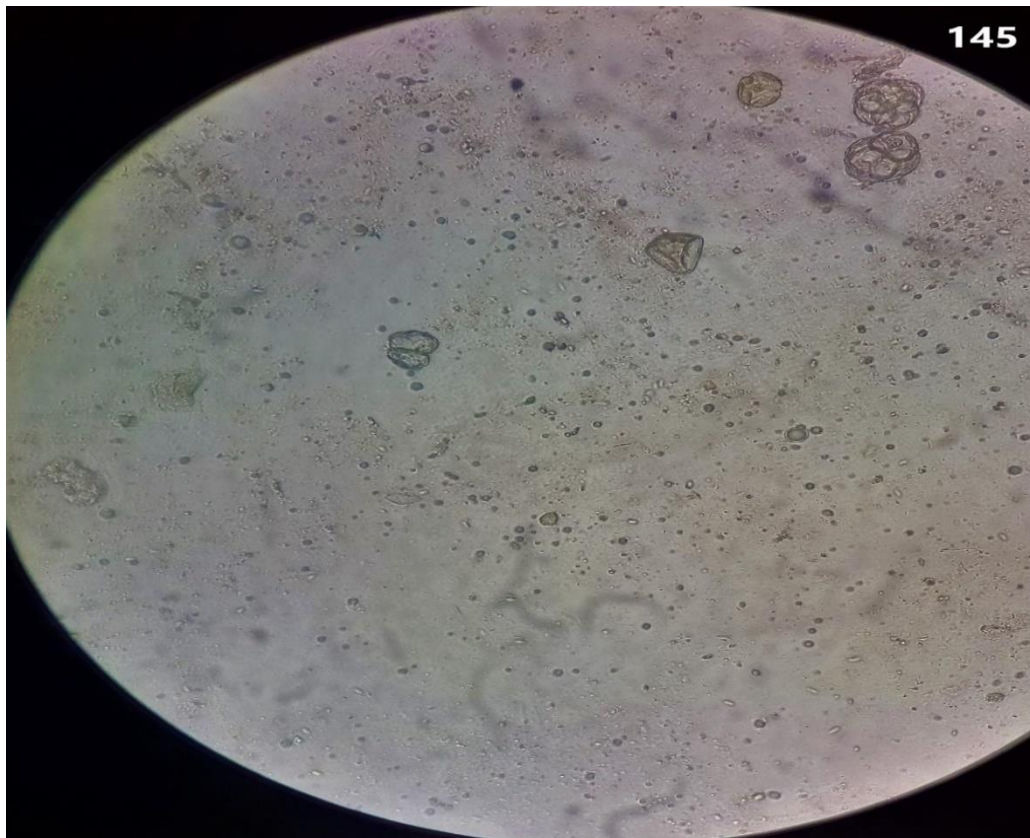
Εικόνα	Αξιολογητές												ΔΙΧΟΓΝΩΜΙΑ
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	3	3	3	3	3	2	2	2	3	2	2	2	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ-ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
12	5	5	6	6	6	5	5	6	6	5	6	5	ΜΕΓΑΛΗ-ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
18	4	4	4	5	5	3	3	3	2	1	4	3	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ-ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
35	3	3	3	2	4	2	2	2	2	2	3	2	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ-ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
36	4	4	4	3	2	1	3	4	3	1	2	3	ΜΙΚΡΗ-ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
61	6	6	5	6	6	-	5	4	5	5	6	5	ΜΕΓΑΛΗ-ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
102	4	4	4	2	4	-	2	2	3	2	2	3	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ-ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
105	4	4	4	3	4	-	2	2	2	1	2	3	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ-ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
145	3	3	4	1	3	-	2	2	1	1	1	3	ΚΑΘΟΛΟΥ-ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
168	3	3	2	1	2	-	2	2	1	1	1	3	ΚΑΘΟΛΟΥ-ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
171	3	3	3	1	1	-	2	2	2	1	1	2	ΚΑΘΟΛΟΥ-ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
177	4	4	5	5	6	-	4	5	4	4	5	5	ΜΕΤΡΙΑ - ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ

1=καθόλου, 2=πολύ μικρή, 3= μικρή, 4=μέτρια, 5=μεγάλη, 6=πολύ μεγάλη προσβολή.

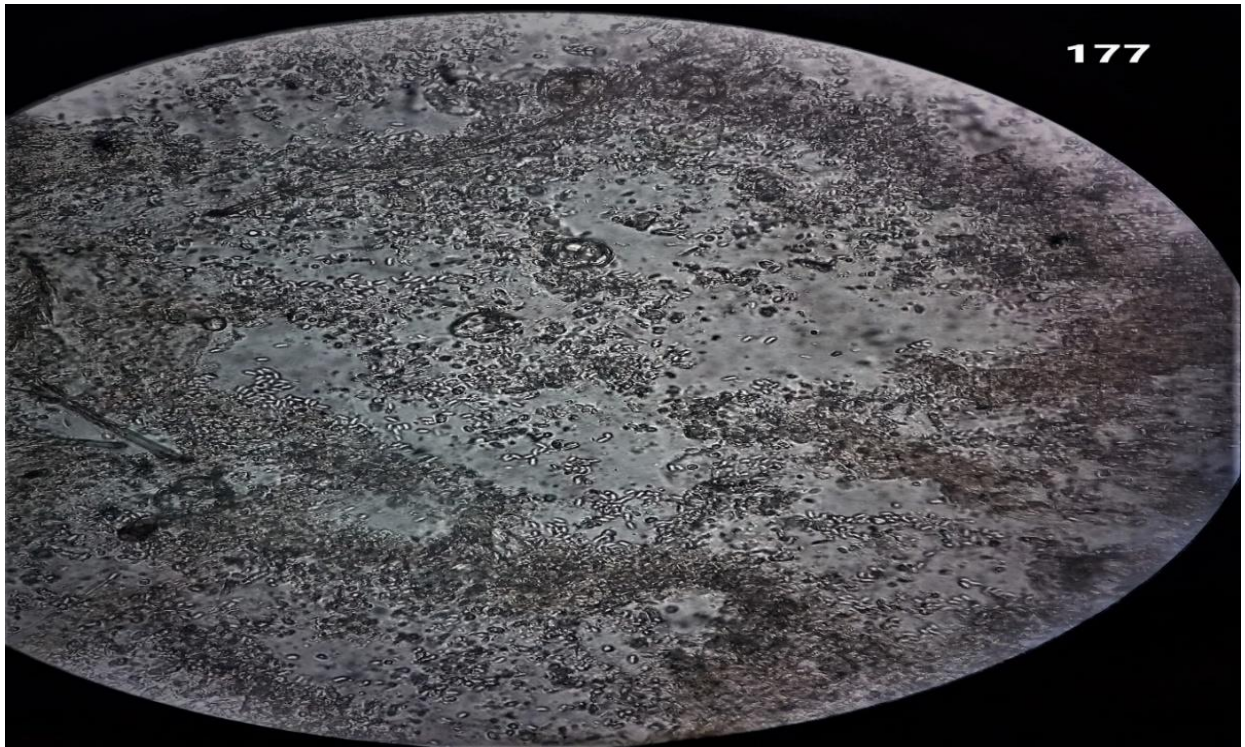
Στην συνέχεια, στις **Εικόνες 32, 33 & 34** παρουσιάζονται οι αντιπροσωπευτικές εικόνες του ερωτηματολογίου που προέκυψε διχογνωμία των αξιολογητών.



**Εικόνα 32:** Διχογνωμία αξιολογήσεων της Εικόνας 61, όπου από τις 11 αξιολογήσεις, οι 5 ήταν μεγάλη προσβολή και οι άλλες 5 πολύ μεγάλη προσβολή, καθώς και μια αξιολόγηση η οποία ήταν μέτρια προσβολή.



**Εικόνα 33:** Διχογνωμία αξιολογήσεων της Εικόνας 145, όπου από τις 11 αξιολογήσεις, οι 4 ήταν μικρή προσβολή και οι άλλες 4 καθόλου, καθώς οι υπόλοιπες ήταν 2 στην κατηγορία πολύ μικρή προσβολή και μία στην κατηγορία μέτρια προσβολή.



**Εικόνα 34:** Διχογνωμία αξιολογήσεων της Εικόνας 177, όπου από τις 11 αξιολογήσεις, οι 5 ήταν μέτρια προσβολή και οι άλλες 5 μεγάλη προσβολής, καθώς η υπολειπόμενη αξιολόγηση ήταν πολύ μεγάλη προσβολή.

Σύμφωνα με την άποψη του συγγραφέα, οι παράγοντες που οδήγησαν στην διχογνωμία αξιολογήσεων και έπαιξαν καθοριστικό ρόλο ήταν οι εξής:

- I. Η ευκρίνεια της φωτογραφίας (αναφορικά με τα χρώματα, σκιές κ.λπ.).
- II. Στην περίπτωση που ήταν ενωμένα σε πυκνή διάταξη τα σπόρια *Nosema spp*, πιθανόν να δημιούργησε δυσκολία στην απόφαση για το αν είναι μέτρια μεγάλη ή πολύ μεγάλη προσβολή (**Εικόνα 32**).
- III. Οι φυσαλίδες αέρα του παρασκευάσματος που μπορεί να λήφθηκαν ως σπόρια.
- IV. Η εμπειρία των αξιολογητών.
- V. Η πιθανή κάλυψη των σπορίων από γυρεόκοκκους ή από άλλα στοιχεία που παρατηρούνται στο παρασκεύασμα, παρεμποδίζοντας την οπτική παρατήρηση.

### Περίπτωση πολυγνωμίας

Είναι σημαντικό να ληφθούν υπόψιν όλες οι διαφορετικές απόψεις ανεξαρτήτως του αποτελέσματος που δίνεται από την πλειοψηφία. Σκοπός της υποενότητας αυτής είναι να αποδειχθεί, ότι για μια εικόνα που έχει φωτογραφηθεί από φορητή συσκευή, υπάρχουν πολλές διαφορετικές απόψεις αναφορικά με τον βαθμό προσβολής. Στον **Πίνακα 15**, παρουσιάζονται τυχαίες εικόνες του ερωτηματολογίου που

παρατηρείται το φαινόμενο της πολυγωνμίας. Για παράδειγμα, στην εικόνα 140 του ερωτηματολογίου (Εικόνα 35), παρατηρείται ότι όλοι οι αξιολογητές δήλωσαν στην απάντηση τους σχεδόν όλους τους βαθμούς προσβολής (εκτός από την κατηγορία «καθόλου»), όπου η πλειοψηφία τείνει στην μέτρια προσβολή (Πίνακας 15). Η πολυγωνμία που εμφανίζεται σε αυτή την εικόνα καθώς είναι άξια προς συζήτηση, διότι είναι αντιπροσωπευτική του προβλήματος που υπάρχει στην υποκειμενικότητα του κάθε ερευνητή-αξιολογητή. Επομένως, κύριος σκοπός είναι με την ομαδοποίηση των προσβολών ανάλογα με τον αριθμό σπορίων *Nosema spp.*, να υπάρξει μια κατευθυντήρια γραμμή στην τελική αξιολόγηση βαθμού προσβολής.

**Πίνακας 15:** Παρουσία πολυγωνμίας σε ορισμένες εικόνες του ερωτηματολογίου από τους αξιολογητές

Εικόνα	Αξιολογητές												ΤΕΛΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
17	3	3	3	5	5	2	3	3	3	2	4	2	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
30	4	4	4	4	5	2	4	2	3	1	4	3	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
36	4	4	4	3	2	1	3	4	3	1	2	3	ΜΙΚΡΗ-ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
37	3	3	4	5	4	1	3	3	3	2	4	4	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
140	4	4	5	3	6	-	4	4	4	2	4	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ

1=καθόλου, 2=πολύ μικρή, 3= μικρή, 4=μέτρια, 5=μεγάλη, 6=πολύ μεγάλη προσβολή.



**Εικόνα 35:** Στη συγκεκριμένη εικόνα (Εικόνα 140 του ερωτηματολογίου) παρουσιάστηκε το φαινόμενο της πολυγωνμίας της όπου από τις 11 αξιολογήσεις: όπου ήταν 1 για πολύ μικρή, 1 για μικρή, 7 για μέτρια, 1 για μεγάλη και 1 για πολύ μεγάλη προσβολή.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ & ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η Νοσεμίαση αποτελεί μία από τις πιο σοβαρές παθήσεις των ενθλίκων μελισσών (Giersch et al., 2009), που προκαλεί σημαντικές οικονομικές απώλειες στους μελισσοκόμους παγκοσμίως (Delbac and Polonais, 2008; Giersch et al., 2009; Paşca et al., 2019). Τα μικροσπορίδια που είναι αιτιολογικοί παράγοντες για αυτήν την ασθένεια είναι τα είδη *N. apis* & *N. ceranae* (Emsen et al., 2020). Χρειάζεται να σημειωθεί ότι με τα σημερινά δεδομένα τα συγκεκριμένα είδη υπάγονται στο Βασίλειο των μυκήτων (Sina et al., 2005; Adl et al., 2012; Vávra and Lukeš, 2013).

Μέχρι και σήμερα δεν έχει οριστεί από την ερευνητική κοινότητα του κλάδου, μια αντικειμενική αξιολόγηση του βαθμού προσβολής από τη Νοσεμίαση, καθώς επαφίεται στην υποκειμενικότητα του κάθε ερευνητή (Cantwell, 1970). Επομένως, υπάρχει ανάγκη για τη δημιουργία ενός πρωτοκόλλου που θα προσεγγίσει αυτό το πρόβλημα και ιδιαίτερα για τις περιπτώσεις εκείνες που τα εργαστήρια ελέγχου, πραγματοποιούν αναλύσεις ρουτίνας σε μεγάλο πλήθος δειγμάτων που προσκομίζουν οι ενδιαφερόμενοι μελισσοκόμοι και καλούνται να ενημερώσουν με αντικειμενικό τρόπο.

Από τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην διπλωματική αυτή εργασία αναδεικνύεται η ανάγκη για την εναρμόνιση των εργαστηριακών ελέγχων. Επίσης, μέσω αυτής της μελέτης δίνεται η αφορμή να γίνει συζήτηση για το πρόβλημα που παρατηρείται από πολλά εργαστήρια, διότι: α) λόγω της υποκειμενικότητας του κάθε ερευνητή και β) την υιοθέτηση διαφορετικού πρωτοκόλλου από κάθε εργαστήριο, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να υπάρξει διαφορετικό αποτέλεσμα σε κάθε εργαστηριακή διάγνωση για την ασθένεια της Νοσεμίασης. Επομένως, γίνεται αντιληπτό πως δεν υπάρχει σωστή προσέγγιση στη διάγνωση και ειδικά στον προσδιορισμό του βαθμού προσβολής του μύκητα *Nosema spp.* Η παραπάνω διατύπωση έρχεται να συμφωνήσει και από μια Ευρωπαϊκή Διεργαστηριακή μελέτη των Duquesne et al., (2021), όπου παρατηρείται εξίσου η ανάγκη για την εναρμόνιση των εργαστηριακών ελέγχων.

Στην παρούσα μελέτη προτείνεται, όπως αναφέρθηκε, η υιοθέτηση ενός κοινού πρωτοκόλλου, όπου θα αξιολογηθεί για την αποτελεσματικότητά του, καθώς σε μελλοντικό χρόνο θα εξεταστεί για το αν εφαρμόζεται σε πραγματικές εργαστηριακές συνθήκες και ύστερα αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την εναρμόνιση των εργαστηριακών μετρήσεων. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε η προσπάθεια προσέγγισης για τη δημιουργία αυτού του κοινού πρωτοκόλλου, μέσα από την επεξεργασία των αξιολογήσεων από 12 έγκριτους επιστήμονες, που δέχτηκαν να συμμετέχουν εκτιμώντας τους βαθμούς προσβολής που εμφανίζονταν σε ένα πλήθος 200 εικόνων. Παρόμοια μεθοδολογία παρατηρείται και στους Duquesne et al., (2021), όπου συμμετείχαν 23 εξειδικευμένα εργαστήρια, εντός Ευρώπης.

Επίσης, χρειάζεται να αναφερθεί πως η ποσοτικοποίηση του αριθμού των σπορίων *Nosema spp.*, πραγματοποιήθηκε μέσω καταμέτρησης στο μικροσκοπικό πεδίο για κάθε παρασκεύασμα,

χρησιμοποιώντας φορητή συσκευή για τη λήψη φωτογραφιών. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως για τις ανάγκες του πειράματος έγινε εργαστηριακός έλεγχος σε 102 παρασκευάσματα προερχόμενα από δείγματα εντός Ελλάδας. Αντίθετα, στους [Duquesne et al., \(2021\)](#), υπήρξε μικρός αριθμός δειγμάτων (10 δείγματα), τα οποία πριν σταλθούν σε όλα τα εργαστήρια που συμμετείχαν, μετρήθηκαν με τη μέθοδο του [Cantwell, \(1970\)](#). Εκτός από τις διαφορές, αναφορικά με τον αριθμό των δειγμάτων και τον τρόπο μέτρησης των σπορίων *Nosema spp.*, τόσο στην διπλωματική εργασία, όσο και στην μελέτη των [Duquesne et al., \(2021\)](#), υπάρχει η επίτευξη της συνεργασίας μεταξύ εξειδικευμένων ερευνητών με σκοπό την βελτίωση της διάγνωσης της ασθένειας της Νοσεμιάσης.

Επιπροσθέτως στα πλαίσια της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας, για τις ανάγκες της δημιουργίας του πρωτοκόλλου, χρειάστηκε να αξιολογηθούν και οι ίδιοι ερευνητές με την προσθήκη 8 εις διπλούν ιδίων φωτογραφιών, μέσα στο σύνολο των 200 εικόνων, που συμπεριλήφθηκαν στη στατιστική ανάλυση. Αξιοσημείωτο είναι, πως στο 56% των ερευνητών τροποποίησαν την άποψη τους για την ίδια εικόνα. Για παράδειγμα, στην εικόνα 83 και στην εικόνα 190 του ερωτηματολογίου που αφορούσε την ίδια φωτογραφία, καθώς τα σπορια *Nosema spp* που μετρήθηκαν από τον συγγραφέα ήταν 313. Στην ίδια αυτή εις διπλούν εικόνα, δύο αξιολογητές στην πρώτη εμφάνιση της εικόνας χαρακτήρισαν την προσβολή ως «Μικρή», ενώ στην δεύτερη εμφάνιση, αναθεώρησαν αξιολογώντας τον βαθμό προσβολής ως «Μέτριο». Παρομοίως, στη μελέτη των ([Duquesne et al., 2021](#)), χρησιμοποιήθηκε το δείγμα «δελεασμού» ή «LURE» ως απόδειξη ότι ο κάθε ερευνητής δεν υιοθετούσε τα αποτελέσματα κάποιου άλλου μέσω της εκ προ μελέτης συνεννόησης. Χρειάζεται να σημειωθεί, πως τα αποτελέσματα των δειγμάτων «δελεασμού» της συγκεκριμένης μελέτης ([Duquesne et al., 2021](#)), δεν συμπεριλήφθηκαν στην στατιστική ανάλυση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων τους.

Στη διπλωματική μελέτη πραγματοποιήθηκε εκτίμηση των βαθμών προσβολής με βάση τις αξιολογήσεις έμπειρων ερευνητών σε 200 φωτογραφίες. Επιπλέον, μία προσπάθεια αναφορικά με την προσέγγιση των βαθμών προσβολής παρατηρείται και από τους [Emsen et al., \(2020\)](#). Συγκεκριμένα, χρησιμοποίησαν εξίσου την κατά [Cantwell, \(1970\)](#) μέθοδο με τροποποιήσεις, καθώς προσέγγισαν τους βαθμούς προσβολής μόνο για το μικροσπορίδιο *N. ceranae*, με σκοπό: α) την αξιολόγηση των συγκεκριμένων μελισσιών της μελέτης τους και β) την σχέση αυτών με το μικροσπορίδιο βάσει τον αριθμό των σπορίων. Χρειάζεται να αναφερθεί πως σε αυτή την έρευνα ([Emsen et al., 2020](#)) η κατά προσέγγιση εκτίμηση της ταξινόμησης των προσβολών αναφορικά με τον αριθμό των σπορίων, ξεκίνησε από την ομάδα διαγνωστικών υπηρεσιών “Bee Informed Partnership” (<https://beeinformed.org/>) που καθορίζουν το όριο θεραπείας σε 1.000.000 σπόρια / μέλισσα ([Mortensen et al., 2020](#)). Αντίθετα, στην εργασία των ([Duquesne et al., 2021](#)), δεν υφίσταται προσέγγιση των βαθμών προσβολής, παρά μόνο εναρμόνιση των εργαστηριακών ελέγχων.

Το πρωτόκολλο που δημιουργήθηκε σε αυτή την μεταπτυχιακή μελέτη, συγκριτικά με τις υπόλοιπες έρευνες ([Emsen et al., 2020](#); [Duquesne et al., 2021](#)), δεν χρησιμοποιεί την κατά [Cantwell, \(1970\)](#)



μέθοδο. Επομένως, τα σπόρια δεν υπολογίστηκαν στο εκατομμύριο, παρά μόνο όσα μπορούσαν να μετρηθούν στο προσοφθάλμιο του μικροσκοπίου (που κυμαίνονταν από 0-4871). Ύστερα μέσω της φορητής συσκευής λήφθηκαν φωτογραφίες από όπου μετρήθηκαν τελικώς τα σπόρια *Nosema spp.*, και αποδείχθηκε ότι αντιπροσωπεύουν τον αριθμό εκείνων που μπορεί να παρατηρήσει ένας ερευνητής στο μικροσκόπιο. Αντίθετα, οι [Emsen et al., \(2020\)](#), προτείνουν ότι στο πειραματικό μελισσοκομείο επικρατούσαν κατά προσέγγιση οι εξής βαθμοί προσβολής από *N. ceranae*: «Μικρή προσβολή» (<1.000.000 σπόρια / μέλισσα), «Μέτρια (ή οριακή) προσβολή» (>1.000.000 έως <2.000.000 σπόρια / μέλισσα), και «Μεγάλη προσβολή» (> 2.000.000 σπόρια / μέλισσα). Επιπλέον, οι [Duquesne et al., \(2021\)](#) αναφέρουν ότι τα περισσότερα Εθνικά Εργαστήρια Αναφοράς (NRLs) δεν είχαν προσεγγίσει το όριο διάγνωσης για την κλινική ασθένεια της Νοσεμίας (δηλ. ένα φορτίο σπορίων *Nosema spp.* που υποδηλώνει μια εμφανή προσβολή). Ακόμα και όταν αυτό το όριο υπήρχε, κυμαινόταν από ένα εκατομμύριο έως αρκετά εκατομμύρια ή εννέα εκατομμύρια σπόρια ανά μέλισσα για το *N. apis*. Στην περίπτωση του *N. ceranae*, δύο εργαστήρια είχαν ένα όριο διάγνωσης ενός εκατομμυρίου σπορίων ανά μέλισσα, όπως υιοθετήθηκε και από άλλη έρευνα, συγκεκριμένα από τους [Emsen et al., \(2020\)](#).

Ειδικότερα, τα αποτελέσματα της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης, αναφορικά με τον μέσο αριθμό σπορίων σε κάθε βαθμό προσβολής ήταν τα εξής: ο μέσος όρος σπορίων για τις 6 βαθμίδες (Καθόλου, Πολύ Μικρή, Μικρή, Μέτρια, Μεγάλη, Πολύ Μεγάλη προσβολή) ήταν για τη μέθοδο MR: 10,14, 67,87, 160,85, 355,22, 743,90 και 1840,28, ενώ για την AR ήταν: 2,92, 61,75, 157,06, 389,50, 712,67 και 1870,13 σπόρια *Nosema spp.* αντίστοιχα για κάθε προσβολή. Επιπλέον, ο μέσος όρος σπορίων για τις 4 βαθμίδες (Καθόλου, Μικρή, Μέτρια, Μεγάλη προσβολή) ήταν για τη μέθοδο MR: 2,92, 131,70, 386,23 και 1269,77, ενώ για την AR ήταν: 2,92, 119,36, 369,64 και 1280,26 σπόρια *Nosema* αντίστοιχα για κάθε προσβολή. Γίνεται λοιπόν κατανοητό, πως στην διπλωματική μελέτη εξετάστηκαν και οι βαθμοί προσβολής: «Καθόλου», «Πολύ Μικρή» και «Πολύ Μεγάλη» προσβολή. Άξιο παρατήρησης, είναι ότι οι [Emsen et al., \(2020\)](#), υιοθετούν τους βαθμούς προσβολής που επικρατούν μέχρι σήμερα, οι οποίοι είναι: Μικρή, Μέτρια, Μεγάλη προσβολή ([Cantwell, 1970](#)), ενώ στην έρευνα των [Duquesne et al., \(2021\)](#), δεν προσεγγίζονται οι βαθμοί προσβολής, παρά μόνο ως αναφορά από μεμονωμένα εργαστήρια. Συγκεκριμένα, σε αυτή τη μελέτη ([Duquesne et al., 2021](#)), από τους 23 συμμετέχοντες στο ILC, οι δύο δεν πραγματοποίησαν την προτεινόμενη μέθοδο ρουτίνας, καθώς προτίμησαν να κάνουν μια ημι-ποσοτική αξιολόγηση του φορτίου σπορίων *Nosema spp.* (προτείνοντας τις εξής κατηγορίες προσβολής: «σποραδική εμφάνιση», «μικρή προσβολή», «μέτρια προσβολή», «μεγάλη προσβολή», ανάλογα με τον αριθμό των σπορίων που παρατηρούνται ανά μικροσκοπικό πεδίο). Άλλες εκτιμήσεις βαθμών προσβολής με ποσοστά κατά τον [Randy, \(2019\)](#), δείχνουν ότι τα όρια για να επέμβει ο μελισσοκόμος είναι τα εξής: α) μια προσβολή 10% όπου δεν ξεπερνά το όριο οικονομικής ζημιάς, επομένως θεωρείται «ανεκτή» προσβολή». Αντίθετα, β) η προσβολή 30-40% πιθανώς να δημιουργήσει πρόβλημα στις μέλισσες, άρα χρειάζεται θεραπεία με τα εκάστοτε

εγκεκριμένα σκευάσματα. Για παράδειγμα, ο ίδιος ερευνητής θεωρεί πως αν μία στις δέκα μέλισσες είναι προσβεβλημένες από την ασθένεια, τότε κατά προσέγγιση θεωρείται  $\leq 10\%$  που αντιπροσωπεύει το βαθμό προσβολής των μελισσιών, ενώ αν είναι οι τέσσερις από τις δέκα μέλισσες είναι  $\geq 30\%$ . Σε αυτή την έρευνα (Randy, 2019), δεν προσεγγίζεται ο αριθμός σπορίων, καθώς δεν υπάρχουν αναφορές για τον ελάχιστο αριθμό σπορίων *Nosema spp.* που είναι υπεύθυνα για την πρόκληση μόλυνσης σε φυσικές συνθήκες (Sulborska et al., 2019). Έτσι, δεν δύναται να υπολογιστεί με ακρίβεια σε ποσοστό ο αντιπροσωπευτικός αριθμός σπορίων που να ξεκαθαρίζει τα όρια όπου προκαλείται σημαντική ζημιά στις μέλισσες. Είναι ωφέλιμο στο μέλλον με τα δεδομένα του Randy, (2019) ή και άλλες έρευνες που θα προκύψουν, να συγκριθούν με αυτά της μεταπτυχιακής μελέτης ώστε να υπολογιστεί ο κατάλληλος αλγόριθμος που να προσδιορίζει το ποσοστό προσβολής στο μελίσι με βάση τον αριθμό σπορίων που παρατηρούνται στο μικροσκόπιο.

Η μέθοδος της μεταπτυχιακής μελέτης, συγκρινόμενη με την ήδη υπάρχουσα μεθοδολογία (Cantwell, 1970), φαίνεται να πλεονεκτεί αναφορικά με την ευκολία και την αμεσότητα των αποτελεσμάτων, διότι επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί για μαζική εξαγωγή των συμπερασμάτων προσβολής από Νοσεμίαση. Συνεπώς, προσφέρεται ως μια γρήγορη τεχνική ρουτίνας που δύναται να υιοθετηθεί από εξειδικευμένα εργαστήρια. Χρειάζεται να σημειωθεί, ότι στο πρωτόκολλο αυτής της μελέτης χρησιμοποιήθηκε διαφορετική μεθοδολογία στην ποσοτική καταμέτρηση από τις ήδη υπάρχουσες. Όσον αφορά, το πρωτόκολλο του Cantwell, (1970), η μεθοδολογία του χρησιμοποιείται σε πολλές μελέτες για την προσέγγιση του βαθμού προσβολής από *Nosema spp.*, καθώς γίνεται αντιληπτό πως παρέχει σημαντική ακρίβεια στην απόδοση του βαθμού προσβολής της μέλισσας, στοιχείο όμως που είναι απαραίτητο κυρίως σε επιστημονικές μελέτες και ερευνητικές δράσεις και όχι σε αναλύσεις ρουτίνας στις οποίες ο ερευνητής καλείται να εκτιμήσει τον βαθμό προσβολής του δείγματος για ενημέρωση του ενδιαφερόμενου μελισσοκόμου. Η μέθοδος Cantwell, (1970), αποτελεί μία χρονοβόρα διαδικασία που δεν βρίσκει πεδίο πρακτικής εφαρμογής σε εκείνες τις περιπτώσεις των αναλύσεων ρουτίνας που καλούνται μαζικά να φέρουν εις πέρας τα εργαστήρια που παρέχουν τέτοιες υπηρεσίες σε μελισσοκόμους. Επίσης, μολονότι υπάρχει ακρίβεια και αξιοπιστία, στη μέθοδο Cantwell, (1970), δεν υπάρχει σαφής διαχωρισμός των προσβολών ανάλογα με το εύρος του αριθμού των σπορίων. Συγκεκριμένα στις μελέτες των Duquesne et al., (2021) και των Emsen et al., (2020) υιοθετήθηκε η μέθοδος του Cantwell, (1970), ενώ στην τρέχουσα μεταπτυχιακή εργασία ακολουθήθηκε η μέθοδος με τη χρήση απλής αντικειμενοφόρου πλάκας και καταμέτρησης σπορίων στο μικροσκόπιο.

Στην διπλωματική μελέτη, όπως έγινε αναφορά προηγουμένως, έγινε εργαστηριακός έλεγχος 102 παρασκευασμάτων προερχόμενα από δείγματα εντός Ελλάδας από διάφορες περιοχές, όπου φωτογραφήθηκαν μέσω φορητής συσκευής (Alcatel Pop 4S) και στην συνέχεια στάλθηκαν 200

φωτογραφίες σε μορφή ερωτηματολογίου από το εργαστήριο Σηροτροφίας και Μελισσοκομίας του Γ.Π.Α. σε 12 εξειδικευμένους ερευνητές για αξιολόγηση. Επιπλέον, στο ερωτηματολόγιο της διπλωματικής μελέτης ζητήθηκε από τους αξιολογητές η προσέγγιση του βαθμού προσβολής. Για τη δημιουργία του συγκεκριμένου αρχείου αξιολόγησης που εστάλη ψηφιακά, αρχικά επιβεβαιώθηκε η δυνατότητα απεικόνισης του πεδίου ελέγχου στο μικροσκόπιο μέσω της διακρίβωσης της μεθόδου. Ειδικότερα, οι αξιολογητές δεν εξέτασαν στο μικροσκόπιο τα ίδια δείγματα, αλλά αξιολόγησαν τους βαθμούς προσβολής σε 200 εικόνες που στάλθηκαν στον κάθε ερευνητή ξεχωριστά. Η διαφορά με την έρευνα των [Duquesne et al., \(2021\)](#) έγκειται στο γεγονός ότι οι συμμετέχοντες έπρεπε να αναφέρουν όλη την διαδικασία (από την προετοιμασία των δειγμάτων μέχρι τη στατιστική ανάλυση). Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους [Duquesne et al., \(2021\)](#), στάλθηκαν στους 23 συμμετέχοντες εντός Ευρώπης δέκα δείγματα αξιολόγησης και ένα δείγμα «δελεασμού», με σκοπό να χρησιμοποιήσουν τις μεθόδους ρουτίνας που έχουν υιοθετηθεί από κάθε εργαστήριο. Σε αυτή τη μελέτη ([Duquesne et al., 2021](#)) είναι μικρός ο αριθμός των δειγμάτων συγκριτικά με τους [Emsen et al., \(2020\)](#), όπου συλλέχθηκαν δείγματα σε πάνω από 300 αποικίες από συγκεκριμένη περιοχή του Καναδά, όμως ήταν λιγότεροι οι συμμετέχοντες. Παρατηρείται μια παρόμοια μεθοδολογία και στους [Duquesne et al., \(2021\)](#), όπου το Εργαστήριο Αναφοράς της Ευρωπαϊκής Ένωσης (EURL-European Union Reference Laboratory) έστειλε στους ερευνητές μια διαδικτυακή έρευνα (χρησιμοποιώντας το λογισμικό Sphinx iQ2, έκδοση 7.4.0.0, Le Sphinx Development).

Στην παρούσα εργασία η κατά προσέγγιση ομαδοποίηση των βαθμών προσβολής βάση του αριθμού σπορίων είναι η εξής: 1) αναφορικά για τις έξι βαθμίδες τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι: “Καθόλου”= 0-10 (μέσος όρος 3), “Πολύ μικρή προσβολή”= 10-150 (μ.ο. 60), “Μικρή προσβολή”= 40-350 (μ.ο. 160), “Μέτρια προσβολή”= 100-750 (μ.ο. 360), “Μεγάλη προσβολή”= 200-1700 (μ.ο. 700), “Πολύ μεγάλη προσβολή”= 700+ (μ.ο. 1800). Στην συνέχεια, 2) όσον αφορά τις τέσσερις βαθμίδες: “Καθόλου”= 0-10 (μ.ο. 3), “Μικρή προσβολή”= 2-353 (μ.ο. 120), “Μέτρια προσβολή”= 120-750 (μ.ο. 370), “Μεγάλη προσβολή”= 800 + (μ.ο. 1270). Αντίθετα, με βάση τις ήδη υπάρχουσες κατά προσέγγιση ομαδοποιήσεις των βαθμών προσβολής, μετά από στατιστική ανάλυση, οι [Emsen et al., \(2020\)](#), εκτίμησαν τις παραμέτρους των μελισσιών που ταξινομούνται βάση της σοβαρότητας προσβολής από *N. ceranae* (Μικρή, Μέτρια ή Οριακή, Μεγάλη προσβολή). Συγκεκριμένα, η ταξινόμηση αναφορικά με τον αριθμό σπορίων ανά μέλισσα στο εκατομμύριο είναι: Μικρή προσβολή=1,88±0,25, Μέτρια προσβολή=1,75±0,6 και Μεγάλη προσβολή=3,21±1,58 ([Emsen et al., 2020](#)). Είναι αναγκαίο να αναφερθεί, πως και στις δύο μελέτες η ομαδοποίηση των βαθμών προσβολής είναι ενδεικτική και όχι απόλυτη, καθώς έχει σκοπό να βοηθήσει στις μελλοντικές προσπάθειες λύσης του προσδιορισμού των βαθμών προσβολής για τις εκάστοτε ρυθμιστικές υπηρεσίες (αρχές) σε κάθε χώρα που θα αποφασίσουν σχετικά με το επίπεδο μόλυνσης που είναι χρήσιμο για τους σκοπούς τους ([OIE, 2008](#)).

Ειδικότερα, αναφορικά με την κατηγορία «Καθόλου» και σύμφωνα με τα αποτελέσματα που δημιουργήθηκαν με τη βοήθεια των 12 αξιολογητών και την μέτρηση των σπορίων στις 200 φωτογραφίες, προκύπτει ότι ένα δείγμα ανήκει στο βαθμό προσβολής «Καθόλου» όταν κυμαίνεται από 0-10 σπόρια *Nosema spp.* Παρόμοια ήταν και η προσέγγιση των [Duquesne et al., \(2021\)](#), όπου όταν ένα δείγμα περιλαμβάνει  $\leq 2 \times 10^4$  σπορίων/mL ανήκει στην κατηγορία «Μη ανιχνεύσιμο». Είναι λοιπόν ωφέλιμο, σε επόμενες μελέτες να ληφθούν υπόψη και οι δύο προτάσεις των εργασιών.

Επιπροσθέτως, αξιολογήθηκε και η αντικειμενικότητα και η αξιοπιστία της μεθοδολογίας του πρωτοκόλλου που δημιουργήθηκε στην παρούσα διπλωματική μελέτη. Συγκεκριμένα, μέσω της διακρίβωσης της μεθόδου χρήσης της φορητής συσκευής για την αντικειμενική απεικόνιση πραγματικών συνθηκών (real time) στο μικροσκόπιο διαπιστώθηκε πως κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του μέσου όρου σπορίων τόσο με την ποσοτική καταμέτρηση στο μικροσκόπιο, όσο και με την ποσοτική καταμέτρηση στην φωτογραφία που λήφθηκε από το κινητό τηλέφωνο. Συνεπώς, χρησιμοποιώντας ως εξοπλισμό τη φορητή συσκευή, εκπληρώθηκε ένας από τους κυριότερους στόχους, όπου είναι η απεικόνιση σε πραγματικό χρόνο (real time), μιας οπτικής παρατήρησης σπορίων *Nosema spp.* μέσω του μικροσκοπίου, σε μια φωτογραφία. Στην συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι προσέγγισης των αποτελεσμάτων (MR & AR). Με βάση τα αποτελέσματα, αποδείχθηκε ότι δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, μεταξύ της πλειοψηφικής μεθόδου (MR) και του κατά μέσου όρου (AR). Ένα συμπέρασμα που μπορεί επομένως να εξαχθεί είναι ότι δύναται να χρησιμοποιηθούν και οι δύο μέθοδοι προσέγγισης αποτελεσμάτων. Ειδικότερα για τη μέθοδο AR, εφόσον δεν υπάρχει διαφορά με την MR, μπορεί να δώσει λύση στο πρόβλημα της διχογνωμίας όπου παρουσιάζεται σε ορισμένες περιπτώσεις. Άξιο προς συζήτηση, είναι ότι σχεδόν σε όλους τους εργαστηριακούς ελέγχους, όπως για παράδειγμα στην έρευνα των [Duquesne et al., \(2021\)](#), αξιολογήθηκε η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε με γνώμονα τα εξής κριτήρια: την ειδικότητα, την ευαισθησία, την αξιοπιστία και την ακρίβεια.

Επίσης, σύμφωνα με τις κατά προσέγγιση ομαδοποιήσεις των βαθμών προσβολής που αναφέρθηκαν προηγουμένως, παρατηρείται ότι υπάρχει η δυνατότητα χρήσης τόσο των έξι (6), όσο και των τεσσάρων (4) βαθμίδων προσβολής, καθώς δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Τα εξειδικευμένα εργαστήρια μπορούν να υιοθετήσουν οποιαδήποτε από τις δύο κατηγορίες, διότι τα αποτελέσματα δεν διαφέρουν σημαντικά. Η παραπάνω διατύπωση αποδείχθηκε με τη σύγκριση του μέσου όρου σπορίων *Nosema spp.* ανα βαθμό προσβολής (με τα ίδια αποτελέσματα) και στις δύο κατηγορίες ξεχωριστά (4 & 6 βαθμίδες) όπως παρουσιάστηκαν προηγουμένως.

Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα, φαίνεται πως η δημιουργία ενός κοινού πρωτοκόλλου για την εναρμόνιση των εργαστηριακών ελέγχων είναι αποτελεσματική, αξιόπιστη και με δυνατότητα επιλογών διαφορετικών μεθόδων (MR ή AR, τόσο στις 4, όσο και στις 6 βαθμίδες) που θα καλύπτει τις εκάστοτε ανάγκες των ερευνητών. Αξιοσημείωτη, είναι η υιοθέτηση των τεσσάρων βαθμίδων

προσβολής, διότι παρουσιάζεται ως πιο εύχρηστη προσέγγιση και με μικρότερη πιθανότητα σφάλματος. Χρειάζεται να σημειωθεί, πως η παρούσα μελέτη μπορεί επίσης να αποτελέσει μια εν δυνάμει βάση δεδομένων για τους ερευνητές που επιθυμούν να διαθέτουν ένα κοινό πρωτόκολλο, ώστε να εναρμονιστούν οι εργαστηριακοί έλεγχοι.

Άξιο προς συζήτηση, είναι ότι υπάρχουν εικόνες που δημιουργούν δυσκολίες στο προσδιορισμό των βαθμών προσβολής. Αυτό παρατηρείται τόσο στην περίπτωση της διχογνωμίας όσο και στην διαφοροποίηση αξιολογήσεων των ίδιων εικόνων. Η τελευταία περίπτωση, αναφέρεται στο γεγονός, πως για την ίδια εικόνα, ένας αξιολογητής μπορεί να διαφοροποιήσει την απάντηση του. Επίσης, συνολικά από τις 16 εικόνες που επιλέχθηκαν για την εγκυρότητα των αξιολογητών, μόλις το 56,3% αυτών διατήρησε σταθερή την απόφαση του για την επαναλαμβανόμενη φωτογραφία. Ειδικότερα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το 70% των αξιολογητών διαφοροποίησε την απάντηση του στο ερωτηματολόγιο για την ίδια εικόνα στο εξής εύρος σπορίων: 101, 237, 313, καθώς επίσης το 60% για το εύρος σπορίων: 126, 319, 573, 747, 977. Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτά, φαίνεται ότι οι τιμές σπορίων *Nosema spp.* που οδήγησαν στην διαφορά απόψεων αφορούσαν στη πλειοψηφία τους τον βαθμό της μέτριας προσβολής όπου κατά προσέγγιση η τελική οριοθέτηση σπορίων για την συγκεκριμένη κατηγορία ήταν: 120-750 σπόρια *Nosema spp.* τόσο στις 6, όσο και στις 4 βαθμίδες.

Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα, μία σημαντική παρατήρηση είναι η διαφορά στις απόψεις που παρουσιάζεται και στις τρεις περιπτώσεις, συγκεκριμένα της διχογνωμίας, της πολυγνωμίας και της διαφορετικής αξιολόγησης για την ίδια εικόνα μέσα στο ερωτηματολόγιο. Οι λόγοι για τους οποίους μπορεί να εμφανίζεται το συγκεκριμένο πρόβλημα είναι οι εξής: α) ο αριθμός των σπορίων *Nosema spp.* και σε ορισμένες εικόνες η πυκνή διάταξη μεταξύ τους, κάτι που μπορεί να δυσκολεύει στην τελική απόφαση τον αξιολογητή, β) η ευκρίνεια της φωτογραφίας (αναφορικά με τα χρώματα, σκιές κ.λπ.) γ) οι φυσαλίδες αέρα του παρασκευάσματος που μπορεί να λαμβάνονται ως σπόρια και δ) η πιθανή κάλυψη των σπορίων από γυρεόκοκκους ή από άλλα στοιχεία που παρατηρούνται στο δείγμα, παρεμποδίζοντας την οπτική παρατήρηση. Είναι κατανοητό ότι υπάρχει το ζήτημα της ύπαρξης διαφορετικών απόψεων, όπου αυτό αποτελεί μια απόδειξη, ότι ακόμη και με την παρουσία έμπειρων αξιολογητών, δεν επιτυγχάνεται σε όλες τις περιπτώσεις η συμφωνία μεταξύ τους για την εκτίμηση της προσβολής σε μία εικόνα. Επίσης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν, ακόμη και ο ίδιος αξιολογητής δυσκολεύεται να δώσει σταθερή απάντηση για τον βαθμό προσβολής σε συγκεκριμένο αριθμό σπορίων.

Ένας από τους κυριότερους στόχους, ήταν αρχικά η λύση στο συγκεκριμένο ζήτημα, όπου με τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν, υπάρχει πιθανότητα να αποτελέσουν οδηγό για να υπάρξει περιορισμός του προβλήματος και συνεπώς κοινή απόφαση μεταξύ ερευνητών για το βαθμό προσβολής. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί, εφόσον δίνεται μέσω αυτής της μελέτης, η κατά προσέγγιση ομαδοποίηση των βαθμών προσβολής, σε κάθε εργαστήριο που δύναται να χρησιμοποιήσει τα

συγκεκριμένα δεδομένα και να υιοθετήσει τη μεθοδολογία του πρωτοκόλλου για τους δικούς της σκοπούς.

Το πρωτόκολλο που δημιουργήθηκε είχε ως σκοπό τη σύντομη διαδικασία εκτίμησης του βαθμού προσβολής (δηλαδή γρήγορη μέθοδο ρουτίνας) με τέτοιο τρόπο, ώστε να υπάρχει αντικειμενικότητα και αξιοπιστία. Επίσης, για μελλοντική έρευνα θα μπορούσε να υπάρξει ο εμπλουτισμός του πρωτοκόλλου με επιπρόσθετες εικόνες και η συνεργασία με περισσότερους αξιολογητές τόσο στην Ελλάδα, όσο και στο εξωτερικό. Επιπροσθέτως, είναι απαραίτητο μετά την δημιουργία του πρωτοκόλλου να εφαρμοστεί σε πραγματικές εργαστηριακές συνθήκες για την τελική αξιολόγηση της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε στην διπλωματική εργασία. Παρομοίως, υπάρχει μια κατά προσέγγιση προσπάθεια στην ομαδοποίηση των βαθμών προσβολής τόσο από τα αποτελέσματα του πειράματος, όσο και από την έρευνα των [Emsen et al., 2020](#), που μπορούν να ληφθούν υπόψη.

Επιπλέον, όσον αφορά την συνεργασία μεταξύ ερευνητικών κέντρων και πανεπιστημίων με τους μελισσοκόμους, υπάρχει έμμεσα πρακτική βοήθεια σε αυτούς, με την επίτευξη της εναρμόνισης εργαστηριακών ελέγχων μεταξύ ερευνητών μέσω του κοινού πρωτοκόλλου. Συγκεκριμένα, γίνεται αντιληπτό πως με την υιοθέτηση της κοινής προσέγγισης των βαθμών προσβολής από τα εργαστήρια, δύναται πιο αντικειμενική ενημέρωση αλλά και βοήθεια στους μελισσοκόμους, ώστε να προβούν σε σωστούς χειρισμούς των μελισσιών.

Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη τις δυσκολίες του εργαστηριακού ελέγχου, η αξιόπιστη και εναρμονισμένη διάγνωση είναι ζωτικής σημασίας για τη διασφάλιση της ποιότητας και της παρακολούθησης των αποτελεσμάτων της έρευνας ([Duquesne et al., 2021](#)). Για την παραπάνω διατύπωση έγινε προσπάθεια να δημιουργηθεί το κοινό πρωτόκολλο, ώστε τα εργαστήρια που θα το υιοθετήσουν να μπορούν να βοηθηθούν στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της ασθένειας με βάση τον αριθμό των σπορίων *Nosema spp.*

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ξένη βιβλιογραφία

**Adl S.M., Simpson A.G., Lane C.E., Lukeš J., Bass D., Bowser S.E., Brown M., Burki F., Dunthorn M., Hampl V., Heiss A., Hoppenrath M., Lara E., le Gall L., Lynn D.H., McManus H., Mitchell E.A.D., Mozley-Standridge S.E., Wegener Parfrey L., Pawlowski J., Rueckert S., Shadwick L., Schoch C., Smirnov A. and Spiegel F.W.** (2012). The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 429–493.

DOI: [10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x)

Διαθέσιμο: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x>

(Τελευταία επίσκεψη 28/06/2020).

**Agnew, P., Becnel, J.J., Ebert, D. & Michalakis, Y.**, (2003). Symbiosis of microsporidia and insects. In: Bourtzis, K., Miller, T. (Eds.), *Insect Symbiosis*, CRC Press LLC, Florida, USA, pp. 145–163.

Διαθέσιμο: [https://www.mivegec.ird.fr/images/stories/PDF\\_files/0129.pdf](https://www.mivegec.ird.fr/images/stories/PDF_files/0129.pdf)

**Alaux C., Brunet J.L., Dussaubat C., Mondet F., Tchamitchan S., Cousin M.** (2010). Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol*, 12:774–782.

DOI: [10.1111/j.1462-2920.2009.02123.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02123.x)

Διαθέσιμο: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-2920.2009.02123.x>

(Τελευταία επίσκεψη 28/06/2020)

**Aleman M. Nout-Lomas Y.S. and Reed S. M.** (2018). Disorders of the Neurologic System. In: Reed S. M., Bayly W.M. and Sellon D.C. (Eds), *Equine Internal Medicine (Fourth Edition)*, Chapter 11, pp. 580-708.

DOI: [10.1016/B978-0-323-44329-6.00011-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44329-6.00011-5)

**Anderson D.L. and Giaccon H.** (1992) Reduced pollen collection by honey-bee (Hymenoptera, Apidae) colonies infected with *Nosema apis* and sacbrood virus, *J. Econ. Entomol.* 85, 47–51.

Διαθέσιμο: <http://www.ask-force.org/web/Bees/Anderson-Pollen-Collection-Nosema-1992.pdf>

**Andreadis, T. G.** (2007). Microsporidian parasites of mosquitoes. *American Mosquito Control Association Bulletin*, 23, 3–29.

Διαθέσιμο:

[https://www.academia.edu/19885808/MICROSPORIDIAN\\_PARASITES\\_OF\\_MOSQUITOES](https://www.academia.edu/19885808/MICROSPORIDIAN_PARASITES_OF_MOSQUITOES)

**Aurori C.M., Dezmiorean D.S., Mărghitas L.A. & Moritz R.F.A.** (2011). *Nosema apis* and *N. ceranae* in Western Honeybee (*Apis mellifera*) – Geographical Distribution and Current Methods of Diagnosis, Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies, 68(1-2): 63-70.

DOI: [10.15835/buasvmcn-asb:68:1-2:6669](https://doi.org/10.15835/buasvmcn-asb:68:1-2:6669)

Διαθέσιμο: <https://journals.usamvcluj.ro/index.php/zootehnie/article/view/6669/6021>

(Τελευταία επίσκεψη 05/07/2020)

**Bailey, L. & Ball, B. V.** (1991). Honey Bee Pathology. 2nd ed. Academic Press, London. Chap. 6, pp. 64–77, 124.

**Barbançon J.M.** (2002). Soigner et Protéger les Abeilles. In: Clément H., Bruneau E., Barbançon J.M. and Bonnaffé P. (Eds), Traite Rustica de L’apiculture. Rustica, Chap. III, pp. 102.

**Bigliardi E., Selmi M.G., Lupetti P., Corona S., Gatti S., Scaglia M. and Sacchi L.** (1996) Microsporidian spore wall: ultrastructural findings on *Encephalitozoon hellem* exospore, J. Eukaryot. Microbiol. 43: 181–186.

DOI: [10.1111/j.1550-7408.1996.tb01388.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1996.tb01388.x)

**Bigliardi E., Riparbelli M.G., Selmi M.G., Lanzarini P., Corona S., Gatti S., Scaglia M., Sacchi L.** (1998). Mechanisms of microsporidial cell division: ultrastructural study on *Encephalitozoon hellem*, J. Eukaryot. Microbiol. 45: 347–351.

DOI: [10.1111/j.1550-7408.1998.tb04547.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1998.tb04547.x)

**Bigliardi E., Riparbelli M.G., Selmi M.G., Bini L., Liberatori S., Pallini V., Bernuzzi A., Gatti S., Scaglia M. and Sacchi L.** (1999). Evidence of actin in the cytoskeleton of microsporidia, J. Eukaryot. Microbiol. 46: 410–415.

DOI: [10.1111/j.1550-7408.1999.tb04621.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04621.x)

**Bigliardi E. and Sacchi L.** (2001) Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes Infect* 3:373–379.

DOI: [10.1016/s1286-4579\(01\)01393-4](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(01)01393-4).

**Borges D.** (2015). Control of the intestinal parasite *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* using nutraceuticals, prebiotics, and probiotics. Thesis School of Environmental Sciences. Ontario, Canada: University of Guelph.

Διαθέσιμο: [https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/bitstream/handle/10214/9254/Borges\\_Daniel\\_201509\\_MSc.pdf?sequence=3&isAllowed=y](https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/bitstream/handle/10214/9254/Borges_Daniel_201509_MSc.pdf?sequence=3&isAllowed=y)



**Botias C, Martin-Hernandez R, Barrios L, Garrido-Bailon E, Nanetti A, Meana A, Higes M.** (2012b). *Nosema* spp. parasitization decreases the effectiveness of acaricide strips (Apivar VR) in treating varroosis of honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environ Microbiol Rep*, 4:57–65.  
DOI: [10.1111/j.1758-2229.2011.00299.x](https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00299.x)

**Brinkmann, H., Van Der Giezen, M., Zhou, Y., De Rancourt, G.P., Philippe, H.,** (2005). An empirical assessment of long-branch attraction artefacts in deep eukaryotic phylogenomics. *Syst. Biol.* 54, 743–757.  
DOI: [10.1080/10635150500234609](https://doi.org/10.1080/10635150500234609)

**Brosson D., Kuhn L., Delbac F., Garin J. and Texier C.** (2006). Proteomic analysis of the eukaryotic parasite *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia): a reference map for proteins expressed in late sporogonial stages. *Proteomics*. 6, 3625-3635.  
DOI: [10.1002/pmic.200500796](https://doi.org/10.1002/pmic.200500796)

**Burges H.D., Canning E.U. & Hulls J.K.** (1974). Ultrastructure of *Nosema oryzaephili* and the taxonomic value of the polar filament. *J. Invertebr. Pathol.*, 23:135–139.  
DOI: [10.1016/0022-2011\(74\)90176-1](https://doi.org/10.1016/0022-2011(74)90176-1)

**Cali A., Becnel J.J., and Takvorian P.M.** (2017). Microsporidia. In: Archibald, J.M. Simpson, A.G.B. and Slamovits, C.H., (Eds.), *Handbook of the Protists (Second Edition)*. Springer, pp. 1559-1618.  
DOI: [10.1007/978-3-319-28149-0\\_27](https://doi.org/10.1007/978-3-319-28149-0_27)

**Cavalier-Smith, T.,** (2001). What are fungi? In: McLaughlin, D.J., McLaughlin, E.G., Lemke, P.A. (Eds.), *The Mycota, Part A. Systematics and Evolution*, vol. VII. Springer Vrlg, Berlin, pp. 3–37.  
DOI: [10.1007/978-3-662-10376-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-10376-0_1)

**Cantwell.** (1970). Standard methods for counting *Nosema* spores. *American Bee Journal*, (110): 222-223.

**Capella-Gutiérrez S., Marcet-Houben M., and Gabaldón T.** (2012) Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. *BMC Biol.* 10: 47.

Διαθέσιμο: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3586952/>

(Τελευταία επίσκεψη 21/08/2020).

**Chemurot M., De Smet L., Brunain M., De Rycker R., De Graaf D.C.** (2017). *Nosema neumanni* n.sp. (Microsporidia, Nosematidae), a new microsporidian parasite of honeybees, *Apis mellifera* in Uganda. Eur. J. Protistol., 61:13-19.

Διαθέσιμο: <https://core.ac.uk/download/pdf/153399813.pdf>

**Chen Y., Evans J., Bart Smith I. & Pettis J.** (2008) *Nosema ceranae* is a long-present and widespread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States, J. Invertebr. Pathol. 97, 186–188.

DOI: [10.1016/j.jip.2007.07.010](https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.07.010)

**Chen Y.P., Evans J.D., Murphy C., Gutell R., Zuker M., Gundensen-Rindale D. & Jeff P.S.** (2009). Morphological, Molecular, and Phylogenetic Characterization of *Nosema ceranae*, a Microsporidian Parasite Isolated from the European Honey Bee, *Apis mellifera*, J. Eukaryot. Microbiol., 56(2):142–147.

DOI: [10.1111/j.1550-7408.2008.00374.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00374.x)

**Chen Y.P. and Huang Z.Y.** (2010). *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asian. Apidologie, 41: 364-374.

Διαθέσιμο: [https://www.apidologie.org/articles/apido/full\\_html/2010/03/m09154/m09154.html](https://www.apidologie.org/articles/apido/full_html/2010/03/m09154/m09154.html)

(Τελευταία επίσκεψη 31/08/2020)

**Chioveanu G., Ionescu D. and Mardare A.** (2004). Control of nosemosis—the treatment with Protofil. Apiacta, 39: 31-38.

Διαθέσιμο: <https://www.semanticscholar.org/paper/Control-of-nosemosis-the-treatment-with-%22Protofil%22-Chioveanu-Ionescu/7254ed2eaa8e0a88d25bae9d4b6748094af19b8e>

(Τελευταία επίσκεψη 8/7/2020).

**Corradi, N. and Keeling, P.J.** (2009). Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. Fungal Biol. Rev. 23, 1–8.

DOI: [10.1016/j.fbr.2009.05.001](https://doi.org/10.1016/j.fbr.2009.05.001)

**Corsaro D., Walochnik J., Venditti D., Steinmann J., Müller K. D. and Michel, R.** (2014). Microsporidia-like parasites of amoebae belong to the early fungal lineage *Rozellomycota*. Parasitol. Res. 113, 1909–1918.

DOI: [10.1007/s00436-014-3838-4](https://doi.org/10.1007/s00436-014-3838-4)

**Costa C, Lodesani M, Maistrello L** (2010). Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of *Nosema ceranae* and on the longevity of honeybees (*Apis mellifera L.*) in laboratory conditions. *Apidologie*, 41: 141–150.

Διαθέσιμο: [https://www.apidologie.org/articles/apido/full\\_html/2010/02/m09043/m09043.html](https://www.apidologie.org/articles/apido/full_html/2010/02/m09043/m09043.html)

(Τελευταία επίσκεψη 12/08/2020)

**Delbac F. and Polonais V.** (2008). The microsporidian polar tube and its role in invasion. In: Burleigh B.A. and Soldati-Favre. D. (Eds) *Molecular Mechanisms of Parasite Invasion. Sub-cellular Biochem.* 47: 208–220.

DOI: [10.1007/978-0-387-78267-6\\_17](https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6_17)

**Desportes I., Le Charpentier Y., Galian A., Bernard F., Cochand-Priollet B., Lavergne A., Ravisse P. and Modigliani R.** (1985). Occurrence of a New Microsporidan: *Enterocytozoon bieneusi* n. g., n. sp., in the Enterocytes of a Human Patient with AIDS. *J. Protozool.*, Vol. 32 (2), pp. 250-254.

DOI: [10.1111/j.1550-7408.1985.tb03046.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1985.tb03046.x)

**Didier E.S.** (2005). Microsporidiosis: An Emerging and Opportunistic Infection in Humans and Animals. *Acta Tropica*, Volume 94, Issue 1, 61-76.

DOI: [10.1016/j.actatropica.2005.01.010](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.01.010)

**Didier E.S. and Weiss L.M.** (2008). Overview of microsporidia and microsporidiosis. *Protistology* 5 (4): 243–255.

Διαθέσιμο: [https://www.zin.ru/journals/protistology/num5\\_4/didier.pdf](https://www.zin.ru/journals/protistology/num5_4/didier.pdf)

(Τελευταία επίσκεψη 06/06/2020)

**Dumitru A., Chioveanu G., Ionita M., Dobre G., Mitrea I.L.** (2017). “*In vitro*” Studies On Using Natural Essential Oils In Treatment Of Nosemosis In Honey Bees: Determination Of The Therapeutic Dose, *Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine. LXIII* (2): 2065-1295.

Διαθέσιμο: [http://veterinarymedicinejournal.usamv.ro/pdf/2017/issue\\_2/Art27.pdf](http://veterinarymedicinejournal.usamv.ro/pdf/2017/issue_2/Art27.pdf)

**Duquesne V., Gastaldi C., Del Cont A., Cougoule N., Bober A., Brunain M., Chioveanu G., Demicoli N., Paulus P.D., Somalo P.F., Filipova M., Forsgren E., Granato A., Gurgulova K., Heinikainen S., Kärssin A., Kinduriene I., Köglberger H., Ourelidis K., Ozolina Z., Pijacek M., Ocepek M.P., Schäfer M.O., Gajger I.T., Valerio M.J., Wakefield M. & Franco S. (2021).** An international inter-laboratory study on *Nosema spp.* spore detection and quantification through microscopic examination of crushed honey bee abdomens. *Journal of Microbiological Methods* Volume 184:106183.

DOI: [10.1016/j.mimet.2021.106183](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106183)

**Edlind, T. D., Li, J., Visversvara, G. S., Vodkin, M. H., McLaughlin, G. L. & Katiyar, S. K. (1996).** Phylogenetic Analysis of  $\beta$ -*Tubulin* Sequences from Amitochondrial Protozoa *Mol. Phylogenet. Evol.* 5, 359–367.

DOI: [10.1006/mpev.1996.0031](https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0031)

**Emsen B., Mora A., Lacey B., Eccles L., Kelly P.G., Medina-Flores C.A., Petukhova T., Morfin N. & Guzman-Novoa E. (2020).** Seasonality of *Nosema ceranae* Infections and Their Relationship with Honey Bee Populations, Food Stores, and Survivorship in a North American Region. *Vet. Sci.* 7(3), 131.

DOI: [10.3390/vetsci7030131](https://doi.org/10.3390/vetsci7030131)

**EPILOBEE. (2016).** A pan-European epidemiological study on honeybee colony losses 2012-2014. Version 2, European Commission.

Διαθέσιμο: [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/animals/docs/la\\_bees\\_epilobee-report\\_2012-2014.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/animals/docs/la_bees_epilobee-report_2012-2014.pdf)

**Erickson, B.W. and Blanquet, R.S. (1969).** The occurrence of chitin in the spore wall of *Glugea weissenbergi*. *J. Invert. Path.* 14, 358–364.

DOI: [10.1016/0022-2011\(69\)90162-1](https://doi.org/10.1016/0022-2011(69)90162-1)

**FAO (2015).** Nosemosis. In: *Technologies and Practices for Small Agricultural Producers (TECA): Beekeeping*, Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Διαθέσιμο: <http://www.fao.org/3/CA3135EN/ca3135en.pdf>

**FAO** (2020). Nosemosis: A fungal disease of adult honeybees. In: Technologies and Practices for Small Agricultural Producers (TECA): Beekeeping. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Chapter 6, pp. 29-33.

DOI: <https://doi.org/10.4060/ca9182en>

**Fast N.M., Logsdon Jr J.M. and Doolittle W.F.** (1999). Phylogenetic analysis of the TATA box binding protein (TBP) gene from *Nosema locustae*: evidence for a microsporidia–fungi relationship and spliceosomal intron loss. *Mol. Biol. Evol.* 16: 1415–1419.

DOI: [10.1093/oxfordjournals.molbev.a026052](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026052)

**Flegel T.W. and Pasharawipas T.** (1995). A proposal for typical meiosis in microsporidians. *Can. J. Microbiol.* 41: 1–11.

DOI: [10.1139/m95-001](https://doi.org/10.1139/m95-001)

**Forsgren E. and Fries I.** (2010). Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary Parasitology* 170 (2010) 212–217.

DOI: [10.1016/j.vetpar.2010.02.010](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.010)

**Fries I.** (1988). Infectivity and multiplication of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 19: 319–328.

DOI: [10.1051/apido:19880310](https://doi.org/10.1051/apido:19880310)

Διαθέσιμο: [https://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/1988/03/Apidologie\\_0044-8435\\_1988\\_19\\_3\\_ART0010.pdf](https://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/1988/03/Apidologie_0044-8435_1988_19_3_ART0010.pdf)

**Fries I.** (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 103:S73-S79.

DOI: [10.1016/j.jip.2009.06.017](https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.017)

Διαθέσιμο: <http://www.ask-force.org/web/Bees/Fries-Nosema-Ceranae-Europe-2010.pdf>

**Fries I, Chauzat M.P., Chen Y.P., Doublet V., Genersch E., Gisder S, Higes M, McMahon D.P., Martín-Hernández R., Natsopoulou M., Paxton R.J., Tanner G., Webster T.C. & Williams G.R.** (2013). Standard methods for *Nosema* research, *Journal of Apicultural Research*, 52:1, 1-28.

DOI: [10.3896/IBRA.1.52.1.14](https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.14)

**Fries I., Feng F., da Silva A., Slemenda S.B. and Pieniasek N.J.** (1996). *Nosema ceranae* n sp (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *Eur J Protistol* 32:356–365.

DOI: [10.1016/S0932-4739\(96\)80059-9](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(96)80059-9)

**Fries, I., Martín-Hernández, R., Meana, A., GarcíaPalencia, P. and Higes, M.** (2006). Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *J. Apic. Res.* 45 (4), 230–233.

DOI: [10.3896/IBRA.1.45.4.13](https://doi.org/10.3896/IBRA.1.45.4.13)

**Frixione E., Ruiz L., Santillan M., de Vargas L.V., Tejero J.M., Undeen A.H.** (1992). Dynamics of polar filament discharge and sporoplasm expulsion by microsporidian spores, *Cell Motil. Cytoskelet.* 22 38–50.

DOI: [10.1002/cm.970220105](https://doi.org/10.1002/cm.970220105)

**Frixione E., Ruiz L., Cerbon J. and Undeen A.H.** (1997). Germination of *Nosema algerae* (Microspora) spores: conditional inhibition by D<sub>2</sub>O, ethanol and Hg<sup>2+</sup> suggests dependence of water influx upon membrane hydration and specific transmembrane pathways. *J. Eukaryot. Microbiol.* 44, 109-116.

DOI: [10.1111/j.1550-7408.1997.tb05946.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1997.tb05946.x)

**Gajger I.T., Petrincec Z., Pinter L., Kozarić Z.** (2009). Experimental Treatment of *Nosema* Disease with “Nozevit” Phyto-pharmacological Preparation. *Apicultural Research*, 485-490.

Διαθέσιμο: [https://www.researchgate.net/publication/262375151\\_Experimental\\_treatment\\_of\\_Nosema\\_disease\\_with\\_Nozevit\\_phyto-pharmacological\\_preparation](https://www.researchgate.net/publication/262375151_Experimental_treatment_of_Nosema_disease_with_Nozevit_phyto-pharmacological_preparation)

**Genersch E.** (2010). Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 87:87–97.

DOI: [10.1007/s00253-010-2573-8](https://doi.org/10.1007/s00253-010-2573-8)

**Ghosh, K., and Weiss, L. M.** (2009). Molecular diagnostic tests for microsporidia. *Interdisc. Perspect. Infect. Dis.* 2009.

Διαθέσιμο: <https://www.hindawi.com/journals/ipid/2009/926521/> (Τελευταία επίσκεψη 29/09/2020)

**Giersch T., Berg T., Galea F., Hornitzky M.** (2009). *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie*, Springer Verlag, 40 (2), pp.117-123.

DOI: [10.1051/apido/2008065](https://doi.org/10.1051/apido/2008065)

**Gill E.E. and Fast N.M.** (2006). Assessing the microsporidia–fungi relationship: combined phylogenetic analysis of eight genes. *Gene* 375: 103–109.

DOI: [10.1016/j.gene.2006.02.023](https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.02.023)

**Gisder S., Hedtke K., Möckel N., Frielitz M.C., Linde A., Genersch E.** (2010a). Five-year cohort study of *Nosema spp.* in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Appl. Environ. Microbiol.*, 76:3032– 3038.

DOI: [10.1128/AEM.03097-09](https://doi.org/10.1128/AEM.03097-09)

Διαθέσιμο: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2863439/> (Τελευταία επίσκεψη 8/7/2020)

**Gisder S., Möckel N., Linde A., Genersch E.** (2011). A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environ. Microbiol.*, 13(2):404–413

DOI: [10.1111/j.1462-2920.2010.02346.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02346.x)

**Han B. and Weiss L.M.** (2017). Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. *Microbiol. Spectr.* 5, 97–113.

Διαθέσιμο: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5613672/> (Τελευταία επίσκεψη 29/09/2020)

**Han B., Takvorian P.M., and Weiss L.M.** (2020). Invasion of Host Cells by Microsporidia. *Front. Microbiol.*, Volume 11, Article 172, pp. 1-16

DOI: [10.3389/fmicb.2020.00172](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00172)

**Hassanein M.H.** (1951). The influence of *Nosema apis* on the larval honeybee. *Annals of Applied Biology*, 38: 844-846.

DOI: [10.1111/j.1744-7348.1951.tb07854.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1951.tb07854.x)

**Higes M., Martín R. and Meana A.** (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology* 92: 93–95.

DOI: [10.1016/j.jip.2006.02.005](https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.02.005)

**Higes M., García-Palencia P., Martín-Hernández R., Meana A.** (2007). Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology* 94: 211–217

DOI: [10.1016/j.jip.2006.11.001](https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.11.001)

**Higes M., Martín-Hernández R., Botías C., Bailon E.G., Gonzalez-Porto A.V., Barrios L., Del Nozal D.J., Bernal J.L., Jiménez J.J., Palencia P.G., Meana A.** (2008a). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol.*, 10:2659–2668.

DOI: [10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x)

**Higes M., Martin-Hernandez R., Garrido-Bailon E., Garcia-Palencia P., Meana A.** (2008b) Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *J Invertebr Pathol* 97:76–78

DOI: [10.1016/j.jip.2007.06.002](https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.06.002)

**Higes M., Martín-Hernández R., Garrido-Bailón E., González-Porto A.V., García-Palencia P., Meana A., Del Nozal M.J., R Mayo R. and Bernal J.L.** (2009). Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environmental microbiology reports*, 1(2): 110-113.

DOI: [10.1111/j.1758-2229.2009.00014.x](https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00014.x)

**Higes M., Martin-Hernandez R. and Meana A.** (2010). *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C Nosemosis, *Apidologie*, 41:375–392

DOI: [10.1051/apido/2010019](https://doi.org/10.1051/apido/2010019)

Διαθέσιμο: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00892102/document>

**Higes M., Nozal M.J., Alvaro A., Barrios L., Meana A., Martin-Hernandez R., Bernal J.** (2011). The stability and effectiveness of fumagillin in controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) infection in honey bees (*Apis mellifera*) under laboratory and field conditions. *Apidologie*, 42:364–377.

Διαθέσιμο: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01003561/document>

**Hinkle G., Morrison H.G. and Sogin M.L.** (1997). Genes coding for reverse transcriptase, DNA-directed RNA polymerase, and chitin synthase from the microsporidian *Spraguea lophii*. *Biol. Bull.* 193: 250–251.

Διαθέσιμο: [https://www.researchgate.net/publication/13840467\\_Genes\\_Coding\\_for\\_Reverse\\_Transcriptase\\_DNA-](https://www.researchgate.net/publication/13840467_Genes_Coding_for_Reverse_Transcriptase_DNA-Directed_RNA_Polymerase_and_Chitin_Synthase_From_the_Microsporidian_Spraguea_lophii)

[Directed\\_RNA\\_Polymerase\\_and\\_Chitin\\_Synthase\\_From\\_the\\_Microsporidian\\_Spraguea\\_lophii](https://www.researchgate.net/publication/13840467_Genes_Coding_for_Reverse_Transcriptase_DNA-Directed_RNA_Polymerase_and_Chitin_Synthase_From_the_Microsporidian_Spraguea_lophii)

**Hirt, R. P., Healy, B., Vossbrinck, C. R., Canning, E. U. & Embley, T. M.** (1997) A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria. *Curr. Biol.* 7, 995–998.

DOI: [10.1016/S0960-9822\(06\)00420-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(06)00420-9)

**Hirt R.P., Logsdon J.M., Healy B, Dorey M.W., Doolittle W.F., and Embley T.M.** (1999). Microsporidia are related to Fungi: Evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96, pp. 580–585.

DOI: [10.1073/pnas.96.2.580](https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.580)



**Huang W., Jiang J., Chen Y., Wang C.** (2005) Complete rRNA sequence of *Nosema ceranae* in honey bees in Europe, *J. Invertebr. Pathol.* 92, 81–83.

**Huang Z.** (2011). Effects of *Nosema* on honey bee behavior and physiology. *Bee Health*.

Διαθέσιμο: <https://bee-health.extension.org/effects-of-nosema-on-honey-bee-behavior-and-physiology/>

(Τελευταία επίσκεψη 21/07/2020)

**Huang W.F., Solter L.F., Yau P.M. and Imai B.S.** (2013), *Nosema ceranae* escapes fumagillin control in honey bees. *PLoS Pathog*, 9: e1003185.

Διαθέσιμο: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1003185>

(Τελευταία επίσκεψη 12/08/2020)

**Iturriaga, G., Suarez, R., Nova-Franco, B.,** 2009. Trehalose metabolism: from osmo-protection to signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3793–3810.

DOI: [10.3390/ijms10093793](https://doi.org/10.3390/ijms10093793)

Διαθέσιμο: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2769160/>

(Τελευταία επίσκεψη 29/6/2020)

**Jeffords M.R., Maddox J.V. & O’Hayer K.W.** (1987). Microsporidian spores in gypsy moth larval silk: a possible route of horizontal transmission. *J. Invertebr. Pathol.* 49, 332–333.

DOI: [10.1016/0022-2011\(87\)90065-6](https://doi.org/10.1016/0022-2011(87)90065-6)

**Katinka M.D., Duprat S., Cornillot E., Méténier 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. & Vivarès C.P.** (2001). Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 414: 450–453

Διαθέσιμο: <https://www.nature.com/articles/35106579>

**Keeling, P.J. & Doolittle, W.F.** (1996). Alpha-tubulin from early-diverging eukaryotic lineages and the evolution of the tubulin family. *Mol. Biol. Evol.* 13, 1297–1305.

DOI: [10.1093/oxfordjournals.molbev.a025576](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025576)

**Keeling P.J., Luker M.A. & Palmer J.D.** (2000). Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Mol. Biol. Evol.* 17: 23–31.

DOI: [10.1093/oxfordjournals.molbev.a026235](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026235)

**Keeling P.J.** (2003). Congruent evidence from alpha-tubulin and beta-tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. *Fungal Genet. Biol.* 38: 298–309.

DOI: [10.1016/S1087-1845\(02\)00537-6](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00537-6)

**Keeling, P.J.**, (2009). Five questions about Microsporidia. PLoS Pathog. 5, e1000489.

DOI:[10.1371/journal.ppat.1000489](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000489)

Διαθέσιμο:<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000489>

(Τελευταία επίσκεψη 28/06/2020)

**Kellen W.R., Chapman H.C., Clark T.B. & Lindegren, J.E.** (1965). Host–parasite relationships of some *Thelohania* from mosquitoes (Nosematidae: Microsporidia). J. Invertebr. Pathol. 7, 161–166.

DOI: [10.1016/0022-2011\(68\)90188-2](https://doi.org/10.1016/0022-2011(68)90188-2)

**Keohane E.M. and L.M. Weiss.** 1998. Characterization and function of the microsporidian polar tube: a review. Folia Parasitol. 45:117-127.

Διαθέσιμο: <https://folia.paru.cas.cz/pdfs/fo/1998/02/06.pdf>

**Klee J., Tay W.T. and Paxton R.J.** (2006) Specific and sensitive detection of *Nosema bombi* (Microsporidia: Nosematidae) in bumble bees (*Bombus* spp.; Hymenoptera: Apidae) by PCR of partial rRNA gene sequences. Journal of Invertebrate Pathology 91: 98-104.

DOI: [10.1016/j.jip.2005.10.012](https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.10.012)

**Klee J., Besana A.M., Genersch E., Gisder S., Nanetti A., Tam D.Q., Chinh TX, Puerta F, Ruz JM, Kryger P, Message D, Hatjina F, Korpela S, Fries I. and Paxton R.J.** (2007), Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western.

DOI: [10.1016/j.jip.2007.02.014](https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.02.014)

**Larsson J.I.** (1986) Ultrastructure, function and classification of Microsporidia, Protistology 1, 325–390.

**Larsson J.I.** (2005). Molecular versus morphological approach to microsporidian classification. Folia Parasitol. (Praha). 52, 143-144.

DOI: [10.14411/fp.2005.018](https://doi.org/10.14411/fp.2005.018)

**Leonard, C.A. and Hayman, J.R.** (2017). Role of host cell integrins in the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis* adherence and infection in vitro. FEMS Microbiol. Lett. 364:fnx169

DOI: [10.1093/femsle/fnx169](https://doi.org/10.1093/femsle/fnx169)

**Li W., Chen Y., Cook S.C.** (2018). Chronic *Nosema ceranae* infection inflicts comprehensive and persistent immunosuppression and accelerated lipid loss in host *Apis mellifera* honey bees. Int J Parasitol, doi:10.1016/j.ijpara.2017.11.004.

DOI: [10.1016/j.ijpara.2017.11.004](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.11.004)

**Liu T.P.** (1984). Ultrastructure of the midgut of the worker honey *Apis mellifera* heavily infected with *Nosema apis*. J. Invertebr. Pathol., 44:103–105.

DOI: [10.1016/0022-2011\(84\)90026-0](https://doi.org/10.1016/0022-2011(84)90026-0)

**Odemer R., Nilles L., Linder N. and Rosenkranz P.** (2018). Sublethal effects of clothianidin and *Nosema* spp. on the longevity and foraging activity of free flying honey bees, Ecotoxicology,

DOI: [10.1007/s10646-018-1925-5](https://doi.org/10.1007/s10646-018-1925-5)

Διαθέσιμο: [https://www.researchgate.net/publication/323847687\\_Sublethal\\_effects\\_of\\_clothianidin\\_and\\_Nosema\\_spp\\_on\\_the\\_longevity\\_and\\_foraging\\_activity\\_of\\_free\\_flying\\_honey\\_bees](https://www.researchgate.net/publication/323847687_Sublethal_effects_of_clothianidin_and_Nosema_spp_on_the_longevity_and_foraging_activity_of_free_flying_honey_bees)

**OIE**, (2008) Nosemosis of honeybees. Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines, Office International des Epizooties. Chapter 3.2.4., pp. 744-749.

Διαθέσιμο: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.02.04\\_NOSEMOSIS\\_FI\\_NAL.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.02.04_NOSEMOSIS_FI_NAL.pdf)

**Malone, L. A., Giacon, H. A. & Newton, M. R.** (1995). Comparison of the responses of some New Zealand and Australian honey bees (*Apis mellifera* L) to *Nosema apis* Z. Apidologie, 26:495–502.

DOI: [10.1051/apido:19950606](https://doi.org/10.1051/apido:19950606)

**Martín-Hernández R., Meana A., Prieto L., Salvador A.M., Garrido-Bailon E., Higes M.** (2007) Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*, Appl. Environ. Microbiol. 73, 6331–6338.

DOI: [10.1128/AEM.00270-07](https://doi.org/10.1128/AEM.00270-07)

**Martín-Hernández R., Botías C., Garrido-Bailón E., Martínez-Salvador A., Prieto L., Meana A. and Higes M.** (2012). Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? Environ. Microbiol, 14:2127–2138.

DOI: [10.1111/j.1462-2920.2011.02645.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02645.x)

**Martín-Hernández R., Bartolom C., Chejanovsky N., Le Conte Y., Dalmon A., Dussaubat C., Garcia-Palencia P., Meana A., Pinto M.A., Soroker V. and Higes M.** (2018). *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective, Environmental Microbiology, 20(4):1302–1329.

DOI: [10.1111/1462-2920.14103](https://doi.org/10.1111/1462-2920.14103)

**Matović K., Vidanović D., Manić M., Stojiljković M., Radojičić S., Debeljak Z., Šekler M. and Cirić J.** 2020. Twenty-five-year study of *Nosema* spp. in honey bees (*Apis mellifera*) in Serbia. Saudi Journal of Biological Sciences. Volume 27, Issue 1, pp 518-523.

DOI: [10.1016/j.sjbs.2019.11.012](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.11.012)

**Mayack C., Naug D.** (2013). Individual energetic state can prevail over social regulation of foraging in honeybees. *Behav Ecol Sociobiol*, 67: 929–936.

DOI: [10.1007/s00265-013-1517-6](https://doi.org/10.1007/s00265-013-1517-6)

**McGowan J., De la Mora A., Goodwin P.H., Habash M., Hamiduzzaman M.M., Kelly P.G., Guzman-Novoa E.** (2016). Viability and infectivity of fresh and cryopreserved *Nosema ceranae* spores. *J Microbiol Methods*, 131: 16–22.

DOI: [10.1016/j.mimet.2016.09.021](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.09.021)

**McCowen M.C., Callender M.E. and Lawlis J.F.** (1951). Fumagillin (H-3), a new antibiotic with amebicidal properties. *Science*, 113: 202–203.

DOI: [10.1126/science.113.2930.202](https://doi.org/10.1126/science.113.2930.202)

**Mehlhorn H.** (2008). *Encyclopedia of Parasitology*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 1021.

DOI: [10.1007/978-3-540-48996-2\\_2149](https://doi.org/10.1007/978-3-540-48996-2_2149)

**Mortensen A.N., Jack C.J., McConnell M., Teigen L., & Ellis J.** (2020). How to Quantify Nosema Spores Infection Rate in a Honey Bee Colony. *Bulletin ENY-167*. University of Florida Extension.

Διαθέσιμο: <https://edis.ifas.ufl.edu/in1123>

(Τελευταία επίσκεψη: 24/3/2021).

**Nanetti A., Rodriguez-Garcia C., Meana A., Martin- Hernandez R., Higes M.** (2015). Effect of oxalic acid on *Nosema ceranae* infection. *Res Vet Sci*, 102: 167–172.

DOI: [10.1016/j.rvsc.2015.08.003](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.08.003)

**Olson, R. E., Tiekotter, K. L., and Reno, P. W.** (1994). *Nadelspora canceri* n. g., n. sp., an unusual microsporidian parasite of the dungeness crab, *Cancer magister*. *J. Protozool.* 41, 349–359.

DOI: [10.1111/j.1550-7408.1994.tb06089.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1994.tb06089.x)

**Paşca C., Mărghițaș L.A., Şonea C., Bobiș O., Buzura-Matei I.A. and Dezmirean D.S.** (2019). A Review of *Nosema ceranae* and *Nosema apis*: Characterization and Impact for Beekeeping. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies* 76 (2): 77-87.

DOI: [10.15835/buasvmcn-asb](https://doi.org/10.15835/buasvmcn-asb)

**Paxton R.J., Klee J., Korpela S., Fries I.** (2007). *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis* *Apidologie*, Springer Verlag, 2007, 38 (6), pp.558-565.

DOI: [10.1051/apido:2007037](https://doi.org/10.1051/apido:2007037)

**Paxton R.J.** (2010). Does infection by *Nosema ceranae* cause “Colony Collapse Disorder” in honey bees (*Apis mellifera*)? J. Apic. Res., 49: 80-84.

DOI: [10.3896/IBRA.1.49.1.11](https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.11)

**Peek R., Delbac F., Speijer D., Polonais V., Greve S., Wentink-Bonnema E., Ringrose J. and van Gool T.** (2005). Carbohydrate moieties of microsporidian polar tube proteins are targeted by immunoglobulin G in immunocompetent individuals. Infect. Immun. 73, 7906-7913

Διαθέσιμο: <https://iai.asm.org/content/iai/73/12/7906.full.pdf>

**Ptaszyńska A.A., Trytek M., Borsuk G., Buczek K., Rybicka- Jasińska K., Gryko D.** (2018). Porphyrins inactivate *Nosema spp.* microsporidia, Nature: Scientific Reports, 8:5523

Διαθέσιμο: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-23678-8> (Τελευταία επίσκεψη 15/08/2020)

**Randy O.** (2019). Sick Bees–Part 16: The “Quick Squash” Method for Determining *Nosema* Prevalence in a Colony. ScientificBeekeeping.

Διαθέσιμο: <http://scientificbeekeeping.com/sick-bees-part-16-the-quick-squash-method/%201/15>

(Τελευταία επίσκεψη: 24/03/2021).

**Randy O.** (2021). Sick Bees 15: An Improved Method for *Nosema* Sampling. ScientificBeekeeping.

Διαθέσιμο: <http://scientificbeekeeping.com/sick-bees-part-15-an-improved-method-for-nosema-sampling/#authors-note> (Τελευταία επίσκεψη: 14/03/2021).

**Redhead, S.A., Kirk, P.M., Keeling, P.J., Weiss, L.M.,** (2009). Proposals to exclude the phylum microsporidia from the code. Taxon 58, 669.

DOI: [10.1002/tax.582049](https://doi.org/10.1002/tax.582049)

Διαθέσιμο: <http://www3.botany.ubc.ca/keeling/PDF/09MciroCodeTax.pdf>

**Reuter G.S. & Spivak M.** (2019). Testing for *Nosema* Spores. Department of Entomology, University of Minnesota. Bee Health.

Διαθέσιμο: <https://bee-health.extension.org/testing-for-nosema-spores/>

(Τελευταία επίσκεψη: 14/3/2021).

**Rinderer, T.E. & Sylvester, H. A.** (1978). Variation in response to *Nosema apis*, longevity, and hoarding behavior in a free-mating population of the honey bee. Ann. Entomol. Soc. Am., 71:372–374.

Διαθέσιμο: <https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/64133000/PDFFiles/1-100/059-Rinderer--Variation%20in%20Response%20to%20Nosema%20Apis.pdf>

**Ryan, J.A. & Kohler, S.L.** (2010). Virulence is context-dependent in a vertically transmitted aquatic host-microparasite system. *Int. J. Parasitol.* 40, 1665–1673.

DOI: [10.1016/j.ijpara.2010.07.004](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.07.004)

**Sanford M.T.** (2007). «A New *Nosema*». *Bee Culture*, 135 (2): 18-21.

Διαθέσιμο: [http://apisenterprises.com/papers\\_html/BC2007/A%20New%20Nosema.htm](http://apisenterprises.com/papers_html/BC2007/A%20New%20Nosema.htm)

(Τελευταία επίσκεψη 14/09/2020)

**Shadduck, J.A. and Polley, M.B.** (1978). Some factors influencing the in vitro infectivity and replication of *Encephalitozoon*.

DOI: [10.1111/j.1550-7408.1978.tb04174.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1978.tb04174.x)

**Simeunovic P., Stevanovic J., Cirkovic D., Sonja R., Lakic N., Stanisic L., Stanimirovic Z.** (2014). *Nosema ceranae* and queen age influence the reproduction and productivity of the honey bee colony. *J Apic Res*, 53: 545–554.

Διαθέσιμο: [https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.3896/IBRA.1.53.5.09?casa\\_token=tLn1SYWfIkA\\_AAAAA:FfrQ2gye0d20eaXrizayR1QtOmF3gJ3dqVjfm4Bkl4ioRpvee4HDzARP3OnsFsC\\_bTqF5NF-pg](https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.3896/IBRA.1.53.5.09?casa_token=tLn1SYWfIkA_AAAAA:FfrQ2gye0d20eaXrizayR1QtOmF3gJ3dqVjfm4Bkl4ioRpvee4HDzARP3OnsFsC_bTqF5NF-pg)

**Sina M., Alastair G., Farmer M., Andersen R., Anderson O., Barta J., Bowser S., Brugerolle G., Fensome R., Fredericq S., James T., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C., Lewis L., Lodge J., Lynn D., Mann D., Maccourt R., Mendoza L., Moestrup O., Mozley S., Nerad T., Shearer C., Smirnov A., Spiegel F., and Taylor M.** (2005). The new higher level classification of Eukaryotes with emphasis on the taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52: 399–451.

DOI: [10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x)

Διαθέσιμο: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x>

(Τελευταία επίσκεψη 16/06/2020).

**Sinpoo C., Paxton R.J., Disayathanoowata T., Krongdanga S. and Chantawannakula P.** (2018). Impact of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* on individual worker bees of the two host species (*Apis cerana* and *Apis mellifera*) and regulation of host immune response. *Journal of Insect Physiology* 105: 1–8.

DOI: [10.1016/j.jinsphys.2017.12.010](https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.12.010)

**Smith M.L.** (2012). The Honey Bee Parasite *Nosema ceranae*: Transmissible via Food Exchange? *PloS one*, 7(8): e43319

Διαθέσιμο: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0043319>

(Τελευταία επίσκεψη 30/08/2020)

**Solter L.F. & Becnel J.J.** (2000). Entomopathogenic Microsporidia. In: Lacey L.A. and Kaya H.K. (eds.), Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, Kluwer Academic Publishers, Chapter IV, pp. 231-254.

Διαθέσιμο: [https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-94-017-1547-8\\_9](https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-94-017-1547-8_9)

**Sokół R. and Michalczyk M.** (2016) Detection of *Nosema* spp. in worker bees, pollen and bee bread during the honey flow season. Acta Vet. Brno 2016, 85: 261-266

Διαθέσιμο: [https://actavet.vfu.cz/media/pdf/actavet\\_2016085030261.pdf](https://actavet.vfu.cz/media/pdf/actavet_2016085030261.pdf)

**Southern T.R., Jolly C.E., Lester M.E. and Hayman J.R.** (2007). EnP1, a microsporidian spore wall protein that enables spores to adhere to and infect host cells in vitro. Eukaryot. Cell 6, 1354–1362

Διαθέσιμο: <https://ec.asm.org/content/6/8/1354> (Τελευταία επίσκεψη 24/06/2020).

**Sprague V., Becnel J.J. & Hazard E.I.** (1992). Taxonomy of phylum Microspora, Crit. Rev. Microbiol. 18: 285–395.

Διαθέσιμο: [https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.3109/10408419209113519?casa\\_token=BY5JR-9sDtoAAAAA:Ijt7lkrEB3tq9x-9D3pogCVi60qnpMYCJmMMmycg-z8ARdSGKcMDIhjPSU8J-pwqJ7wsJuLLefs](https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.3109/10408419209113519?casa_token=BY5JR-9sDtoAAAAA:Ijt7lkrEB3tq9x-9D3pogCVi60qnpMYCJmMMmycg-z8ARdSGKcMDIhjPSU8J-pwqJ7wsJuLLefs)

**Sprague V.V. & Becnel J.J.** (1998). Note on the Name-Author-Date Combination for the Taxon MICROSPORIDIES Balbiani, 1882, When Ranked as a Phylum. J Invertebr Pathol., 71:91–4.

DOI: [10.1006/jipa.1997.4702](https://doi.org/10.1006/jipa.1997.4702)

**Sprague V. and Vernick S.H.** (1969). Light and electron microscope observations on *Nosema nelsoni* Sprague, 1950 (Microsporida, Nosematidae) with particular reference to its Golgi complex, J. Protozool. 16: 264–271.

DOI: [10.1111/j.1550-7408.1969.tb02267.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1969.tb02267.x)

**Steenkamp, E.T., Wright, J. & Baldauf, S.L.** (2006). The protistan origins of animals and fungi. Mol. Biol. Evol. 23, 93–106.

DOI: [10.1093/molbev/msj011](https://doi.org/10.1093/molbev/msj011)

**Sulborska A., Horecka B., Cebrat M., Kowalczyk M., Skrzypek T.H., Kazimierczak W., Trytek M. & Borsuk G.** (2019). Microsporidia *Nosema* spp. – obligate bee parasites are transmitted by air. Scientific Reports volume 9, Article number: 14376. Nature.

Διαθέσιμο: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-50974-8>

(Τελευταία επίσκεψη 2/03/2021).

**Szawarski N., Saez A., Domínguez E., Dickson R., De Matteis Á., Eciolaza C., Justel M., Aliano A., Solar P., Bergara I., Pons C., Bolognesi A., Carna G., Garcia W., Garcia O., Eguaras M., Lamattina L., Maggi M. and Negri P.** (2019). Effect of Abscisic Acid (ABA) Combined with Two Different Beekeeping Nutritional Strategies to Confront Overwintering: Studies on Honey Bees' Population Dynamics and Nosemosis, *Insects*, 10(329):1-14.

DOI: [10.3390/insects10100329](https://doi.org/10.3390/insects10100329)

Διαθέσιμο: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6835648/>

(Τελευταία επίσκεψη 05/07/2020).

**Takvorian P., Weiss, L. and Cali A.** (2005). The early events of *Brachiola algerae* (Microsporidia) infection: spore germination, sporoplasm structure, and development within host cells. *Folia Parasitol.* 52, 118–129.

DOI: [10.14411/fp.2005.015](https://doi.org/10.14411/fp.2005.015)

**Thomarat F., Vivares C.P. and Gouy M.** (2004). Phylogenetic analysis of the complete genome sequence of *Encephalitozoon cuniculi* supports the fungal origin of microsporidia and reveals a high frequency of fast-evolving genes. *J. Mol. Evol.* 59: 780–791.

DOI: [10.1007/s00239-004-2673-0](https://doi.org/10.1007/s00239-004-2673-0)

**UofA.** (2006). Glossary terms: Shizogony. Principles of Parasitism: An on-line laboratory tutorial in parasitology. University of Alberta.

Διαθέσιμο: <http://www.biology.ualberta.ca/parasites/ParPub/text/index/micro02i.htm>

**Undeen A.H.** (1990). A proposed mechanism for the germination of microsporidian (Protozoa: Microspora) spores, *J. Theor. Biol.* 142: 223–235.

DOI: [10.1016/S0022-5193\(05\)80223-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(05)80223-1)

**Underwood R.M. and Currie R.W.** (2009). Indoor winter fumigation with formic acid for control of *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae) and *Nosema disease*, *Nosema sp.* *J Econ Entomol*, 102: 1729–1736.

DOI: [10.1603/029.102.0501](https://doi.org/10.1603/029.102.0501).

**Utuk A.E., Cigdem F., Ahmet P., Girisgin O., Selcuk O., Aydin L.** (2016). Microscopic and molecular detection of *Nosema spp.* in honeybees of Turkey. *Apidologie*, 47(2):267–271.

DOI: [10.1007/s13592-015-0394-6](https://doi.org/10.1007/s13592-015-0394-6)



**Valentini A., Pompanon F., and Taberlet, P.** (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 110-117.

DOI: [10.1016/j.tree.2008.09.011](https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.09.011)

**Van den Heever JP, Thompson TS, Curtis JM, Ibrahim A, Pernal SF** (2014). Fumagillin: an overview of recent. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies* 76 (2) / 2019 scientific advances and their significance for apiculture. *J Agric Food Chem*, 62: 2728–2737.

DOI: [10.1021/jf4055374](https://doi.org/10.1021/jf4055374)

**Van den Heever J.P., Thompson T.S., Otto S.J.G., Curtis J.M., Ibrahim A. and Pernal S.F.** (2016). Evaluation of Fumagilin-B and other potential alternative chemotherapies against *Nosema ceranae*-infected honeybees (*Apis mellifera*) in cage trial assays. *Apidologie*, 47: 617–630.

Διαθέσιμο: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s13592-015-0409-3.pdf>

**Vávra J., Nohynkova E., Machala L. and Spala J.** (1993). An extremely rapid method for detection of microsporidia in biopsy materials from AIDS patients. *Folia Parasitol. (Praha)*. 40, 273-274.

Διαθέσιμο: <https://folia.paru.cas.cz/pdfs/fo/1993/04/05.pdf>

**Vávra J.** (1976). Structure of microsporidia, In: Bulla L.A., Cheng T.C. (Eds.), *Comparative Pathobiology*, Vol. 1, Plenum Press, New York, pp. 1–86.

Διαθέσιμο: [eBook](#)

**Vávra J. and Larsson, J.I.R.** (1999). Structure of the microsporidia. In: Wittner M. and Weiss L.M. (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*, ASM Press, Washington, D.C., pp. 7–84.

DOI: [10.1128/9781555818227.ch2](https://doi.org/10.1128/9781555818227.ch2)

**Vávra J. and Sprague V.** (1999). Glossary for the Microsporidia. In: Wittner M. and Weiss L.M. (Eds), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ASM Press, Washington, D.C., pp. 521-539.

DOI: [10.1128/9781555818227.gloss](https://doi.org/10.1128/9781555818227.gloss)

**Vávra J. and Lukeš J.** (2013). Microsporidia and ‘The Art of Living Together’. *Advances in Parasitology*, Volume 8: 253-319.

DOI: [10.1016/B978-0-12-407706-5.00004-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407706-5.00004-6)

**Vidau C., Diogon M., Aufauvre J., Fontbonne R., Vigue`s B., Brunet J.L., Texier C., Biron D.G., Blot N., El Alaoui H., Belzunces L.P., Delbac F.** (2011). Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS One*, 6: e21550.

DOI: [10.1371/journal.pone.0021550](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021550)

Διαθέσιμο: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0021550>

(Τελευταία επίσκεψη 12/07/2020)

**Vidau C., Panek J., Texier C., Biron D.G., Belzunces L.P., Le Gall M., Broussard C., Delbac F., El Alaoui H.** (2014). Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. *J Invertebr Pathol*, 121: 89–96.

DOI: [10.1016/j.jip.2014.07.002](https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.07.002)

**Vossbrinck CF, Maddox JV, Friedman S, Debrunner-Voxxbrinck BA, Woese CR.** (1987). Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature*. 326(6111): 411–414.

Διαθέσιμο: <https://www.nature.com/articles/326411a0>

**Wang Der-I. and Moeller F.E.** (1969) Histological comparisons of the development of hypopharyngeal glands in healthy and *Nosema*-infected honey bees, *J. Invertebr. Pathol.* 15, 202–206.

DOI: [10.1016/0022-2011\(69\)90098-6](https://doi.org/10.1016/0022-2011(69)90098-6)

**Weidner E., Byrd W., Scarborough A., Pleshinger J. and Sibley D.** (1984). Microsporidian spore discharge and the transfer of polaroplast organelle membrane into plasma membrane, *J. Protozool.* 31 195–198.

DOI: [10.1111/j.1550-7408.1984.tb02948.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1984.tb02948.x)

**Weidner E., Manale S.B., Halonen S.K. and Lynn J.W.** (1995) Protein membrane interaction is essential to normal assembly of the microsporidian spore invasion tube, *Biol. Bull.* 188: 128–135.

Διαθέσιμο: <https://www.thefreelibrary.com/Protein-membrane+interaction+is+essential+to+normal+assembly+of+the+...-a016921153>

(Τελευταία επίσκεψη 05/09/2020)

**Weiss L.M. and Becnel J.J.** (2014). *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 4, 5, 12, 13 and 109.

Διαθέσιμο:

[https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=k4kZBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP13&ots=oqz-SR5Aa&sig=WUuczRIllt-alfJzGkzMNdzNQgQ&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=k4kZBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP13&ots=oqz-SR5Aa&sig=WUuczRIllt-alfJzGkzMNdzNQgQ&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)

**Weiss L.M. and Keohane E.M.** (1999) Microsporidia at the Turn of the Millenium: Raleigh 1999. *J. Eukaryot. Microbiol.* Vol. 46, NO. 5: 3S-5S.

DOI: [10.1111/j.1550-7408.1999.tb06055.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb06055.x)

**Williams B.A.P., Hirt R.P., Lucocq J.M. & Embley T.M.** (2002). A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature*, Volume 418: 865–869.

Διαθέσιμο: <https://www.nature.com/articles/nature00949> (Τελευταία επίσκεψη 21/08/2020)

**Xu Y., Takvorian P., Cali A., Wang F., Zhang H., Orr G. and Weiss L.M.** (2006). Free in PMC identification of a new spore wall protein from *Encephalitozoon cuniculi*. *Infect. Immun.* 74, 239-247.

Διαθέσιμο: <https://iai.asm.org/content/iai/74/1/239.full.pdf>

**Yang, D., Pan, L., Chen, Z., Du, H., Luo, B. and Luo, J.** (2018). The roles of microsporidia spore wall proteins in the spore wall formation and polar tube anchorage to spore wall during development and infection processes. *Exp. Parasitol.* 187, 93–100.

DOI: [10.1016/j.exppara.2018.03.007](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.03.007)

**Yucel B. and Dogaroglu M.** (2005). The impact of *Nosema apis* Z. infestation of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies after using different treatment methods and their effects on the population levels of workers and honey production on consecutive years. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 8 (8): 1142 – 1145.

DOI: [10.3923/pjbs.2005.1142.1145](https://doi.org/10.3923/pjbs.2005.1142.1145)

## Ελληνική Βιβλιογραφία

**Γκόρας Γ.** (2020). Σημειώσεις του μαθήματος «Παθολογία Μέλισσας και Μεταξοσκώληκα»: Ασθένειες ακμαίων. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

**ΕΛΣΤΑΤ.** (2010). Κτηνοτροφία και Κτηνοτροφικά Προϊόντα / 2010. Ελληνική Στατιστική Αρχή, Πίνακας 01.

Διαθέσιμο: <https://www.statistics.gr/el/statistics/-/publication/SPK33/2010>

**ΕΛΣΤΑΤ.** (2011). Κτηνοτροφία και Κτηνοτροφικά Προϊόντα / 2011. Ελληνική Στατιστική Αρχή, Πίνακας 04 & 7γ.

Διαθέσιμο: <https://www.statistics.gr/el/statistics/-/publication/SPK33/2011>

**ΕΛΣΤΑΤ.** (2012). Κτηνοτροφία και Κτηνοτροφικά Προϊόντα / 2012. Ελληνική Στατιστική Αρχή, Πίνακας 04 & 7γ.

Διαθέσιμο: <https://www.statistics.gr/el/statistics/-/publication/SPK33/2012>

**ΕΛΣΤΑΤ.** (2013). Κτηνοτροφία και Κτηνοτροφικά Προϊόντα / 2013. Ελληνική Στατιστική Αρχή, Πίνακας 04 & 7γ.

Διαθέσιμο: <https://www.statistics.gr/el/statistics/-/publication/SPK33/2013>

**ΕΛΣΤΑΤ.** (2014). Κτηνοτροφία και Κτηνοτροφικά Προϊόντα / 2014. Ελληνική Στατιστική Αρχή, Πίνακας 04 & 7γ.

Διαθέσιμο: <https://www.statistics.gr/el/statistics/-/publication/SPK33/2014>

**ΕΛΣΤΑΤ.** (2015). Κτηνοτροφία και Κτηνοτροφικά Προϊόντα / 2015. Ελληνική Στατιστική Αρχή, Πίνακας 04 & 7γ.

Διαθέσιμο: <https://www.statistics.gr/el/statistics/-/publication/SPK33/2015>

**ΕΛΣΤΑΤ.** (2016). Κτηνοτροφία και Κτηνοτροφικά Προϊόντα / 2016. Ελληνική Στατιστική Αρχή, Πίνακας 04 & 7γ.

Διαθέσιμο: <https://www.statistics.gr/el/statistics/-/publication/SPK33/2016>

**ΕΛΣΤΑΤ.** (2017). Κτηνοτροφία και Κτηνοτροφικά Προϊόντα / 2017. Ελληνική Στατιστική Αρχή, Πίνακας 04 & 7γ.

Διαθέσιμο: <https://www.statistics.gr/el/statistics/-/publication/SPK33/2017>

**ΕΛΣΤΑΤ.** (2018). Κτηνοτροφία και Κτηνοτροφικά Προϊόντα / 2018. Ελληνική Στατιστική Αρχή, Πίνακας 04 & 7γ.

Διαθέσιμο: <https://www.statistics.gr/el/statistics/-/publication/SPK33/2018>

**Ευρωπαϊκή Επιτροπή.** (2019). Έκθεση της Επιτροπής προς το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και το Συμβούλιο σχετικά με την εφαρμογή των μελισσοκομικών προγραμμάτων. Βρυξέλες.

Διαθέσιμο: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2019:0635:FIN:EL:PDF>

**Θρασυβούλου Α.** (χωρίς ημερομηνία). Νοσεμίαση. Μελισσοκομική Επιθεώρηση.

Διαθέσιμο: <https://www.melissokomikiepitheorisi.gr/nosema/> (Τελευταία επίσκεψη 7/10/2020).

**Θρασυβούλου Α.** (2015). Πρακτική Μελισσοκομία: Προβλήματα Αιτίες και λύσεις. Θεσσαλονίκη, Μελισσοκομική Επιθεώρηση, σελ, 153-155.

**Καραγιάννη Α.** (2012). Εναλλακτικοί μέθοδοι αντιμετώπισης της Νοσεμίας που προκαλείται από του *Nosema ceranae*. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Θεσσαλονίκη, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

**Καραουλάνη Ο.Γ.** (2017). Συγκριτική γενωμική των μικροσποριδίων της μέλισσας. Εφαρμογή που παρουσιάζει τα σύγχρονα δεδομένα της παρασίτωσης από *Nosema* των μελισσών στην Ελλάδα. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Αθήνα, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Διαθέσιμο: [http://dspace.aua.gr/xmlui/bitstream/handle/10329/6614/Karaoulani\\_O.pdf?sequence=3](http://dspace.aua.gr/xmlui/bitstream/handle/10329/6614/Karaoulani_O.pdf?sequence=3)

**ΥΠΑΑΤ.** (2012). Στατιστικά Στοιχεία για το Μέλι. Αθήνα, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων.

Διαθέσιμο: [http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/MeliMelissokomia/Stoixeia\\_parag\\_olis\\_tis\\_xoras1.pdf](http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/MeliMelissokomia/Stoixeia_parag_olis_tis_xoras1.pdf)

**Υφαντίδης Μ.Α.** (2018). Παθήσεις του Μελισσιού: Μη συμβατικές μέθοδοι αντιμετώπισής τους. Θεσσαλονίκη, Μελισσοκομική Επιθεώρηση, σελ. 124-142.

**Brock T.D.** (2015). Βιολογία των μικροοργανισμών, 14η έκδοση. Εκδόσεις Κρήτης, Κεφάλαιο 17, σελ. 68, 620 & 635.

**Hickman C.P., Roberts L.S., Keen S.L., Eisenhour D.J., Larson A. & I' Anson H.** (2015). Ζωολογία: Ολοκληρωμένες Αρχές, Τόμος I, 16η Αμερικάνικη – 3η Ελληνική έκδοση. Utoria, σελ. 73, 193, 323, 326, 345, 346 και 349.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

**Πίνακας 16:** Αποτελέσματα αξιολογήσεων ομαδοποιημένα με την πλειοψηφική μέθοδο (MR).

	Καθόλου	Πολύ μικρή προσβολή	Μικρή προσβολή	Μέτρια προσβολή	Μεγάλη προσβολή	Πολύ μεγάλη προσβολή	Πλειοψηφία
Εικόνα 1	0	6	6	0	0	0	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ-ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 2	0	0	1	9	2	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 3	12	0	0	0	0	0	ΚΑΘΟΛΟΥ
Εικόνα 4	0	0	0	2	7	3	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 5	0	4	7	1	0	0	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 6	0	0	0	0	0	12	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 7	0	0	0	4	6	2	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 8	1	8	3	0	0	0	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 9	8	4	0	0	0	0	ΚΑΘΟΛΟΥ
Εικόνα 10	0	0	0	0	4	8	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 11	0	0	0	7	5	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 12	0	0	0	0	6	6	ΜΕΓΑΛΗ-ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 13	0	0	0	8	4	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 14	0	0	0	0	9	3	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 15	0	0	0	1	11	0	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 16	9	3	0	0	0	0	ΚΑΘΟΛΟΥ
Εικόνα 17	0	3	6	1	2	0	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 18	1	1	4	4	2	0	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ-ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 19	2	3	5	1	1	1	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 20	8	4	0	0	0	0	ΚΑΘΟΛΟΥ
Εικόνα 21	12	0	0	0	0	0	ΚΑΘΟΛΟΥ
Εικόνα 22	0	0	6	5	1	0	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 23	0	0	0	0	11	1	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 24	0	0	2	9	1	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 25	0	0	0	1	9	2	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 26	0	0	0	0	1	11	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 27	0	0	0	1	10	1	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 28	0	0	1	6	3	1	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 29	0	0	0	0	0	12	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 30	1	2	2	6	1	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 31	0	0	0	0	0	12	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 32	0	0	0	0	0	12	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 33	0	0	1	8	3	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ

Εικόνα 34	0	0	0	9	3	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 35	0	6	6	1	0	0	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ-ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 36	2	2	4	4	0	0	ΜΙΚΡΗ-ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 37	1	1	5	4	1	0	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 38	0	0	0	0	3	9	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 39	0	0	0	5	7	0	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 40	0	0	0	0	0	12	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 41	0	0	0	8	4	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 42	0	0	0	4	7	0	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 43	0	0	0	0	9	2	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 44	0	0	0	0	0	11	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 45	0	0	0	1	8	2	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 46	0	0	0	0	8	3	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 47	3	5	3	0	0	0	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 48	0	0	1	7	3	0	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 49	0	0	0	6	4	1	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 50	0	0	0	8	2	1	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 51	0	0	0	0	0	11	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 52	0	0	0	0	7	4	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 53	0	0	0	0	0	11	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 54	0	0	0	0	7	4	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 55	0	0	0	5	6	0	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 56	0	0	3	6	2	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 57	0	0	0	6	5	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 58	0	0	0	4	5	2	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 59	0	0	0	0	4	7	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 60	0	0	1	9	1	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 61	0	0	0	1	5	5	ΜΕΓΑΛΗ-ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 62	0	0	1	5	3	2	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 63	0	6	4	1	0	0	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 64	0	0	0	6	5	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 65	0	0	0	0	8	3	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 66	0	0	0	0	2	9	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 67	0	0	0	0	0	11	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 68	0	0	0	4	7	0	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 69	0	0	0	4	6	1	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 70	0	0	0	1	9	1	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ

Εικόνα 71	0	0	0	0	0	11	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 72	1	0	4	5	1	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 73	0	0	0	0	0	11	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 74	0	0	0	1	9	1	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 75	0	0	5	6	0	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 76	0	0	1	9	1	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 77	0	0	0	0	8	3	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 78	0	0	0	4	6	1	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 79	0	0	2	8	1	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 80	0	3	6	2	0	0	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 81	6	5	0	0	0	0	ΚΑΘΟΛΟΥ
Εικόνα 82	0	0	3	6	1	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 83	0	0	2	8	1	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 84	11	0	0	0	0	0	ΚΑΘΟΛΟΥ
Εικόνα 85	0	0	1	9	0	1	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 86	0	0	0	1	9	1	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 87	0	0	0	0	1	10	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 88	0	0	0	1	7	3	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 89	0	0	0	0	0	11	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 90	0	0	0	0	1	10	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 91	0	0	0	8	3	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 92	1	1	4	5	0	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 93	1	9	1	0	0	0	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 94	2	4	5	0	0	0	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 95	0	0	1	8	2	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 96	0	0	0	0	7	4	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 97	0	0	0	0	0	11	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 98	0	0	0	0	1	10	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 99	0	0	0	6	5	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 100	3	1	5	2	0	0	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 101	5	6	0	0	0	0	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 102	0	4	3	4	0	0	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ-ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 103	0	0	0	0	1	10	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 104	0	1	5	4	1	0	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 105	1	4	2	4	0	0	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ-ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 106	0	0	0	0	0	11	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 107	0	0	0	0	0	11	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ



Εικόνα 108	0	3	6	2	0	0	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 109	9	2	0	0	0	0	ΚΑΘΟΛΟΥ
Εικόνα 110	1	4	5	1	0	0	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 111	0	1	0	8	2	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 112	0	0	0	1	9	1	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 113	0	0	0	0	0	11	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 114	0	0	0	0	7	4	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 115	0	0	0	6	5	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 116	0	0	0	0	10	1	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 117	0	0	0	0	0	11	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 118	0	0	0	0	0	11	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 119	0	0	0	0	10	1	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 120	0	0	0	0	0	11	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 121	0	0	0	0	4	7	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 122	0	0	0	0	0	11	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 123	0	0	0	0	4	7	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 124	0	0	0	0	1	10	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 125	0	0	1	7	3	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 126	2	3	6	0	0	0	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 127	0	0	0	6	4	1	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 128	0	0	1	6	4	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 129	0	0	0	0	0	11	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 130	0	0	0	0	0	11	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 131	0	0	0	6	2	3	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 132	0	2	4	5	0	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 133	0	0	0	0	1	10	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 134	3	8	0	0	0	0	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 135	11	0	0	0	0	0	ΚΑΘΟΛΟΥ
Εικόνα 136	1	4	5	1	0	0	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 137	2	4	5	0	0	0	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 138	0	0	0	7	3	1	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 139	1	1	2	7	0	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 140	0	1	1	7	1	1	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 141	0	1	0	7	3	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 142	0	0	0	0	0	11	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 143	0	0	1	7	3	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 144	0	0	0	9	2	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ

Εικόνα 145	4	2	4	1	0	0	ΚΑΘΟΛΟΥ-ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 146	8	3	0	0	0	0	ΚΑΘΟΛΟΥ
Εικόνα 147	0	0	0	4	7	0	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 148	0	1	4	6	0	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 149	0	0	0	2	7	2	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 150	0	0	0	0	0	11	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 151	0	0	0	3	7	1	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 152	0	0	0	0	9	2	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 153	0	0	0	4	6	1	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 154	0	0	0	4	7	0	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 155	0	1	1	8	1	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 156	0	0	0	0	2	9	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 157	0	0	0	0	0	11	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 158	0	0	0	0	6	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 159	0	0	0	0	6	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 160	0	0	0	2	6	3	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 161	0	0	0	0	4	7	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 162	0	0	0	0	5	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 163	0	0	0	0	4	7	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 164	0	0	0	0	3	8	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 165	0	0	0	0	5	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 166	0	0	2	7	2	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 167	7	4	0	0	0	0	ΚΑΘΟΛΟΥ
Εικόνα 168	4	4	3	0	0	0	ΚΑΘΟΛΟΥ-ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 169	0	0	0	0	2	9	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 170	7	4	0	0	0	0	ΚΑΘΟΛΟΥ
Εικόνα 171	4	4	3	0	0	0	ΚΑΘΟΛΟΥ-ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 172	1	5	4	0	0	0	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 173	3	0	7	1	0	0	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 174	0	0	0	2	5	4	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 175	0	0	2	8	1	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 176	0	0	0	9	2	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 177	0	0	0	5	5	1	ΜΕΤΡΙΑ - ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 178	0	0	0	0	7	4	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 179	0	0	0	0	8	3	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 180	0	0	6	5	0	0	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 181	0	0	1	5	4	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ

Εικόνα 182	0	1	5	4	0	0	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 183	0	3	2	5	1	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 184	0	0	0	2	8	1	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 185	0	0	0	7	4	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 186	0	0	0	0	8	3	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 187	0	0	0	6	5	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 188	0	1	6	3	1	0	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 189	0	0	0	1	7	3	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 190	0	0	2	6	3	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 191	0	0	0	0	9	2	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 192	0	4	6	1	0	0	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 193	0	0	0	0	8	3	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 194	0	4	6	1	0	0	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 195	0	0	6	4	1	0	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 196	0	0	0	0	10	1	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 197	0	6	4	1	0	0	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 198	0	0	3	6	2	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 199	0	2	8	1	0	0	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
Εικόνα 200	0	0	2	8	1	0	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ

**Πίνακας 17:** Αποτελέσματα αξιολογήσεων ομαδοποιημένα με την κατά μέσο όρο μέθοδο (AR).

Εικόνες	ΑΞΙΟΛΟΓΗΤΕΣ												ΜΟ	Μ.Ο. ΜΕ ΣΤΡΟΓΓΥΛΟΠΟΙΗΣΗ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟΥ
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	3	3	3	3	3	2	2	2	3	2	2	2	2,5	3	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
2	4	4	4	5	4	4	4	4	4	5	4	3	4,083333	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	ΚΑΘΟΛΟΥ
4	5	4	6	6	5	5	5	5	5	6	5	4	5,083333	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
5	3	3	4	3	3	3	2	3	2	2	3	2	2,75	3	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
7	4	4	5	5	6	4	5	6	5	5	5	4	4,833333	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
8	3	3	3	2	3	2	2	2	2	1	2	2	2,25	2	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
9	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1,333333	1	ΚΑΘΟΛΟΥ
10	6	6	5	6	6	6	5	6	6	6	5	5	5,666667	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
11	4	4	4	5	5	4	4	4	5	5	5	4	4,416667	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
12	5	5	6	6	6	5	5	6	6	5	6	5	5,5	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
13	4	4	5	5	5	4	4	4	4	4	5	4	4,333333	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ

14	6	6	5	5	6	5	5	5	5	5	5	5	5	5,25	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
15	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	4,916667	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
16	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,25	1	ΚΑΘΟΛΟΥ
17	3	3	3	5	5	2	3	3	3	2	4	2	2	3,166667	3	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
18	4	4	4	5	5	3	3	3	2	1	4	3	3	3,416667	3	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
19	3	3	4	6	5	1	2	3	2	1	3	2	2	2,916667	3	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
20	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1,333333	1	ΚΑΘΟΛΟΥ
21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	ΚΑΘΟΛΟΥ
22	4	4	4	4	5	3	3	3	3	3	4	3	3	3,583333	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
23	5	5	5	5	6	5	5	5	5	5	5	5	5	5,083333	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
24	4	4	4	4	5	4	4	4	4	3	4	3	3	3,916667	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
25	5	5	5	6	6	5	5	4	5	5	5	5	5	5,083333	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
26	6	6	6	6	6	6	6	5	6	6	6	6	6	5,916667	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
27	5	5	5	5	6	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
28	4	4	5	5	6	4	4	3	4	4	5	4	4	4,333333	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
29	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
30	4	4	4	4	5	2	4	2	3	1	4	3	3	3,333333	3	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
31	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
32	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
33	4	4	4	5	5	4	4	4	4	5	4	3	3	4,166667	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
34	4	4	4	5	5	4	4	4	4	5	4	4	4	4,25	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
35	3	3	3	2	4	2	2	2	2	2	3	2	2	2,5	3	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
36	4	4	4	3	2	1	3	4	3	1	2	3	3	2,833333	3	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
37	3	3	4	5	4	1	3	3	3	2	4	4	4	3,25	3	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
38	6	6	6	6	6	5	6	5	6	6	6	5	5	5,75	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
39	4	4	5	5	5	4	5	4	5	5	5	4	4	4,583333	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
40	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
41	4	4	5	4	5	4	4	4	4	5	5	4	4	4,333333	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
42	4	4	5	5	5		5	5	5	4	5	4	4	4,636364	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
43	6	5	5	5	6		5	5	5	5	5	5	5	5,181818	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
44	6	6	6	6	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
45	5	5	5	5	6		5	5	5	5	6	4	4	5,090909	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
46	5	5	6	5	6		5	5	5	5	6	5	5	5,272727	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
47	3	3	3	1	2		2	2	2	1	1	2	2	2	2	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
48	4	4	4	5	5		4	4	4	3	5	4	4	4,181818	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
49	4	4	5	5	6		4	4	5	4	5	4	4	4,545455	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
50	4	4	5	4	6		4	4	4	4	5	4	4	4,363636	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
51	6	6	6	6	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
52	6	5	5	6	6		5	5	5	6	5	5	5	5,363636	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
53	6	6	6	6	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
54	5	5	5	5	6		6	5	6	6	5	5	5	5,363636	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ

55	5	4	4	5	5		4	4	5	5	5	4	4,545455	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
56	4	4	5	4	4		4	3	3	4	5	3	3,909091	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
57	5	4	5	4	5		4	4	4	5	5	4	4,454545	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
58	4	4	6	6	5		4	5	4	5	5	5	4,818182	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
59	6	6	6	6	6		5	5	5	6	6	5	5,636364	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
60	4	4	4	4	5		4	3	4	4	4	4	4	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
61	6	6	5	6	6		5	4	5	5	6	5	5,363636	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
62	4	4	4	6	6		4	3	4	5	5	5	4,545455	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
63	3	3	3	2	4		2	2	2	2	3	2	2,545455	3	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
64	4	4	5	5	5		4	4	4	5	5	4	4,454545	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
65	5	5	5	5	6		5	5	5	6	5	6	5,272727	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
66	6	6	5	5	6		6	6	6	6	6	6	5,818182	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
67	6	6	6	6	6		6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
68	4	4	5	5	5		4	5	5	5	5	4	4,636364	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
69	4	4	5	5	6		4	5	4	5	5	5	4,727273	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
70	5	5	5	4	6		5	5	5	5	5	5	5	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
71	6	6	6	6	6		6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
72	4	4	4	4	5		3	4	3	1	3	3	3,454545	3	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
73	6	6	6	6	6		6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
74	5	5	5	5	6		5	5	5	5	5	4	5	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
75	4	4	4	3	4		3	3	3	4	4	3	3,545455	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
76	4	4	4	4	5		4	4	4	4	4	3	4	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
77	6	5	5	5	6		5	5	5	6	5	5	5,272727	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
78	4	4	5	5	6		4	4	5	5	5	5	4,727273	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
79	4	4	4	4	5		3	4	4	4	4	3	3,909091	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
80	3	3	3	4	4		2	3	2	3	3	2	2,909091	3	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
81	2	2	2	2	2		1	1	1	1	1	1	1,454545	1	ΚΑΘΟΛΟΥ
82	4	4	4	-	5		3	4	3	3	4	4	3,8	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
83	4	4	4	3	5		4	3	4	4	4	4	3,909091	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
84	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	ΚΑΘΟΛΟΥ
85	4	4	4	4	6		3	4	4	4	4	4	4,090909	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
86	5	5	5	5	6		4	5	5	5	5	5	5	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
87	6	6	6	6	6		5	6	6	6	6	6	5,909091	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
88	5	5	5	5	6		4	6	5	5	6	5	5,181818	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
89	6	6	6	6	6		6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
90	6	6	6	5	6		6	6	6	6	6	6	5,909091	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
91	4	4	5	4	5		4	4	4	4	5	4	4,272727	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
92	3	3	4	3	4		4	3	4	1	2	4	3,181818	3	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
93	2	2	2	2	3		2	2	2	1	2	2	2	2	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
94	3	3	3	1	3		2	2	2	1	2	3	2,272727	2	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
95	4	4	4	4	5		4	4	4	3	5	4	4,090909	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ

96	5	5	5	6	6		5	6	5	5	6	5	5,363636	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
97	6	6	6	6	6		6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
98	6	6	6	5	6		6	6	6	6	6	6	5,909091	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
99	4	4	5	5	5		4	4	4	5	5	4	4,454545	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
100	3	4	4	1	3		3	3	2	1	1	3	2,545455	3	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
101	2	2	2	1	2		2	1	2	1	1	1	1,545455	2	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
102	4	4	4	2	4		3	2	3	2	2	3	3	3	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
103	6	6	6	5	6		6	6	6	6	6	6	5,909091	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
104	4	4	4	3	5		3	3	3	2	3	4	3,454545	3	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
105	4	4	4	3	4		2	2	2	1	2	3	2,818182	3	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
106	6	6	6	6	6		6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
107	6	6	6	6	6		6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
108	3	3	4	2	4		2	3	3	2	3	3	2,909091	3	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
109	2	2	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1,181818	1	ΚΑΘΟΛΟΥ
110	3	3	4	2	2		3	3	2	1	2	3	2,545455	3	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
111	4	4	4	4	5		4	5	4	2	4	4	4	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
112	5	5	5	5	6		5	5	5	4	5	5	5	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
113	6	6	6	6	6		6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
114	6	5	5	5	6		5	5	6	6	5	5	5,363636	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
115	4	4	5	4	5		4	5	5	4	5	4	4,454545	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
116	5	5	5	5	6		5	5	5	5	5	5	5,090909	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
117	6	6	6	6	6		6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
118	6	6	6	6	6		6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
119	5	5	5	5	6		5	5	5	5	5	5	5,090909	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
120	6	6	6	6	6		6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
121	5	5	5	6	6		5	6	6	6	6	6	5,636364	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
122	6	6	6	6	6		6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
123	6	5	5	6	6		5	5	6	6	6	6	5,636364	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
124	5	5	5	5	6		5	5	5	5	5	5	5,090909	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
125	4	4	4	5	5		4	4	4	3	5	4	4,181818	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
126	3	3	3	1	2		3	2	3	1	2	3	2,363636	2	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
127	4	4	5	5	6		4	5	4	4	5	4	4,545455	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
128	4	4	5	5	5		3	4	4	4	5	4	4,272727	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
129	6	6	6	6	6		6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
130	6	6	6	6	6		6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
131	4	4	4	6	6		4	5	4	5	6	4	4,727273	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
132	4	4	4	2	4		3	3	3	2	4	3	3,272727	3	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
133	6	6	6	5	6		6	6	6	6	6	6	5,909091	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ

134	2	2	2	1	2		2	2	2	1	1	2	1,727273	2	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
135	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	ΚΑΘΟΛΟΥ
136	3	3	4	2	3		2	3	2	1	2	3	2,545455	3	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
137	3	3	3	2	2		2	3	2	1	1	3	2,272727	2	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
138	4	4	5	5	6		4	4	5	4	4	4	4,454545	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
139	3	3	4	4	4		4	4	4	1	2	4	3,363636	3	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
140	4	4	5	3	6		4	4	4	2	4	4	4	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
141	4	4	5	4	5		4	5	4	2	4	4	4,090909	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
142	6	6	6	6	6		6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
143	4	4	5	5	5		4	4	4	3	4	4	4,181818	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
144	4	4	5	4	5		4	4	4	4	4	4	4,181818	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
145	3	3	4	1	3		2	2	1	1	1	3	2,181818	2	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
146	2	2	2	1	1		1	1	1	1	1	1	1,272727	1	ΚΑΘΟΛΟΥ
147	5	5	4	5	5		4	4	4	5	5	5	4,636364	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
148	4	4	4	3	4		3	3	3	2	4	4	3,454545	3	ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
149	4	4	5	5	6		5	5	5	5	6	5	5	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
150	6	6	6	6	6		6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
151	4	4	5	5	6		5	5	5	4	5	5	4,818182	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
152	5	5	5	5	6		5	5	5	5	6	5	5,181818	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
153	5	5	5	5	6		4	4	5	4	4	5	4,727273	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
154	5	5	4	5	5		4	5	4	4	5	5	4,636364	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
155	4	4	4	4	5		4	4	4	2	4	3	3,818182	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
156	6	6	6	6	6		5	6	6	5	6	6	5,818182	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
157	6	6	6	6	6		6	6	6	6	6	6	6	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
158	6	5	5	5	6		5	5	5	6	6	6	5,454545	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
159	5	5	6	6	6		5	5	5	6	6	6	5,545455	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
160	4	4	5	5	6		5	5	5	6	6	5	5,090909	5	ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
161	5	5	6	6	6		5	5	6	6	6	6	5,636364	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
162	5	5	6	5	6		5	5	6	6	6	6	5,545455	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
163	5	6	5	6	6		5	5	6	6	6	6	5,636364	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
164	6	6	5	6	6		5	5	6	6	6	6	5,727273	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
165	5	5	6	5	6		5	6	6	6	6	5	5,545455	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
166	4	4	5	3	5		4	4	4	4	4	3	4	4	ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
167	2	2	2	1	2		1	1	1	1	1	1	1,363636	1	ΚΑΘΟΛΟΥ
168	3	3	2	1	2		2	2	1	1	1	3	1,909091	2	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
169	6	6	6	5	6		5	6	6	6	6	6	5,818182	6	ΠΟΛΥ ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
170	2	2	2	2	1		1	1	1	1	1	1	1,363636	1	ΚΑΘΟΛΟΥ
171	3	3	3	1	1		2	2	2	1	1	2	1,909091	2	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
172	3	3	3	2	-		2	2	2	1	2	3	2,3	2	ΠΟΛΥ ΜΙΚΡΗ

																ΠΡΟΣΒΟΛΗ
173	3	3	4	1	3		3	3	3	1	1	3	2,545455	3		ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
174	4	4	5	6	6		5	5	5	5	6	6	5,181818	5		ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
175	4	4	4	4	5		4	4	4	3	4	3	3,909091	4		ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
176	4	4	5	4	5		4	4	4	4	4	4	4,181818	4		ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
177	4	4	5	5	6		4	5	4	4	5	5	4,636364	5		ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
178	6	6	5	5	6		5	5	5	5	6	5	5,363636	5		ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
179	5	5	5	5	6		5	5	5	5	6	6	5,272727	5		ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
180	3	4	4	4	4		3	3	3	3	4	3	3,454545	3		ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
181	4	4	5	5	5		4	5	4	3	6	4	4,454545	4		ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
182	3	3	5	3	4		3	4	3	2	4	4	3,454545	3		ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
183	3	3	5	4	4		2	4	2	2	4	4	3,363636	3		ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
184	5	5	5	5	6		4	5	4	5	5	5	4,909091	5		ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
185	4	4	5	4	5		4	5	4	4	5	4	4,363636	4		ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
186	5	5	5	5	6		5	5	5	6	6	5	5,272727	5		ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
187	4	4	5	5	5		4	4	4	5	5	4	4,454545	4		ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
188	3	3	5	3	4		4	3	3	2	3	4	3,363636	3		ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
189	5	5	5	4	6		5	5	5	5	6	6	5,181818	5		ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
190	4	4	5	4	5		3	4	3	5	4	4	4,090909	4		ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
191	5	5	5	5	6		5	5	5	5	6	5	5,181818	5		ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
192	3	3	4	3	2		2	3	2	2	3	3	2,727273	3		ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
193	5	5	5	5	6		5	5	5	5	6	6	5,272727	5		ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
194	3	3	4	2	3		2	3	2	2	3	3	2,727273	3		ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
195	3	3	4	3	4		3	4	3	3	4	5	3,545455	4		ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
196	5	5	5	5	6		5	5	5	5	5	5	5,090909	5		ΜΕΓΑΛΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
197	3	3	4	3	2		2	2	2	2	3	2	2,545455	3		ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
198	4	4	5	5	3		4	4	4	3	3	4	3,909091	4		ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
199	3	3	4	3	3		2	3	3	2	3	3	2,909091	3		ΜΙΚΡΗ ΠΡΟΣΒΟΛΗ
200	4	4	5	4	4		3	4	4	3	4	4	3,909091	4		ΜΕΤΡΙΑ ΠΡΟΣΒΟΛΗ

1=καθόλου, 2=πολύ μικρή, 3= μικρή, 4=μέτρια, 5=μεγάλη, 6=πολύ μεγάλη προσβολή.