

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**A mézelő méh (*Apis mellifera* L.) egyes kórokozóinak vizsgálata
különös tekintettel a vírusfertőzésekre**

PhD értekezés

Tapaszi Zsuzsanna

2010.

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....

Dr. Rusvai Miklós
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék
témavezető

Dr. Bakonyi Tamás
Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék
témabizottság tagja

Dr. Békési László
Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet
Méhtenyésztési és Méhbiológiai Kutatócsoport
témabizottság tagja

Készült 8 példányban. Ez a sz. példány.

.....

Tapaszi Zsuzsanna

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés, célkitűzések.....	5
2. Irodalmi áttekintés.....	7
2.1. A mézelő méh.....	7
2.2. A mézelő méh jelentősége.....	8
2.3. A mézelő méh fontosabb fertőző betegségei.....	9
2.3.1. Fontosabb parazitás betegségek.....	9
2.3.2. Gombák okozta betegségek.....	11
2.3.3. A mézelő méh fontosabb baktériumos betegségei.....	12
2.3.4. Vírusok okozta betegségek.....	13
3. Saját vizsgálatok.....	21
3.1. Anyag és módszer.....	21
3.1.1. A Magyarországon előforduló vírusfertőzések monitoring vizsgálata.....	21
3.1.2. Fekete anyabölcső vírus (BQCV) genotípusok genetikai vizsgálata és filogenetikai összehasonlítása.....	24
3.1.3. A <i>Nosema ceranae</i> első magyarországi kimutatása és előfordulási gyakoriságának vizsgálata.....	28
3.2. Eredmények.....	32
3.2.1. A Magyarországon előforduló vírusfertőzések monitoring vizsgálata.....	32
3.2.2. Fekete anyabölcső vírus (BQCV) genotípusok genetikai vizsgálata és filogenetikai összehasonlítása.....	34
3.2.3. A <i>Nosema ceranae</i> első magyarországi kimutatása és a <i>Nosema apis</i> -hoz viszonyított előfordulási gyakoriságának vizsgálata.....	44
3.3. Megbeszélés.....	47
3.3.1. A Magyarországon előforduló vírusfertőzések monitoring vizsgálata.....	47
3.3.2. Fekete anyabölcső vírus (BQCV) genotípusok genetikai vizsgálata és filogenetikai összehasonlítása.....	49
3.3.3. A <i>Nosema ceranae</i> első magyarországi kimutatása és a <i>Nosema apis</i> -hoz viszonyított előfordulási gyakoriságának vizsgálata.....	52
4. Új eredmények.....	55
6. Summary.....	56
7. A témával összefüggő saját közlemények jegyzéke.....	60
8. Egyéb közlemények jegyzéke.....	61
9. Előadások jegyzéke.....	62
10. Irodalomjegyzék.....	64
11. Köszönetnyilvánítás.....	75

Rövidítések jegyzéke

ABPV	=	Acute bee paralysis virus – heveny méhbénulás vírus
AGID	=	Agarose gel immunodiffusion – agróz-gél immundiffúzió
AIV	=	Apis iridescent virus – méhek irizáló vírusa
BQCV	=	Black queen cell virus – fekete anyabölcső vírus
CBPV	=	Chronic bee paralysis virus – idült méhbénulás vírus
DWV	=	Deformed wing virus – deformált szárny vírus
ELISA	=	Enzyme linked immunosorbent assay – enzimhez kötött ellenanyag-vizsgálat
IAPV	=	Israeli Acute Bee Paralysis Virus – izraeli heveny méhbénulás vírus
FV	=	Filamentous virus – fonalas vírus
KBV	=	Kashmir bee virus – Kashmir méhvírus
ITS	=	Internal Transcription Site – belső átírási hely
LSUrRNA	=	Large Subunit ribosomal RNA – riboszomális RNS nagy alegysége
ORF	=	Open Reading Frame – nyitott leolvasási keret
PBS	=	Phosphate Buffered Saline – foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldat
PCR	=	Polymerase chain reaction – polimeráz láncreakció
RdRp	=	RNA dependent RNA polymerase – RNS dependens RNS polimeráz
RT-PCR	=	Reverse Transcriptase Polymerase chain reaction – reverz transzkripció polimeráz láncreakció
RFLP	=	Restriction Fragment Length Polymorphism – restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus
SBV	=	Sacbrood virus – költéstömlősödés vírus
SSUrRNA	=	Small Subunit ribosomal RNA – riboszomális RNS kis alegysége
TSBV	=	Thai sacbrood virus – Thai költéstömlősödés vírus
UTR	=	Untranslated Region – nem kódoló szakasz

1. Bevezetés, célkitűzések

A mézelő méh (*Apis mellifera*) pollinátor (megporzó) szerepénél fogva jelentős szerepet tölt be a bioszférában. Ökológiai szempontból szerepe azért lényeges, mert segít a vadon élő növényfajok diverzitásának fenntartásában, a mezőgazdaságban pedig a kultúrnövények beporzásával hozzájárul a termés mennyiségének növekedéséhez. Emellett az általa termelt méz, viasz, propolisz, méhpempő és méhméreg fontos szerepet tölt be több iparágban (élelmiszeripar, gyógyszeripar, vegyipar).

A méhcsaládok életét és termelését számos környezeti tényező befolyásolja. Ezek közül különösen nagy a jelentősége az egyes fertőző betegségek kórokozóinak. A mézelő méhet számos baktérium (pl. *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus pluton*), gomba (pl. *Ascosphaera apis*, *Aspergillus fumigatus*) és parazita (pl. *Nosema apis*, *Nosema ceranae*, *Varroa destructor*) mellett számos vírusfaj is képes megbetegíteni. A méhek egészségvédelmében központi szerepet játszik a fertőző betegségek felismerése és az ellenük való védekezés módszereinek hatékony alkalmazása.

A Járványtani és Mikrobiológiai tanszék munkatársainak figyelmét 1997-ben egy Budapest környéki méhészetben, megfigyelt, jelentős méhelhullással járó eset irányította a korábban Magyarországon nem tanulmányozott méhvírusokra. A méh-vírusokkal kapcsolatos munkába 2002-ben kapcsolódtam be, fő célom az volt, hogy diagnosztikai módszereket dolgozzak ki a mézelő méh vírusfertőzéseinek kimutatására, ezeket felhasználva vizsgáljam a különböző kórokozók magyarországi elterjedtségét és az egyes méhvírusok biológiai, elsősorban genetikai tulajdonságait és a magyarországi méhészetekben előforduló méhvírusok rokonsági (filogenetikai) viszonyait. A csoport további célja volt ezen kívül a méh-egészségügyi problémákkal küzdő hazai méhészetek virológiai vizsgálata és az esetleges vírusfertőzöttségek kimutatása, elsősorban molekuláris diagnosztikai módszerekkel. A PhD. munka során ennek megfelelően, RT-PCR technikán alapuló módszert kívántunk kidolgozni a hazai méhcsaládokban előforduló vírusok azonosítására. Ezekkel az RT-PCR vizsgálatokra alapozott felmérésekkel tanulmányozni akartuk a méhcsaládok vírusfertőzöttségét Magyarorszag egész területén, és meg akartuk vizsgálni egyes kiválasztott méhvírusok genetikai változékonyságát.

A virológiai vizsgálatok mellett a kutatómunkám másik fő célja a mézelő méh *Nosema*-betegségét okozó egysejtű parazita vizsgálata. A betegség gyakran hasmenéssel, a megporzó tevékenység és a méztermelés csökkenésével jár, súlyos esetben a család pusztulásához is

vezethet. A kórokozó hajlamosító tényezőként szerepelhet egyes vírusfertőzések kártételének fokozásában. Egy spanyolországi 2006-os monitoring vizsgálat kimutatta, hogy az európai méhekben jelentős arányban van jelen, az eredetileg Ázsiában honos *Nosema ceranae*, míg a korábban jelenlevő *Nosema apis* csak kis mértékben fordul elő. A kutatómunka során vizsgálni kívántuk, hogy Magyarországon melyik *Nosema* faj van jelen. A két *Nosema* faj elkülönítésére ugyancsak PCR módszeren alapuló diszkriminatív diagnosztikai eljárást kívántunk kidolgozni, mivel munkánk kezdetekor (2005 nyarán) még nem állt rendelkezésre ilyen módszer.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A mézelő méh

A mézelő méh (*Apis mellifera* L.) (*Hymenoptera, Apidae*) magas fokú alkalmazkodó képessége miatt a mérsékelt övtől a trópusokig számos élőhelyen megtalálható, Dél-Afrikától Skandinávia északi határáig, illetve Nyugat-Ázsiától Európáig elterjedt. Napjainkig hozzávetőleg 25000 méh-alfajt határoztak meg, de ezek közül csak tízet sorolnak a mézelő méhek közé. A méhek legnagyobb változékonysága az USA sivatagos dél-nyugati, illetve Mexikó északi területein figyelhető meg.

A mézelő méh szociális életmódot folytató rovar. Csoportban él, amelyet családnak neveznek. A család létezésének alapja az anya, a családban az egyetlen szaporodóképes nőivarú rovar. Maga a család néhány ezer dolgozó méhből (nem szaporodóképes nőtények) és néhány száz heréből (hímek) áll (Békési, 1999).

Tavasszal a családot csak az anya és az a néhány ezer dolgozó méh alkotja, amelyek túléltek a telet. Ezek a dolgozók az előző nyár végén keltek ki. Ahogy a nappalok hossza növekszik, az anya elkezdi petéket rakni. A megtermékenyített pete diploid, és nőtény méhhé fog fejlődni. A diploid lárva sorsa a táplálástól függ. A lárvákat először méhpempővel (royal jelly) etetik, amely a dolgozó méhek fehérjében gazdag mirigyváladéka, majd mézzel, és virággal. Amelyik lárva több és hosszabb ideig kapja a méhpempőt, abból méhanya fejlődik, amelyiket rövidebb ideig etetik méhpempővel, az dolgozó méh lesz. A méhpempő a dolgozó fehérjében gazdag garatmirigy-váladéka. Amelyik pete haploid, herévé fog fejlődni (hím méh). A petéből a kifejlett rovarig tartó átalakulás időtartalma attól függ, hogy dolgozó méhről, anyáról vagy heréről van szó.. A dolgozó méhek 21 nap alatt fejlődnek petéből kifejlett rovarrá, az anyák 16, a herék 24 nap alatt. A méhek teljes átalakulással fejlődnek (holometamorphosis). A nyári dolgozó méh átlagos élettartalma 6 hét. A nyár végén kikelt méheket telelő méheknek is nevezzük, az ő élettartalmuk 6 hónap. Ősszel az anya beszünteti a petézést, és fűrtbe vonul a telelő méhekkel (Békési, 1999).

A méhek fő fehérjeforrása a pollen. Ezenkívül mézzel is táplálkoznak, ami a nektárból keletkezik a nyálukban található enzimek hatására. A pollent és a mézet a lép hexagonális sejtjeiben tárolják egész évben, így télen és a hordásszegény időszakokban ebből a raktárból jutnak táplálékforráshoz. A méhviasz a fiatal méhek által termelt váladék, amelyet a hasi

oldalán található viasztermelő mirigy segítségével állítanak elő. Az így előállított méhviaszt arra használják, hogy segítségével felépítsék a lép hexagonális sejtjeit.

2.2. A mézelő méh jelentősége

A mézelő méh jelentős szerepet játszik mind a szabad természetben, mind pedig a mezőgazdaságban (Corbet *et al.*, 1991). A kultúrnövények beporzásával hozzájárul a termés mennyiségének növekedéséhez. A méhek legalább negyven kultúrnövény-faj beporzását végzik, és a többi rovarral ellentétben, nem csak a növények nektárját, hanem a virágporát is gyűjtik. Az utóbbi időkben a növényvédő szerek fokozott használata jelenősen csökkentette számos, a beporzásban szerepet játszó vad méhfaj és egyéb rovarok számát, az intenzív mezőgazdasági tevékenységek pedig csökkentették az elterjedési területüket. A vadon élő rovarfajokkal ellentétben a mézelő méhet jobban meg lehet óvni a növényvédő szerek károsító hatásától, például úgy, hogy a vegyszerek hatásideje alatt a méheket elzárva tartják, vagy elszállítják őket távolabbi, nem kezelt területekre. Ezért az utóbbi időben a mézelő méh fokozott szerepet tölt be a vadon élő növényfajok diverzitásának fenntartásában is.

A méhek szerepe nem csak a növények beporzásában jelentős. Számos olyan anyagot is gyűjtenek vagy termelnek, amelyeket az emberiség ősidők óta fogyaszt vagy alkalmaz. A mézelő méhek évszázadokra visszamenő szelektív tenyésztése azt eredményezte, hogy sokkal több mézet állítanak elő, mint amennyire a méhcsaládnak szüksége van. A méhészek összegyűjtik a felesleges mézet, és az emberi fogyasztásra kerül. A méz mellett a viasz, a pollen, a propolisz, a méhpempő és a méhméreg több iparágban (élelmiszeripar, gyógyszeripar, vegyipar) fontos szerepet tölt be (Vincze, 2000).

Magyarországon körülbelül 900 ezer méhcsalád 15–16 ezer méhésznek jelent megélhetést. A méztermelés kedvező időjárási viszonyok között elérheti a 15-20 ezer tonnát évente, így az EU méztermelő országai között, ezzel a mennyiséggel Magyarország a második-harmadik helyet foglalja el (Fehér, 2003). Az előállított méz közel 70%-a külföldön kerül értékesítésre, és ez a mennyiség évről évre növekvő tendenciát mutat. A hazai méz legnagyobb része az Európai Unió nyugati tagállamainak piacaira kerül, mivel ezek az országok fogyasztásuknak csak kb. 50-55%-át tudják belső termelésből kielégíteni, így további szükségleteiket a keleti és déli tagállamokból, illetve harmadik országokból szerzik be. A magyarországi mézexport 80-85%-a kerül az EU piacára, ahol ez a mennyiség a közösség importjának 10%-át adja.

Különleges minőségének köszönhetően a magyarországi méz – főleg az akácméz – a nemzetközi piacokon rendkívül keresett termék.

2.3. A mézelő méh fontosabb fertőző betegségei

2.3.1. Fontosabb parazitás betegségek

A hazai méhállományokban két parazitás betegség okoz érzékeny veszteségeket: az ázsiai óriás atka (*Varroa destructor*) által előidézett fertőzés (varroosis), és a nosemosis. A többi parazitás betegség (légcsőatkakór, malpighamoebosis) rendkívül ritka, nem okoz tömegfertőzéseket és számottevő károkat a hazai méhészetekben.

2.3.1.1. A mézelő méhek Nosema-betegsége

A Nosema-betegség a mézelő méhek egysejtű parazita által okozott betegsége. A *Nosema apis* fertőzés gyakran hasmenéssel jár, a beporzási hatékonyság és a méztermelés csökkenését okozhatja, illetve súlyos fertőzés esetén a család pusztulásához is vezethet (Fries *et al.*, 1984). Amennyiben az anyák fertőzöttek a parazitával, kevesebb petét raknak, és csökken az élettartalmuk is. A parazita a kifejlett rovarok bélhámsejtjeit fertőzi (Fries, 1997), a hámsejtekből kiszabaduló spórák a bélcsatornába ürülnek, és a széklettel távoznak (Bailey *et al.*, 1983). A fertőződés mézzel, vízzel, illetve a lépek tisztítása során következhet be (L'Arrivée, 1965; Fries, 1993). Tavasszal a betegség előfordulási aránya megnövekedhet (Fries, 1993). Habár a Nosema-betegség a méheknek általánosan jelenlevő betegsége, mégis gyakran észrevétlen marad a méhészetben, mert a tünetek nem mindig súlyosak. Gyakran csak akkor ismerik fel a betegséget, amikor a méhek nagyobb hányada már fertőzött (Sathe, 2006).

A különböző *Nosema* fajok elterjedése a földrajzi helytől és a klimatikus viszonyoktól függ. Korábban a *Nosema apis* Zander az Európában élő mézelő méheket (*Apis mellifera* L.) fertőzte (Fries *et al.*, 1984), míg a *Nosema ceranae* az Ázsiában élő méh (az *Apis cerana* Fabricius) kórokozója volt (Fries *et al.*, 1996). Európában a *N. apis* elsősorban tavasszal okozott károkat a családokban. Az utóbbi években azonban azt figyelték meg, hogy a fertőzés tavasztól akár kora őszig is elhúzódhat. Ez a tendencia arra engedett következtetni, hogy esetleg nem a *N. apis* felelős a fertőzésért, hanem a másik faj, a korábban csak Ázsiában jelenlevő *N. ceranae*. Singh 1975-ben leírta, hogy a *N. apis* fertőzést okoz az Ázsiában élő mézelő méhekben is, kísérletes körülmények között pedig igazolták, hogy a *N. ceranae* képes

tartósan megtelepedni az Európában élő méhekben (Fries, 1997). Kísérletes körülmények között *Nosema ceranae*-val fertőzött méhek 100%-os elhullást mutattak 8 napon belül laboratóriumi körülmények között (Higes *et al.*, 2007). Először 2006-ban Spanyolországban mutatták ki, hogy a *N. ceranae* természetes körülmények között is előfordul, az Európában élő méhekben (Higes *et al.*, 2006), sőt felmérő vizsgálatuk során az eredetileg földrészünkön jelenlevő *N. apis*-t csak igen kis arányban találták meg. További vizsgálatok kimutatták, hogy a *N. ceranae* nagyobb virulenciával rendelkezik, mint a *N. apis*.

A *Nosema* fertőzés kimutatása többnyire mikroszkópos módszerrel történik, a béltartalom vizsgálatával. A két *Nosema* faj spóráit azonban igen nehéz egymástól elkülöníteni; ez csak elektronmikroszkópos vizsgálattal lehetséges a spórák mérete, alakja (Fries *et al.*, 1996) és a bennük lévő poláris filamentum csavarulatainak száma alapján (Burges *et al.*, 1974). Ezért a két *Nosema* faj pontos elkülönítéséhez elsősorban molekuláris biológiai vizsgálat használható. A különféle *Nosema* fajok riboszomális RNS-ét (rRNS) kódoló génszakaszokat már korábban meghatározták (Huang *et al.*, 2005). Polimeráz láncreakciót (polymerase chain reaction, PCR) és duplex-PCR módszert fejlesztettek ki a *N. apis* és a *N. ceranae* kimutatására és elkülönítésére (Higes *et al.*, 2006, Martín-Hernández *et al.*, 2007), de ezek az eredmények munkánk kezdetekor (2005 nyarán) még nem kerültek közlésre.

2.3.1.2. Varoosis

A kórokozó, a *Varroa destructor* (korábban *Varroa jacobsoni*) (*Acari*, *Varroidae*) eredetileg Ázsiában volt elterjedt, és az ázsiai méheket (*Apis cerana*) fertőzte. Az atkát először Oudemans írta le 1904-ben Indonéziában, ahol az ott élő méhfajok alkalmazkodtak az atka jelenlétéhez (Sammataro *et al.*, 2000). Azóta az atka elterjedt az egész világon, és az Európában élő mézelő méhek (*Apis mellifera* L.) körében igen nagy károkat okozhat. Észak-Amerikában és Európában az 1990-es évek elején jelentős károkat okozott, számos családot kipusztítva. Az atka sötétbarna, lapított, pajzsszerű testű ízeltlábú, mely a kifejlett méheket és a fiasítást is veszélyezteti. Az atkákat szabad szemmel is észre lehet venni a méheken, illetve a kaptársöpredékben is. A *V. destructor* csak 18-70 órát képes a méh nélkül életben maradni (De Guzman *et al.*, 1993), ezért a terjedésben fontos szerepet játszik a méhek érintkezése. A vándorló méhtartás és a fertőzött méhek importja azt eredményezte, hogy ez a parazita igen gyorsan elterjedt világszerte, és az európai méhészetekben igen súlyos károkat okozott (Beetsma, 1994, Matheson, 1996). Feltételezik, hogy az atka és a vírusfertőzések között kapcsolat lehet, és komplex betegségként „atka-vírus szindrómának” nevezték el azt a

jelenséget, mikor a családok egyidejűleg fertőzöttek voltak vírusokkal és atkával, továbbá nagy volt a családon belül a pusztulási arány (Shimanuki *et al.*, 1994). Feltételezik azt is, hogy az atka aktiválja a látens vírusfertőzéseket (Ball and Allen, 1988; Bowen-Walker *et al.*, 1999), de direkt bizonyítékot erre nem sikerült találni (Martin, 1998).

2.3.2. Gombák okozta betegségek

A gombák okozta fertőzések jól felismerhető elváltozásokat idéznek elő a fertőzött fiasításban, és legtöbbször a méhészek saját módszerekkel eredményesen védekeznek ezek ellen. Csak sporadikusan és időszakosan fordulnak elő az egyes méhészetekben, és jóllehet egy-egy családban okozhatnak érzékeny veszteségeket, gazdasági jelentőségük nem számottevő.

2.3.2.1. Költésmeszesedés (*ascosphaerosis larvarum*)

A mézelő méhek egyik gombák okozta betegsége a a költésmeszesedés, amit az *Ascosphaera apis* (*Plectomyces*, *Ascosphaerales*) nevű tömlősgomba-faj okoz. A gomba heterotallikus, amely csak akkor képes spórázni, ha az ellenkező nemű telepek (plusz és mínusz) kapcsolatba kerülnek, majd ezután mindkét micélia sötétzöld telepet hoz létre, amelyet ascocarp-nak neveznek. A kaptáron belül a dolgozó méhek terjesztik a gomba spórákat, melyek a táplálékkal jutnak az álca bélcsatornájába (Békési, 1999). A fertőzött álca a lefedés után pusztul el, és először felveszi a lép sejtjeinek hexagonális alakját, kitölti azt, majd kiszárad, és fehéres-szürke múmiává alakul (Gilliam, 1993; Shimanuki and Knox, 1991). A gombaspórák igen ellenállóak a környezeti hatásokkal szemben, és évekig túlélhetnek (Gilliam, 1993). A „higiénikus” méhek a fertőzött, elpusztult lárvákat kilövik, ilyenkor a kaptár alján vagy a bejáratnál láthatóak a szürke múmiák. A „nem higiénikus” családoknál pedig, ha megrázzuk a lépet, az zörgő hangot ad a benne maradt száradt múmiák miatt. Kutatások folynak olyan méhek kitenyésztésére, melyek megemelkedett higiénikus viselkedésük folytán hatékonyabbak a költésmeszesedés kontrollálásában (Spivak and Gilliam, 1998). A költésmeszesedés ritkán vezet a család pusztulásához, a problémát az elpusztult lárvák miatt adódó népességcsökkenésből származó méztermelés-csökkenés jelenti. Mindemellett ritkán, de előfordultak olyan esetek, melyeknél a fertőzés a család pusztulásához vezetett (Anderson, 1938; Roussy, 1962).

2.3.2.2. Költéskövesedés (aspergillosis)

A betegséget az *Aspergillus flavus* gomba okozza. Mind a fedett, mind a fedetlen fiasításban megjelenhet. A spórák a bélsatornában csíráznak ki, majd 2-3 nap alatt a felszínre törnek, és gyakran az álcát körülvevő álhártyát képeznek. Az álcák először halványbarnává esetleg zöldes-sárgává válnak, majd megkeményednek. A tömör, kemény múmiákat a méheknek nehéz kilöknüik (Maasen, 1906; Gilliam and Vandenberg, 1997). A fertőzött kifejlett méhek jelentős távolságra repülnek vagy másznak a kaptártól mielőtt elpusztulnának (Burnside, 1930). A fertőzés lefolyása rendszerint gyors, a tünetek néhány héten belül megszűnnek (Békési, 1999). Feltételezik, hogy a gomba a fertőzött léppel terjed (Betts, 1919). Egyes beszámolók szerint az antibiotikus kezelés hatására leromlott bélflóra is elősegítheti a gomba terjedését (Giauffret, 1967).

2.3.3. A mézelő méh fontosabb baktériumos betegségei

A mézelő méheknek a költésrothadás a legfontosabb fertőző betegsége állategészségügyi igazgatási és gazdasági szempontból egyaránt. Mindkét költésrothadás bejelentési kötelezettség alá tartozik. A kórokozók terjedése összefüggésben lehet a mézelő méhek illetve a fertőzött méz nemzetközi kereskedelmével (Hansen and Brodsgaard, 1999; von der Ohe and Dustmann, 1997).

2.3.3.1. Európai költésrothadás

Az európai költésrothadás, a nyitott fiasítás betegsége, melyet a *Melissococcus pluton* nevű nem spórás baktérium okoz (Bailey and Collins, 1982; Bailey, 1983). A betegség a legtöbb méztermelő országban elterjedt, kivéve Új-Zélandot és Ausztrália nyugati területeit (Hornitzky and Wilson, 1989). Az európai költésrothadás során az álcák ellapulnak, elhalnak, közben fokozatosan barnulnak, és savanykás szagot árasztanak. Az álca maradványa gyufaszállal kiemelhető, nem nyúlós. A tisztogató méhek eltávolítják az elpusztult alcákat, de ennek ellenére a baktérium átjuthat egészséges fogékony alcákra. A jól tisztogató családoknál évekig tünetmentes maradhat a fertőzés (Békési, 1999).

2.3.3.2. Nyúlós (amerikai) költésrothadás

A nyúlós (amerikai) költésrothadás a fedett fiasítás betegsége, melyet a *Paenibacillus larvae* (White) okoz (Genersch *et al.*, 2006). Ezt a spóráképző aerob baktériumot korábban *Bacillus larvae*-nak nevezték (Heyndrickx *et al.*, 1996). A *P. larvae* szintén a mézelő méh lárváiban és bábjaiban okoz tüneteket. A fertőzött lárvák elpusztulnak, majd maradványuk sűrűn folyó, nyúlós anyaggá alakul. Ezután beszárad és a sejt alján tapadó fekete „pörkké” alakul. A beszáradt pörköket a tisztogató méhek nem képesek eltávolítani. A nyúlós költésrothadás jelentős károkat képes okozni. A spórák nagyon ellenállóak, fertőzőképességük akár több évtizedig is fennmaradhat.

2.3.4. Vírusok okozta betegségek

Mivel munkám legjelentősebb részét a méhvírusokkal végzett vizsgálatok tették ki, ezekkel a kórokozókkal bővebben foglalkozom. A méhvírusok nagyobbik részét tudományos adatok hiányában egyelőre nem sikerült rendszertani egységekbe sorolni. Biológiai és morfológiai tulajdonságaik, valamint pozitív szimpla szálú RNS-ük alapján öt méhvírust, a heveny méhbénulás vírust (Acute Bee Paralysis Virus, ABPV), a fekete anyabölcső vírust (Black Queen Cell Virus, BQCV), a szárnydeformitást okozó vírust (Deformed Wing Virus, DWV), a Kashmir méhvírust (Kashmir Bee Virus, KBV) és a lárvatömlősödés vírust (Sacbrood Virus, SBV) a *picorna*-szerű vírusok közé soroltak (Allen and Ball, 1996). A későbbi, genomszerkezeti vizsgálatok rávilágítottak, hogy ezeknek a vírusoknak az RNS struktúrája inkább a calicivírusokéhoz hasonlít. Az eltérések miatt a Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság a rovarokat fertőző vírusokat az újonnan felállított *Dicistroviridae* család *Cripavirus* (Cricket paralysis-like viruses) nemzetségébe, illetve az *Iflavirus* nemzetségbe sorolták. A Magyarországon is előforduló méhvírusok közül az ABPV és a BQCV a *Cripavirus* nemzetséghez; az SBV és a DWV pedig az *Iflavirus* nemzetséghez tartozik (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Az idült méhbénulás vírus (Chronic Bee Paralysis Virus, CBPV) rendszertanilag még nem besorolt vírus.

A méhvírusok közül a költéstömlősödés vírusának létezését, mint „szűrhető ragályanyagot” már korábban felfedezték (White, 1917), de az első méhvírusokat (az idült méhbénulás vírust és a heveny méhbénulás vírust) csak 1963-ban izolálták. Azóta 18 különböző, méheket fertőző vírust azonosítottak és írtak le (Allen and Ball, 1996). A méhvírusok okozta megbetegedésekről azonban még kevés információ áll rendelkezésre. Számos vírus fertőzheti

a gazdapopulációt tünetek nélkül (Stroop and Baringer, 1982; Oldstone, 1989; De La Torre and Oldstone, 1996), ugyanis többnyire inapparens fertőzést okoznak (Bailey, 1967). Bizonyos környezeti tényezők hatására azonban az inapparens fertőzés betegség kialakulását okozhatja, mely a méhpopulációban nagyszámú egyedpusztulással járhat. A vírusos méhbetegségek vizsgálatát megnehezíti, hogy a méhek esetében az egyedi megfigyelés, diagnózis és kezelés nem lehetséges, méhegészségügyi problémák jelentkezése esetén a méhcsaládot vagy az egész méhészetet kell vizsgálni és kezelésben részesíteni.

A méhek szervezetében nem termelődik specifikus ellenanyag, ezért a méhek fertőzöttségének felderítésére a magasabbrendű állatfajokban kiterjedten alkalmazott indirekt víruskimutató (szerológiai) módszerek nem alkalmazhatók. A direkt víruskimutás legalapvetőbb módszere, a vírusok izolálása csak kísérleti állatoltással (lárvák, bábok fertőzésével) lehetséges, mert jelenleg még nem állnak rendelkezésre méh eredetű sejtvonalak. Azonban ez a munka időigényes, és további hátránya, hogy az évnél csak azon szakaszában lehetséges, mikor fiasítás áll rendelkezésre. A vírussal fertőzött méhek sokszor nem mutatnak jellemző klinikai tüneteket, ezért a fertőzés kórjelzése többnyire magának a vírusnak vagy valamely alkotórészének (nukleinsav, fehérje) kimutatásán alapul. A leggyakrabban használt fehérjekimutató módszer a méheket fertőző vírusok esetében az ELISA és az agargél immundiffúzió (AGID) (Allen and Ball, 1996), melyek gyors, olcsó és specifikus eljárások. A méheket fertőző vírusok felfedezése és kimutatása is a direkt antigénkimutató (szerológiai) eljárásokon alapult (Allen and Ball, 1995; Allen *et al.*, 1986; Anderson, 1984). Ezeknek a módszereknek az alkalmazása azonban számos nehézséggel jár. Gyakran előfordul, hogy egy méhcsaládot egyazon időben több vírus is fertőz. Amennyiben a kísérleti gerinces állatban a vírusellenes savó előállítására olyan méhek homogenizátumát használják, amelyek egyszerre egyidőben több vírussal is fertőzöttek voltak, a savó egyszerre több vírus elleni ellenanyagot is fog tartalmazni, ezért nem lehet biztonsággal alkalmazni a méhvírusok elkülönítésére (Bailey *et al.*, 1981; Stoltz *et al.*, 1995; Evans and Hung, 2000). Az egyes vírusok elkülönítésére alkalmas, monospecifikus antiszérummal csak kevés laboratórium rendelkezik (Anderson, 1984; Benjeddou *et al.*, 2001). Egyes esetekben a rokon vírusok között fellépő szerológiai keresztreakciók is megzavarhatják a pontos diagnózis felállítását (Allen and Ball, 1995; Mansy *et al.*, 1999; Rinderer and Green, 1976). Továbbá, mivel ezek az eljárások specifikus ellenanyagot igényelnek, egy bizonyos vírusfertőzés célirányos igazolására alkalmasak (igen-nem válasz), nem pedig egy ismeretlen kórkép etiológiájának felderítésére. Emellett problémát jelenthet az is, hogy a tünetmentesen fertőzött

méhek csak alacsony titerben tartalmaznak vírusokat, és ezért a fertőzés a fehérjekimutató eljárások érzékenységi küszöbe alatt maradhat. Összehasonlítva a PCR módszer érzékenységével, az AGID teszt esetén az ABPV 1:16 titerű oldata volt kimutatható, az RT-PCR során az 1:10000 titer is pozitív eredményt hozott (Bakonyi *et al.*, 2002a). A sokkal érzékenyebb indirekt ELISA sikeresen alkalmazható masszív fertőzések igazolására és diagnosztikai nyomozásra is (Calderón *et al.*, 2003).

A méhvírusok kimutatásának másik módja az elektronmikroszkópos vizsgálat lehetne. A vírusoknak ezt a morfológiai alapon történő azonosítását viszont nehezíti, hogy a legtöbb ismert méhvírusnak ikozahedrális alakú kapszidja van, hasonló méretűek (30 nm), és nem rendelkeznek burokkal (Allen and Ball 1996). Ez alól lényegében a fonalas vírus (Filamentous virus, FV) képez kivételt, amely mind alakjában, mind méretében (150×450 nm) jelentősen eltér a többi ismert méhvírustól (Bailey and Ball, 1991). További kivétel a 150 nm-es átmérőjű irizáló vírus (Apis iridescent virus, AIV). Ezeknek a vírusoknak jelen tudásunk szerint kórtani jelentősége nincs, ezért annak a ténynek, hogy felismerhetőek elektronmikroszkópos vizsgálattal, csekély a diagnosztikai jelentősége.

Az utóbbi években a biotechnológiai módszerek fejlődésével új, a kórokozók nukleinsavának kimutatására alapuló diagnosztikai eljárásokat dolgoztak ki. Ilyen például a polimeráz láncreakció, amely specifikus módon és nagy érzékenységgel képes kimutatni a mintában jelen levő kórokozók örökítő anyagát (Bakonyi *et al.*, 2002b; Benjeddou *et al.*, 2001, Evans, 2001, Grabensteiner *et al.*, 2001; Hung *et al.*, 2000; Ribiere *et al.*, 2002; Stoltz *et al.*, 1995). Az ismert kórokozó méhvírusok pozitív szimpla szálú RNS genommal rendelkeznek, ezért a méhvírusok kimutatására alkalmazott PCR-t egy reverz transzkripciónak kell megelőznie. Az RT-PCR (reverse-transcription PCR) alapú diagnosztikai módszerek alkalmazását az tette lehetővé, hogy egyre több méhvírus részleges vagy teljes genomszekvenciáját meghatározták, és génbanki adatbázisokban hozzáférhetővé tették (Ghosh *et al.*, 1999; Govan *et al.*, 2000). Multiplex RT-PCR módszert is kifejlesztettek több méhvírus egyidejű kimutatására (Benjeddou, 2001; Chen *et al.*, 2004). A PCR módszer igen alkalmas a méheket fertőző vírusok kimutatására, és számos laboratórium számára az egyetlen elérhető módszert jelenti. Bevezetésével a vírusfertőzés kimutatása gyorsabbá és megbízhatóbbá vált. Specifikus, nem igényel immun-szérumot, a minták nagyobb számban is vizsgálhatóak. A másik előnye a PCR technikának, hogy a reakció eredményeképp kapott megsokszorozott nukleinsav-termékeknek a nukleotid-sorrendjét meg lehet határozni, ami lehetőséget ad arra, hogy pontosan azonosítsuk a vizsgált vírust, másrésztől mutációk vizsgálatát teszi lehetővé, a különféle

genotípusok genetikai kapcsolatát és ezáltal a vírus genetikai változékonyságát lehet vizsgálni („filogenetikai” vizsgálatok, alignment).

Az alábbiakban szeretném részletesen ismertetni azokat a méhvírusokat, amelyek amelyek a nemzetközi szakirodalomban legtöbbször szerepelnek a felmérésekben, és amelyeknek kórtani jelentőséget tulajdonítanak. Az általuk okozott megbetegedések legfontosabb jellemzőit az 1. táblázatban tüntetem fel.

1. táblázat: A vírusok által okozott megbetegedések legfontosabb jellemzői.

Vírus neve	Tünetek
Heveny méhbénulás vírus (Acute bee paralysis virus, ABPV)	Fiasításcsökkenés, néességcsökkenés, röpképtelen méhek.
Fekete anyabölcső vírus (Black queen cell virus, BQCV)	Anyalárvák rendellenes fejlődése és pusztulása.
Idült méhbénulás vírus (Chronic bee paralysis virus, CBPV)	I. típus: röpképtelenség, remegés, II. típus (feketekór): szórtelen, fényes, duzzadt, fekete potroh.
Deformált szárny vírus (Deformed wing virus, DWV)	Fiasítás gyengítése, élettartam rövidítése, szárnydeformitás.
Költéstömlősődés vírus (Sacbrood virus, SBV)	Lárvák bábozódási zavara, lárvák pusztulása, hézagos fiasítás.

2.3.4.1. Heveny méhbénulás vírus (Acute bee paralysis virus, ABPV)

A vírus a *Dicistroviridae* család *Cripavirus* nemzetségébe tartozik (Van Regenmortel *et al.*, 2000). A legtöbb ismert méhvírushoz hasonlóan ikozahedrális alakú kapszidja van, 30 nm átmérőjű, és nem rendelkezik burokkal (Allen and Ball 1996). Szimpla szálú RNS genomja van a poli a farok nélkül 9470 nt hosszú. A genom 5' végén lévő ORF szakaszon (ORF1) a nem strukturális (enzim) fehérjék, míg a 3' végén lévő ORF szakaszon (ORF2) a szerkezeti fehérjék génjei találhatóak (Govan *et al.*, 2000). Számos országban leírták a jelenlétét, Nagy-Britanniában, Szovjetunióban, Olaszországban, Franciaországban (Bailey, 1965; Batuev, 1979; Bailey *et al.*, 1981; Faucon *et al.*, 1992) és Magyarországon is (Békési *et al.*, 1999). A vírus által okozott tünetek: a fiasítás csökkenése, a lárvák pusztulása, a népesség általános csökkenése. A vírus, nevének megfelelően a kifejlett méhek bénulását okozhatja, a méhek a kaptár bejáratánál mászkálnak, röpképtelenek. A tünetek közé tartozik a tisztogató méhek

aktivitásának csökkenése, és ez kedvez a betegség terjedésének is (Sammataro *et al.*, 2000). A vírust először laboratóriumi fertőzési kísérletek során sikerült kimutatni (Bailey *et al.*, 1963). Az ABPV az egyetlen ismert méhvírus melynek van a mézelő méhen kívül más gazdafaja is (*Bombus spp.*) (Bailey and Gibbs, 1964). A felnőtt méhek fertőzése 10^2 vírussal 8 napon belül az egyedek elhullásához vezetett (Bailey and Gibbs, 1964). A vírus gyakran inapparens módon van jelen egészséges családokban.

2.3.4.2. A fekete anyabölcső vírus (Black queen cell virus, BQCV)

A vírus szintén a *Dicistroviridae* család *Cripavirus* nemzetségébe tartozik kb. 30 nm átmérőjű, ikozahedrális kapszidszimmetriájú, burokkal nem rendelkezik. A virion pozitív szimpla szálú RNS genomot tartalmaz. A genom 8550 nukleotidból áll és két nyitott leolvasási keret található benne. Az 5' végén lévő ORF szakaszon (ORF1) a nem strukturális fehérjék (enzimek), míg a 3' végén lévő ORF szakaszon (ORF2) a szerkezeti fehérjék génei találhatóak (Leat *et al.*, 2000). Jelenlétét Európa több országában is kimutatták, különösen olyan méhészetekben, ahol a családok egyidejűleg fertőzöttek voltak a *Nosema apis* egysejtű parazitával is. Ezért a vírus terjedését összefüggésbe hozzák a *Nosema apis* egysejtű parazitával (Benjeddou *et al.*, 2001). Egy 2004-es franciaországi felmérés a méhészetek 86%-ában kimutatta kifejlett dolgozó méhekből a fekete anyabölcső vírust, és a méhészetek 23%-ában fertőzött bábokat is találtak (Tentcheva *et al.*, 2004). A vírus a nevét az általa okozott legjellemzőbb tünetről, az anyabölcső falának fekete elszíneződésről kapta. A kórokozó az anyalárvaik rendellenes fejlődését és a pusztulását okozza. A megbetegedett lárva sápadt, sárga színű, kültakarója zsákszerű, hasonlóan a lárvatömlősödés vírussal fertőzött lárvához (Bailey and Woods, 1977). A BQCV-t először fertőzött méhanyák elpusztult lárvájából és bájából mutatták ki (Bailey and Woods, 1977). Kimutatták, hogy a dolgozó- és a herefiasítás is fertőződhet BQCV-vel, de klinikai tüneteket általában nem okoz bennük, bár Németországban leírtak herékben tünetekkel jelentkező BQCV fertőzést (Side and Buchler, 2003). A BQCV fertőzés gyakran fordul elő más vírusfertőzéssel, illetve egyéb társfertőzésekkel. A DWV és BQCV fertőzés együttes jelenlétét figyelték meg leggyakrabban a fertőzött családok között (Chen *et al.*, 2004). Egyelőre még nem ismert, hogy a kevert vírusfertőzés vezethet-e genetikai rekombinációhoz az együtt élő vírusok között, és hogy az ilyen rekombináció eredményezheti-e egy új vírusfaj felbukkanását (Chen *et al.*, 2004).

2.3.4.3. Az idült méhbénulás vírus (Chronic bee paralysis virus, CBPV)

Az idült méhbénulás vírusa rendszertanilag még nem besorolt pleomorf vírus, mérete változó, $20 \times 30-65$ nm (Bailey, 1976). A vírus világszerte elterjedt, kivéve a dél-afrikai és a karib-tengeri térséget. A fertőzés a méhek röpképtelenségét, remegését okozhatja. E tüneteket korábban más fertőző betegségekkel hozták összefüggésbe, mint például a nosemosis, malpighamoebosis vagy a légcsőatka kór, azonban Bailey 1967-ben egy vizsgálat során azt találta, hogy az ilyen tüneteket mutató méhek mintáiban 70%-os a CBPV előfordulása. Kimutatták, hogy a látszólag egészséges állományokban a CBPV akkor terjed igazán, ha valamilyen oknál fogva – például hordásra alkalmatlan időjárás, rossz nektártermés, vagy az anya elvesztése miatt – megnövekszik a zsúfoltság a családon belül (Bailey *et al.*, 1983). Felvetődött, hogy a vírussal szemben tanúsított gyengébb ellenállóképesség esetleg genetikailag öröklődik (Kulincevic *et al.*, 1989). A méhcsaládok nagy telepítési sűrűsége és az ebből következő élelemhiány is hozzájárulhat a betegség terjedéséhez. A vírus által kiváltott betegségnek két megnyilvánulási formája van a tünetektől függően (I. és II. típus). Az I. típusra jellemző a remegés, röpképtelenség, míg a II. típusnak, amit magyarul feketekórnak is neveznek (angolul „black robbers”), jellemző tünete a szőrtelen, fényes, fekete, duzzadt potrohún méhek megjelenése.

2.3.4.4. A deformált szárny vírus (Deformed wing virus, DWV)

A vírus az *Iflavirus* nemzetséghez tartozik, melynek genomszerveződése hasonlít a *picorna*-szerű vírusokéhoz, egy nyílt leolvasási keretet tartalmaz, melyen az 5' véghez közeli területén vannak kódolva a szerkezeti fehérjék, és a 3' véghez közeli területén a nem szerkezeti fehérjék. Ikozahedrális, 30 nm átmérőjű kapszidja van, nem rendelkezik burokkal. Genomja 10140nt hosszú pozitív szimpla szálú RNS (Lanzi *et al.*, 2006). A vírust először Lengyelországban írták le, ma már széles körben elterjedt, megtalálható Európában, Ázsiában, a Közel-Keleten és Afrikában is (Allen and Ball, 1996). A tünetek az erősen fertőzött méhek esetében a pödrött szárnyak, duzzadt potroh, röpképtelenség, lecsökkent élettartam (Bailey and Ball, 1991). A DWV gyakran fordul elő olyan méhállományokban, amelyek fertőzöttek *Varroa destructor* atkával is. Ilyen esetekben súlyos károkat tud okozni, a felnőtt állomány és a fiasítás jelentős arányú pusztulását is előidézhetheti. Egy lengyelországi felmérés a nyár közepén gyűjtött méhminták 69%-ában mutatott ki DWV fertőzést szerológia

módszerekkel (Topolska *et al.*, 1995). A vírus bábokba oltva képes kiváltani a jellegzetes tünetet, a szárnydeformitást, melyet korábban a *Varroa* atkának tulajdonítottak. A DWV kimutatásra került *Varroa* mintákból is, az atka képes volt továbbadni a vírust a fiasításra (Ball, 1989). Kimutatták, hogy a lárvák a rajtuk élősködő atkáktól és táplálkozás közben felnőtt társaiktól fertőződnek. Ahogy a fiasításban pusztulnak a lárvák és csökken a fiasítás száma, úgy a felnőtt méhek életképessége is csökken. A felnőttként fertőződött méhek élettéljesítményét a fertőzés nem csökkenti. Ebben az esetben viszont a méhek életük végéig vírusrezervoárnak tekinthetők. A DWV elsősorban nem a család hirtelen pusztulásához vezet, hanem a korcsoportok arányát tolja el kedvezőtlen irányba, és a család legyengülését okozza. Azok a családok, melyek a téli időszakra fertőzött, gyenge egyedekkel készülnek, nagyobb eséllyel pusztulnak ki teljesen tavaszra. A DWV fertőzöttség fatális hatásai alacsony *Varroa* fertőzöttség esetén is megmutatkozhatnak (Martin, 2001). A vírus a hordási szezonban (késő márciustól kora őszig) olyan mértékű fertőzöttséget tud kialakítani, amely 2 év alatt a család kipusztulásához vezethet (Martin *et al.*, 1998). Hatása függ a hordási szezon hosszától és a fertőzés mértékétől. A vírus terjedésében az eltévedő és a rajzó méhek mellett nagy szerepet játszanak a méhészeti eszközök, és a méhek költöztetése, kereskedelme.

2.3.4.5. Költéstömlősödés vírus (Sacbrood virus SBV)

A vírus az *Iflavirus* nemzetséghez tartozik, ikozahedrális kapszidja kb. 28 nm átmérőjű, burokkal nem rendelkezik (Brčák and Kralik, 1965). Pozitív szimpla szálú RNS genomja 8832nt hosszú, egy nyílt leolvasási keretet tartalmaz, melynek szerveződése a deformált szárny víruséhoz hasonlóan alakul (az 5' véghez közeli területen található a szerkezeti fehérjéket kódoló terület, a 3' véghez közeli területen pedig a nem szerkezeti fehérjéket kódoló terület) (Gosh *et al.*, 1999). Az SBV a világon a legszélesebb körben elterjedt méhvírus. Nagy-Britanniában az elpusztult lárvák 80%-ból sikerült kimutatni, míg az egészségesnek tűnő családokban is 30%-ban jelen volt (Bailey, 1967). Elsősorban a mézelő méh lárváit fertőzi, és a fertőzés a lárva bábozódási zavaraihoz, majd a lárva pusztulásához vezet. A fertőzött lárváknak először megváltozik a színük, fehérből sárgává válnak, majd kiszáradnak, miközben tovább sötétednek, míg végül sötétbarna pörkké alakulnak (Bailey, 1975). Ez a betegség a lárvák fertőződése esetén a látható tünetek alapján viszonylag jól diagnosztizálható. A vírus ugyanakkor megfertőzheti a kifejlett méheket is, és bár klinikai tünetet nem okoz bennük, a fertőzés ily módon fennmarad a méhcsaládon belül. A vírus

általánosan elterjedt, de masszív fertőzést csak ritkán okoz, mert a fiasítást gondozó dolgozó méhek észreveszik az elpusztult lárvákat, és eltávolítják azokat a lépből. Ez meggátolja a vírus gyors terjedését (Bailey and Fernando, 1972). Járványos méretű fertőzéssel akkor kell számolni, ha a gyűjtő méhek száma jelentősen lecsökken (pl. a hordási időszak kezdetén), vagy ha a táplálékforrások szűkösek. Az SBV által okozott kár a fiasításban főleg késő ősszel jelentkezik, és károkozása olyan családokban jelentősebb, amelyek fertőzöttek *Varroa destructor* atkával is. Az atka képes a vírus átvitelére egyik méhről a másikra (Ball, 1989). A költéstömlősödés tüneteit és a betegség vírusos jellegét először White írta le 1917-ben, de Bailey és munkatársai csak 1964-ben izolálták a vírust (Bailey *et al.*, 1964).

2.3.4.6. Kashmir méhvírus (Kashmir bee virus, KBV)

Az eredeti törzset az *Apis cerana*-ból mutatták ki Indiában, de szerológiailag rokon vírust találtak Ausztráliában, Kanadában, az Egyesült Államokban és Spanyolországban is (Bailey és mtsai., 1979). Újabb vizsgálatok mutattak rá, hogy szerológiailag és genomját tekintve annyira közel áll az ABPV-hez, hogy tulajdonképpen nem is tekinthető önálló vírussá.

2.3.4.7. Izraeli heveny méhbénulás vírus (Israeli acute bee paralysis virus, IAPV)

A vírust 2007-ben írták le (Cox-Foster *et al.*, 2007), és összefüggésbe hozták az Amerikai Egyesült Államokban nagyarányú méhpusztulást és nagy gazdasági károkat okozó családösszeomlás kórképpel (Colony Collapse Disease, CCD). A vírust Európában is kimutatták Franciaországban (Blanchard *et al.*, 2008). Hivatalosan rendszertanilag még nem besorolt vírus, az ABPV-hez való nagyfokú morfológiai és genomszerkezeti hasonlósága miatt nagy valószínűséggel szintén a *Cripavirus* nemzetségbe tartozik.

3. Saját vizsgálatok

3.1. Anyag és módszer

3.1.1. A Magyarországon előforduló vírusfertőzések monitoring vizsgálata

3.1.1.1. Az általunk vizsgált vírusok

Vizsgálataink során 7 méhvírus jelenlétének kimutatására irányuló vizsgálatokat végeztünk két periódusban. Az első vizsgálat során az 1999-2004-ig terjedő időszakban a heveny méhbénulás vírus (ABPV), a fekete anyabölcső vírus (BQCV), az idült méhbénulás vírus (CBPV), a deformált szárny vírus (DWV), a költéstömlősödés vírus (SBV) és a Kashmir méhvírus (KBV) jelenlétét vizsgáltuk. A második felmérés során 2007-ben a fenti vírusok mellett az izraeli heveny méhbénulás vírus (IAPV) jelenlétét is megvizsgáltuk, mert ebben az időszakban az Egyesült Államokban nagy károkat okozó méhpusztulásért ezt a vírust tartották felelősnek, és felmerült annak lehetősége, hogy Európában is megjelent az említett vírus.

3.1.1.2. Mintafeldolgozás

A vizsgálatot az 1999-2004 közötti időszakban 52, és a 2007-es év során gyűjtött 72 méhészet (minden megyéből négy-négy) méhmintának a vírusfertőzöttségre irányuló vizsgálatával végeztük el. Dörzsmozsárban 50 kifejlett méhet homogenizáltuk és 10ml PBS-ben (phosphate buffered saline, foszfátsókkal pufferolt fiziológias konyhasó-oldat) szuszpendáltuk. A homogenizátumokat 10 percig 1500×g gyorsulással centrifugáltuk a durvább szövettörmelék eltávolítása céljából, majd a felülúszót 12000×g gyorsulással ismételtelen centrifugáltuk 15 percig, hogy a kis méretű szennyező anyagokat (baktériumokat, sejttörmelék) is kitisztítsuk a mintából.

3.1.1.3. RNS tisztítás, reverz transzkripció és polimeráz láncreakció

A minta feldolgozása során nyert tiszta felülúszóból a virális RNS-t QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Németország) segítségével izoláltuk, követve a gyártó utasításait. A reverz transzkripciót és a polimeráz láncreakciót (RT-PCR) egy reakcióelegyben, QIAgen One Step RT-PCR Kit (Qiagen, Németország) segítségével végeztük.

Az általunk vizsgált 7 méhvírus mindegyikére külön primerpárt használtunk. Az RT-PCR során vagy a más szerzők által leírt, vagy a kutatócsoportunk által korábban kifejlesztett primereket használtuk, hogy vizsgálatunk eredményei összehasonlíthatóak legyenek külföldi csoportok hasonló vizsgálataival, illetve saját korábbi eredményeinkkel. Így szerettük volna elkerülni, hogy az egyes méhvírusok előfordulási gyakoriságával kapcsolatos eredmények különbözőségeinek hátterében ne az egyes alkalmazott PCR módszerek közti érzékenységek álljanak. Az amplifikáció során használt oligonukleotidokkal kapcsolatos, részletes információkat az 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat: Az RT-PCR vizsgálatokban használt oligonukleotid primerek jellemzői.

Vírus	Génbanki iktatási szám	Primer	Primer szekvencia (5'-3')	A nukleotidok genomban elfoglalt pozíciója	A termék hossza (bp)
ABPV	AF126050	ABPV1f	CATATTGGCGAGCCACTATG	8107-8126	498
		ABPV2r	CCACTTCCACACAACACTATCG	8585-8604	
BQCV	AF183905	BQCV2144f	GAGAGCTGCAGAACAAGAG	2144-2163	583
		BQCV2726r	TCACGTGTCAAGGCTTCATC	2726-2707	
BQCV	AF183905	BQCV3f	AGTAGTTGCGATCTACTTCC	2559-2578	472
		BQCV4r	CTTAGTCTTACTCGCCACTT	3011-3030	
CBPV	AF375659	CBPV1f	AGTTGTTCATGGTTAACAGGATACGAG	23-48	455
		CBPV2r	TCTAATCTTAGCACGAAAGCCGAG	454-477	
CBPV	AF375659	CBPV111f	TGTCGAACTGAGGTTCTTAC	111-130	316
		CBPV426r	GACCTGATTAACGACGTTAG	407-426	
DWV	AY292384	DWV3994f	CGTTACTACGATAAAGGATA	3994-4013	548
		DWV4541r	GCATACCATCTCCAATACTA	4541-4522	
DWV	AY292384	DWV2345f	ATTGTGCCAGATTGGACTAC	2345-2364	435
		DWV2779r	AGATGCAATGGAGGATACAG	2760-2779	
SBV	AF022924	SBV1f	ACCAACCGATTTCCTCAGTAG	221-240	469
		SBV2r	CCTTGGAACTCTGCTGTGTA	670-689	
KBV	AY275710	KBV5706f	GATGAACGTCGACCTATTGA	5406-5425	395
		KBV5800r	TGTGGGTTGGCTATGAGTCA	5781-5800	
IAPV	EF219380	IAPV3042f	ATTGAGAGTTGCCAAGGAGT	3042-3061	758
		IAPV3799r	GTCTGTGCTTCGATCACAAT	3799-3780	
IAPV	EF219380	IAPV7866f	GTACCATTGGCTTATGATCC	7866-7885	575
		IAPV8440r	CCATAGATTCCAGCAGTCTT	8440-8421	

Az 1999-től 2004-ig terjedő időszakban történő felmérés során az ABPV, BQCV, CBPV, DWV, SBV és a KBV kimutatására a kutatócsoportunk által tervezett primer párokat használtuk. A tervezés alapjául szolgáló szekvenciák a National Center for Biotechnology Information [génbankjának honlapján](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html) (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) megtalálható teljes genomokból származtak. A tervezéshez az SE-Central (Scientific & Educational Software) primertervező programot használtuk. A 2007-es év során a CBPV kimutatásra a Ribiere által leírt primer

párt használtuk (Ribiere *et al.*, 2002), melyet a génbankban található részleges CBPV szekvencia alapján terveztek. Az IAPV kimutatására két, a kutatócsoportunk által tervezett primer párt is használtunk. Az oligonukleotidokat a Mezőgazdasági és Biotechnológiai Kutatóközpont (Gödöllő) szintetizálta.

A PCR reakciókeverék 10µl 5×reakció puffert, 2µl dezoxinukleozid trifoszfát mixet (dNTP), 50pmol genomikus és komplementer primert, 2µl enzimet (Sensiscript és Omniscript reverz transzkriptázt és HotStarTaq DNS polimerázt), 40U RiboLock™ RNáz inhibitor (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 5µl templát RNS-t és a reakcióelegyet 50µl-re kiegészítő mennyiségű desztillált vizet tartalmazott. Az összeállított reakciókeveréket DNS-sokszorozó készülékbe (MJ Research Mini Cycler, MJ Research Inc., Watertown, Massachusetts, USA) helyeztük. A PCR keveréket az alábbi hőprogramnak vetettük alá:

1. reverz transzkripció 50°C 30 perc
 2. reverz transzkriptáz inaktiválása, polimeráz aktiválása 95°C 15 perc
 3. denaturáció 94°C 45 másodperc
 4. primer kötődés 55°C 45 másodperc
 5. szálépítés 72°C 1 perc
 6. elongáció 72°C 10 perc
 7. 4°C végtelen
- } 40x ismételve

3.1.1.4. Gél-elektroforézis

Az RT-PCR reakciót követően, a terméket 2%-os Tris-acetát-EDTA agaróz gélben (0,5µg/ml ethidium-bromid jelenlétében) elektroforetizáltuk (OmniPur, Darmstadt, Németország), az alábbiak szerint: 5µl terméket 1µl 6×Loading Buffer-rel (Fermentas, Vilnius, Livánia) elkevertünk és a gél zsebébe mértünk, majd 8V/gélcm feszültség mellett 40 percig futtattuk. A termékeket UV fényben 312nm-en tettük láthatóvá és pozíciójukat Kodak DS Electrophoresis Documentation and Analysis System segítségével lefényképeztük, Kodak Digital Science ID szoftvert használva. A termékek méretét 100bp DNS létra segítségével határozzuk meg (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, Fermentas, Vilnius, Litvánia). Az egyes reakciók, ill. termékek ellenőrzéséhez az alábbi kontrollokat használtuk. Negatív kontrollként RNS mentes reakcióelegyet szolgált. A pozitív kontrollt az ABPV, BQCV, CBPV, DWV és SBV esetén egy – a korábbi kísérletekben pozitívnak minősített, szekvencia-analízissel genetikailag is igazolt

– biztosan pozitív szuszpenziót tartalmazó elegy képezte. Az IAPV esetén egy Izraelből származó, plazmidba klónozott IAPV szekvenciát használtunk, melyet Prof. I. Sela (The Hebrew University of Jerusalem, Faculty of Agricultural, Food and Environmental Quality Sciences, Rehovot 76100, Israel) bocsátott a rendelkezésünkre.

3.1.2. Fekete anyabölcső vírus (BQCV) genotípusok genetikai vizsgálata és filogenetikai összehasonlítása

3.1.2.1. Mintafeldolgozás

A minták három európai országból származtak: Magyarországról, Lengyelországból és Ausztriából. A Magyarországról származó minták (lárvák, előbábok, bábok és kifejlett méhek) és az Ausztriából származó minták (kifejlett méhek) olyan méhészetekből származtak, ahol nem volt tapasztalható a vírusfertőzés tünete. A Lengyelországból származó minták olyan anyalárvák, előbábok, és bábok voltak, melyek a vírusfertőzés jellemző tüneteit mutatták (elpusztult anyalárva, elsötétedett falú anyabölcső). Az anyalárvák, bábok és előbábok külön-külön egyesével kerültek feldolgozásra, míg a kifejlett méhek esetén 50 méhegyedet homogenizáltunk egyszerre. A homogenizálás a 3.1.1.2. fejezetben leírtaknak megfelelően történt.

3.1.2.2. RNS tisztítás, reverz transzkripció és polimeráz láncreakció

A minta feldolgozása során nyert tiszta felülúszóból a virális RNS-t a 3.1.1.3. fejezetben leírtak alapján izoláltuk.

Két oligonukleotid primerpárt terveztünk a génbankban elhelyezett teljes BQCV genom alapján (akcessziós szám: AF183905). Az egyik primer pár a szerkezeti fehérjét kódoló génszakasz egy területére, a másik primer pár a nem szerkezeti fehérjét (feltételezhetően a helikáz enzimet) kódoló génszakasz egy területére tapadt. További primerpárokat is terveztünk, hogy néhány kiválasztott genotípus csaknem teljes szekvenciáját meghatározzuk. A primerek tervezését a 3.1.1.3. fejezetben leírtak alapján végeztük. Az oligonukleotid primerpárok szekvenciái, elhelyeződése a genomon és a keletkezett termék mérete a 3. és a 4. táblázatban összefoglalva szerepel.

3. táblázat: A BQCV genom szerkezeti fehérjéket kódoló területére és a helikáz enzimet kódoló területére tapadó oligonukleotid primerek jellemzői.

Terület	Primer	Primer szekvencia (5'-3')	Pozíció	A termék hossza (bp)
Helikáz	BQCV2144+	TGA GAG CTG CAG AAC AAG AG	2144-2163	583 bp
	BQCV2726-	TCA CGT GTC AAG GCT TCA TC	2726-2707	
Szerkezeti fehérje	BQCV6540+	TGA GAG CTG CAG AAC AAG AG	6540-6559	514 bp
	BQCV7053-	TCC ATG GCG ACA GTT ACA TC	7053-7034	

4. táblázat: A BQCV teljes genom szekvenciájának meghatározásához használt oligonukleotid primerek jellemzői.

Primer kód	Primer szekvencia (5' - 3')	Pozíció	A termék hossza (bp)
BQ 29 +	CTA TAC GCG CTT GGT TGT	29-46	1807
BQ 1835 -	TCC GCT AAC GTG GAC TCT GT	1835-1816	
BQ 1645 +	ATA GGC ACG TGG TTG ACT	1645-1664	1082
BQ 2726 -	TCA CGT GTC AAG GCT TCA TC	2726-2707	
BQ 2144 +	TGA GAG CTG CAG AAC AAG	2144-2163	1033
BQ 3716 -	CTA GAT TCC ACG CGC ACA GT	3176-3157	
BQ 3016 +	GCG AGT AAG GCC AAG GTT	3016-3035	1549
BQ 4564 -	CCG CCT CTA TGC ATT CCT GT	4564-4545	
BQ 4429 +	GAT ACC TCT TGC GGT TAT CC	4429-4448	1510
BQ 5938 -	CGG TCC ATC TTC AAG CAC TA	5938-5919	
BQ 5744 +	CTC CAA GAT CGG TGG ATA	5744-5763	1730
BQ 7473 -	TCG TCG CCA GCA TTG ACT TC	7473-7454	
BQ 7353 +	CCA AGT ACG CTC ATG CTA GT	7353-7372	1140
BQ 8492 -	TCA TGA GAA GAA CCG AGA	8492-8473	
BQ 29 +	CTA TAC GCG CTT GGT TGT	29-46	2275
BQ 2303 -	GCC ATG TGT AAC GGA TAA	2303-2284	
BQ 2298 +	CAT GGC GTC GAT AGA AGA	2298-2317	989
BQ 3286 -	TCGTTGTAACAGCCGTAAGC	3286-3267	
BQ 7405 +	GTT GAA GGC GAC TAA TAC	7405-7424	1088
BQ 8492 -	TCA TGA GAA GAA CCG AGA	8492-8473	
BQ 510 +	TGC TAC TGC GGT AGT GGA	510-527	Szekvenáló primerek
BQ 1062 +	CGT GGA CAC CTC TAT TGG TA	1062-1081	
BQ 506 +	ACT CTG CTA CTG CGG TAG CG	506-525	
BQ 1834 -	CCG CTA ATG TGG ATT CTG	1834-1817	
BQ 276 +	GTA GCC TGT ACT ACC TGA AG	276-295	
BQ 951 +	GGT TGA CCG AAT GTA CCA	951-968	

A reverz transzkripciót és a polimeráz láncreakciót a 3.1.1.3. fejezetben leírtak alapján végeztük.

A genom csaknem teljes szakaszát lefedő PCR esetében magyarországi és ausztriai minták egyes genomterületeinek amplifikálása során a fenti protokollt az alábbiak szerint módosítottuk:

Az első primer pár esetében a hosszú termék miatt a lánccéptés fázisát 2 perc 30 másodpercre növeltük (BQ29+ és BQ1835-).

Az 5. primer párral végzett PCR programban a primer tapadási idejét növeltük 1 perc 30 másodpercre (BQ4429+ és BQ5938-).

3.1.2.3. Gél-elektroforézis

Az RT-PCR reakciót követően, a termékek gél-elektroforézisét a 3.1.1.4. fejezetben leírtak alapján végeztük azzal a különbséggel, hogy a genom csaknem teljes szakaszát lefedő PCR esetében az 1000bp-nál nagyobb PCR termékek méretét GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas, Vilnius, Lithuania) segítségével ellenőriztük.

3.1.2.4. Nukleotid szekvenálás és szekvenciaanalízis

A magyarországi, lengyelországi és ausztriai vírusok genomjáról származó sokszorosított PCR termékeket 0,8%-os Standard Low_{mr} Agarose Gélben (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) 5V/gélcsm sebességgel, 2 órán keresztül elektroforetizáltuk, UV fény alatt rövid megvilágítás során ellenőriztük a termékek pozícióját, majd kivágtuk a gélből. Az így kapott géldarabokból QIAquick Gel Extraction Kit segítségével (QIAGEN, Germany) kivontuk a megsokszorozott DNS termékeket, melyek nukleotidsorrendjét a Mezőgazdasági és Biotechnológiai Kutatóközpontban (Gödöllő) és a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóintézetben ABI Prism 310 automata szekvenáló rendszer segítségével meghatároztattunk. A szekvenálás az RT-PCR során korábban használt primerekkel, illetve szekvenáló primerek segítségével történt minden esetben kétszer, az esetlegesen kétes nukleotidok ellenőrzése érdekében. Az így kapott nukleotid szekvenciákat BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI) programmal azonosítottuk, majd a BioEdit 4.7.8 Software és az Align Plus (Scientific and Educational Software) programok segítségével kijavítottuk, és összehasonlítottuk őket a génbanki szekvenciákkal és egymással. A filogenetikai analíziseket a Phylogeny Inference Program Package (PHYLIP, version 3.6b, Felsenstein, 2004) programcsomag segítségével hajtottuk végre. A bootstrap értékeket 1000 léptékkel a SEQBOOT programmal állapítottuk meg, a távolsági mátrix analízist pedig a DNADIST/Neighbor-Joining és Fitch programok segítségével végeztük. A filogenetikai fák a TreeView (Win32, version 1.6.6.) program segítségével rajzoltuk meg. A genom csaknem teljes hosszában megszekvenált néhány BQCV genotípus különböző génterületeinek a hasonlóságában található különbségeket a SimPlot (version 3.5.1., Ray, 2003) program segítségével szemléltettük a 2-paraméteres (Kimura) távolság modelljét használva.

3.1.2.5. Nukleotid szekvenciák akcessziós számai

A BQCV amplikonok szekvenciáit elhelyeztük a nemzetközi génbankban, akcessziós számuk: EF517501 - EF517522.

3.1.3. A *Nosema ceranae* első magyarországi kimutatása és előfordulási gyakoriságának vizsgálata

3.1.3.1. Mintafeldolgozás

2006 és 2007 során 38 méhmintát gyűjtöttünk különböző magyarországi méhészetekből, minden megyéből legalább egyet. Ezek olyan családokból származtak, amelyekből más méheket a Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal (MgSzH) Parazitológiai, Hal- és Méhbetegségek Laboratóriuma korábban fénymikroszkóppal megvizsgált, és a *Nosema* spórák jelenléte alapján pozitívnak talált, de a kórokozó fajmeghatározása nem történt meg. Dörzsmozsárban 30 kifejlett méhegyedet homogenizáltunk 10ml PBS-ben szuszpendáltunk, és a szuszpenziót használtuk a későbbi vizsgálatokra.

3.1.3.2. DNS tisztítás és polimeráz láncreakció

A homogenizált méheket először lysis pufferba (20mg/ml lysosime, 20mM Tris-HCl [pH 8], 2mM EDTA, 1,2% Triton) helyeztük. majd a DNS-t QIAamp viral DNA Mini kit (Qiagen, Németország) segítségével izoláltuk, követve a gyártó utasításait. Oligonukleotid primerpárokat terveztünk a *Nosema* genomjának LSUrNS kódoló génszakaszára olyan módon, hogy a primerek mind a *Nosema apis*, mind a *Nosema ceranae* genomjára tapadjanak. A primerek tervezésének alapjául a génbankban található *N. apis* és *N. ceranae* szekvenciákat használtuk (iktatási számok: DQ078785 and U97150). Az oligonukleotid primer párok szekvenciái, elhelyeződése a genomon és a keletkezett termék mérete az 5. táblázatban látható.

5. **táblázat:** A PCR vizsgálatokban használt oligonukleotid primerek jellemzői, melyek a *Nosema* fajok LSUrNS kódoló területére tapadnak.

Primer	Primer szekvencia (5' - 3')	Pozíció	A termék hossza (bp)
Nos2990+	TGGAGCAACGAGATTCCT AC	2990-3009 (<i>N. ceranae</i>) 3319-3338 (<i>N. apis</i>)	437 (<i>N. ceranae</i>) 433 (<i>N. apis</i>)
Nos3426-	GCCTGCTACAAGCCAGTTA T	3426-3407 (<i>N. ceranae</i>) 3751-3732 (<i>N. apis</i>)	

A PCR reakciókeverék 5µl 10×reakció puffert, 5µl dezoxinukleozid trifoszfát mixet (dNTP), 0,3µl enzimet (Taq DNS polimerázt), 3µl MgCl₂-t (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 50pmol genomikus és komplementer primert, 2µl templát DNS-t és a reakcióelegyet 50µl-re kiegészítő mennyiségű desztillált vizet tartalmazott. Az összeállított reakciókeveréket PCR készülékbe (MJ RESEARCH Mini Cycler, MJ Research Inc., Watertown, Massachusetts, USA) helyeztük. A PCR keveréket az alábbi hőprogramnak vetettük alá:

1. 95°C 10 perc
 2. 94°C 2 perc
 3. 49°C 1 perc
 4. 72°C 1 perc
 5. 72°C 10 perc
 6. 4°C végtelen
- } 40x ismételve

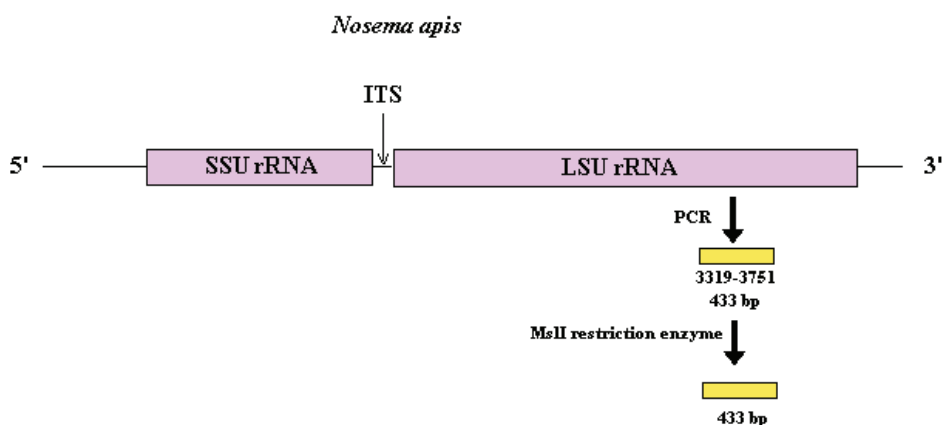
3.1.3.3. Gél-elektroforézis

Az PCR reakciót követően, a termékek gél-elektroforézisét a 3.1.1.4. fejezetben leírtak alapján végeztük.

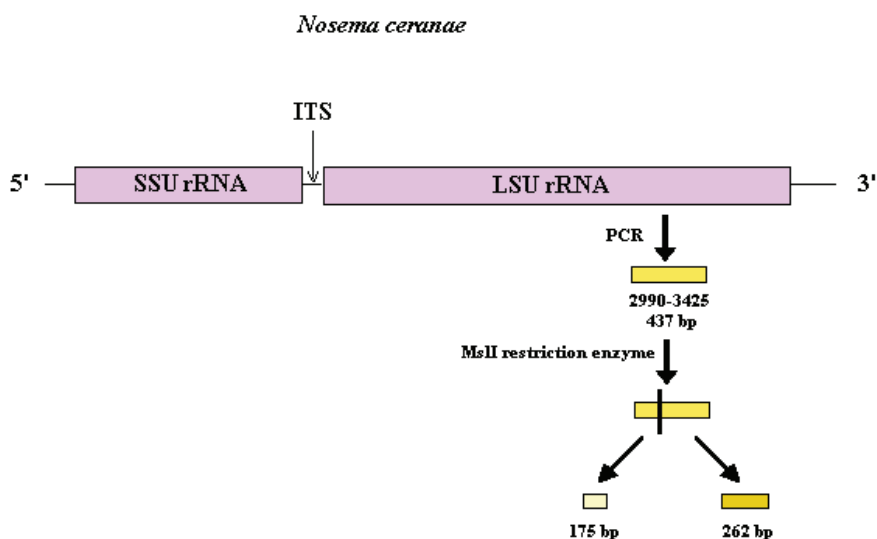
3.1.3.4. RFLP analízis és nukleotid szekvenálás

A két *Nosema* faj elkülönítésére gyors, restrikciós enzimmal történő emésztéses eljárást (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) alkalmaztunk. Az *MspI* restrikciós endonukleáz a *N. ceranae* genomjáról készült amplikont elvágja a CACTA|GTATG szekvenciánál egy 175 és egy 262bp hosszú DNS szakaszra. A *N. apis* amplikonját nem vágja el mivel az adott DNS szakaszon a genom szekvenciája eltér (CACTAGTATA), így a

keletkezett PCR termék megmarad eredeti hosszúságában. Az 1. és a 2. ábra a PCR és a restrikciós endonukleázos emésztés során zajló folyamatot szemlélteti.



1. ábra: A PCR és RFLP vizsgálatok sematikus ábrázolása a *N. apis* esetén. Az *MsII* enzim nem vágja el a PCR során keletkezett terméket (sárga hasáb).



2. ábra: A PCR és RFLP vizsgálatok sematikus ábrázolása a *N. ceranae* esetén. Az *MsII* enzim elvágja a PCR során keletkezett 437 bp hosszúságú terméket egy 175bp és egy 262bp hosszúságú DNS szakaszra.

Az restriktációs enzimmel történő emésztés során 6µl PCR terméket 15U *Msp*I enzimmel 2 órán át 37°C-on kezeltünk. A keletkezett eredményt agaróz-gélben ellenőriztük a korábban leírtak alapján.

A PCR termékek szekvenciáját a 3.1.2.4. fejezetben leírtaknak megfelelően meghatároztuk annak érdekében, hogy kizárjuk az esetleges műtermékek jelenlétét, és ellenőrizhessük, hogy az általunk talált szakaszok valóban a keresett két *Nosema* faj genomjáról másolódtak-e.

3.2. Eredmények

3.2.1. A Magyarországon előforduló vírusfertőzések monitoring vizsgálata

3.2.1.1. A PCR termékek elektroforézise

Kutatócsoportunk először az 1999 és 2004 közötti időszakban végzett vírusfertőzöttségre irányuló monitoring vizsgálatot (Forgách *et al.*, 2007), melynek során 52 méhészetből vizsgáltunk méhmintákat. A 2007-es évben szintén végeztünk monitoring vizsgálatot, ennek során 72 méhmintát vizsgáltunk meg az ország egész területéről (minden megyéből 4-4 mintát). Az izolált vírus RNS-eknek megfelelő primerekkel végzett RT-PCR reakció termékei a vírus genom alapján számítható amplikonokkal megfelelő egyezést mutattak. Az ABPV esetén 498nt hosszú, a BQCV esetén 472nt és 583nt hosszú, a CBPV esetén 316nt és 455nt hosszú, a DWV esetén 435nt és 548nt hosszú és az SBV esetén 469nt hosszú terméket kaptunk. A KBV esetén a 1999-2004-es vizsgálatban illetve az IAPV esetén 2007-ben nem találtunk pozitív mintát.

3.2.1.2. Az adatok összegzése

3.2.1.2.1. A vírusok előfordulása az 1999-2004-ig terjedő időszakban

A felmérés során az 1999-2004 terjedő időszakban négy, Magyarországon előforduló méhvírus jelenlétét sikerült kimutatni, és elterjedtségüket feltérképezni. Ez a négy korábban is említett és részletezett vírus a heveny méhbénulás vírus, a fekete anyabölcső vírus, a deformált szárny vírus és a költéstömlősödés vírus. Ekkor még nem sikerült kimutatni a krónikus méhbénulás vírus jelenlétét. A vizsgálat kimutatta, hogy a magyarországi méhészetekben a legelterjedtebb vírus a deformált szárny vírus (a méhészetek 72%-ban jelen volt), a második a fekete anyabölcső vírus (méhészetek 54%-ban volt jelen), a harmadik az akut méhbénulás vírus (37%-ban volt jelen), és igen kis arányban volt jelen a költéstömlősödés vírus, a vizsgált méhészetek 2%-ában (6. táblázat). Vizsgáltuk azt is, hogy egy család egyszerre hány vírussal volt fertőzött. A vizsgált családok 37%-ában csak egy vírus volt jelen a vizsgálat időpontjában. A családok 46%-ában két vírus, és 11%-ában három vírus egyidejű jelenléte volt kimutatható (Forgách *et al.*, 2007).

A vizsgálat kiterjedt az ázsiai nagy méhatka vírusfertőzöttségének kimutatására is. Az atkákból DWV és ABPV vírusokat lehetett kimutatni.

3.2.1.2.2. A vírusok előfordulása 2007-ben

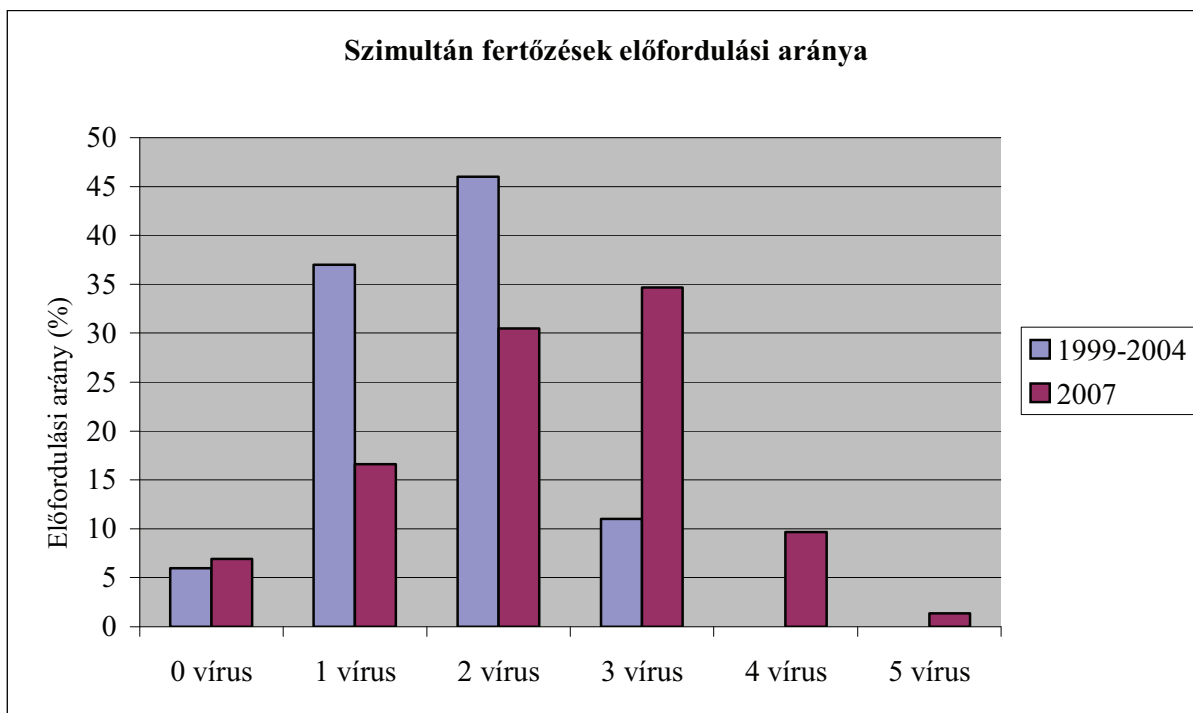
A 2007-ben vizsgált 72 méhmintában a legnagyobb arányban a heveny méhbénulás vírus fordult elő, jelenléte 70,8%-os volt. A második a költéstömlősödés vírus volt 62%-al, a harmadik a deformált szárny vírus 48,6%-al, a negyedik a fekete anyabölcső vírus 40%-al. Ebben a vizsgálatsorozatban már ki tudtuk mutatni az idült méhbénulás vírust is a családok 5,5%-ában. Ezeket az adatokat összehasonlítva a korábbi felmérés eredményeivel azt láthatjuk, hogy jelentősen megváltozott a legtöbb vírus előfordulási aránya. Az adatokat a 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat: A vírusok előfordulási aránya az 1999-2004 között illetve 2007-ben.

A vírus neve	Az előfordulás aránya	
	1999-2004-ben	2007-ben
Deformált szárny vírus (DWV)	72%	48,6%
Fekete anyabölcső vírus (BQCV)	54%	40%
Heveny méhbénulás vírus (ABPV)	37%	70,8%
Költéstömlősödés vírus (SBV)	2%	62%
Idült méhbénulás vírus (CBPV)	0%	5,5%
Kasmir méhvírus (KBV)	0%	-
Izraeli heveny méhbénulás vírus (IAPV)	-	0%

A 2007-es év során nem találtunk vírusfertőzést a méhészetek 6,9%-ában. Csak egy vírust találtunk a megvizsgált minták 16,6%-ában, kettőt a minták 30,5%-ában. Három vírus szimultán fertőzése volt kimutatható a minták 34,7%-ában, négy vírus a minták 9,7%-ában, és 5 vírus a minták 1,4%-ában. A 3. ábra foglalja össze a szimultán vírusfertőzések arányának változását az 1999-2004 időszakhoz viszonyítva.

3. ábra: A szimultán vírusfertőzések aránya az 1999-2004 időszakban összehasonlítva a 2007-es év eredményeivel.



3.2.2. Fekete anyabölcső vírus (BQCV) genotípusok genetikai vizsgálata és filogenetikai összehasonlítása

3.2.2.1. Filogenetikai összehasonlítás

A vizsgálat során 5 ausztriai, 10 magyarországi és 7 lengyelországi mintán végeztünk PCR vizsgálatot a vírus két különböző genomterületén (a helikáz enzimet kódoló területen a 2144. nt és a 2726. nt között, illetve a szerkezeti fehérjéket kódoló területen a 6540. nt és a 7053. nt között). A nukleotid szekvenciákat meghatároztuk, és összehasonlítottuk egymással. A helikáz enzimet kódoló területen a közép-európai genotípusok 82-90%-os hasonlóságot mutattak a dél-afrikai referencia szekvenciával. A magyarországi és az ausztriai minták jobban hasonlítottak egymásra (94-99%), mint a lengyelországi genotípusokra (81-96%). A Poland4, Poland5 és Poland6 névvel jelölt lengyelországi minták nagymértékben hasonlítottak egymásra (98-99% hasonlóság), és jobban hasonlítottak a dél-afrikai referencia szekvenciára, mint a többi közép-európai genotípusra (a hasonlóság a dél-afrikai

szekvenciához 90% volt, míg a többi közép-európai mintához 81-83% volt). A szerkezeti fehérjéket kódoló területen általánosságban magasabb volt a hasonlósági arány (91-94%) mind a közép-európai szekvenciákat, mind a dél-afrikai referencia szekvenciát tekintve. Ezen a területen hasonlóan a helikáz enzimet kódoló szakaszhoz, a magyarországi és az ausztriai genotípusok jobban hasonlítottak egymásra (97-99%), mint a lengyelországi genotípusokra (93-96%). Egy genotípus, a Poland4 nevű minta eltérést mutatott; 89-91%-ban hasonlított a többi lengyelországi ausztriai és magyarországi mintára, és 91%-ban a referencia szekvenciára. A hasonlósági arányokat a 7. és 8. táblázat tartalmazza.

7. táblázat: A hasonlósági arányok (%) a vizsgált közép-európai genotípusok és a dél-afrikai referencia szekvencia között a helikáz enzimet kódoló területen.

	Ausztriai genotípusok	Magyarországi genotípusok	Lengyelországi genotípusok	Dél-Afrikai (ref.) genotípus
	Nukleinsav			
Ausztriai genotípusok	95-99 98-100	94-99	82-95	82-83
Magyarországi genotípusok	97-100	95-99 97-100	81-96	82-84
Lengyelországi genotípusok	93-98	92-98	82-100 91-100	83-90
Dél-Afrikai (ref.) genotípus	94	93-95	93-99	
	Aminosav			

8. táblázat: A hasonlósági arányok (%) a vizsgált közép-európai genotípusok és a dél-afrikai referencia szekvencia között a szerkezeti fehérjéket kódoló területen.

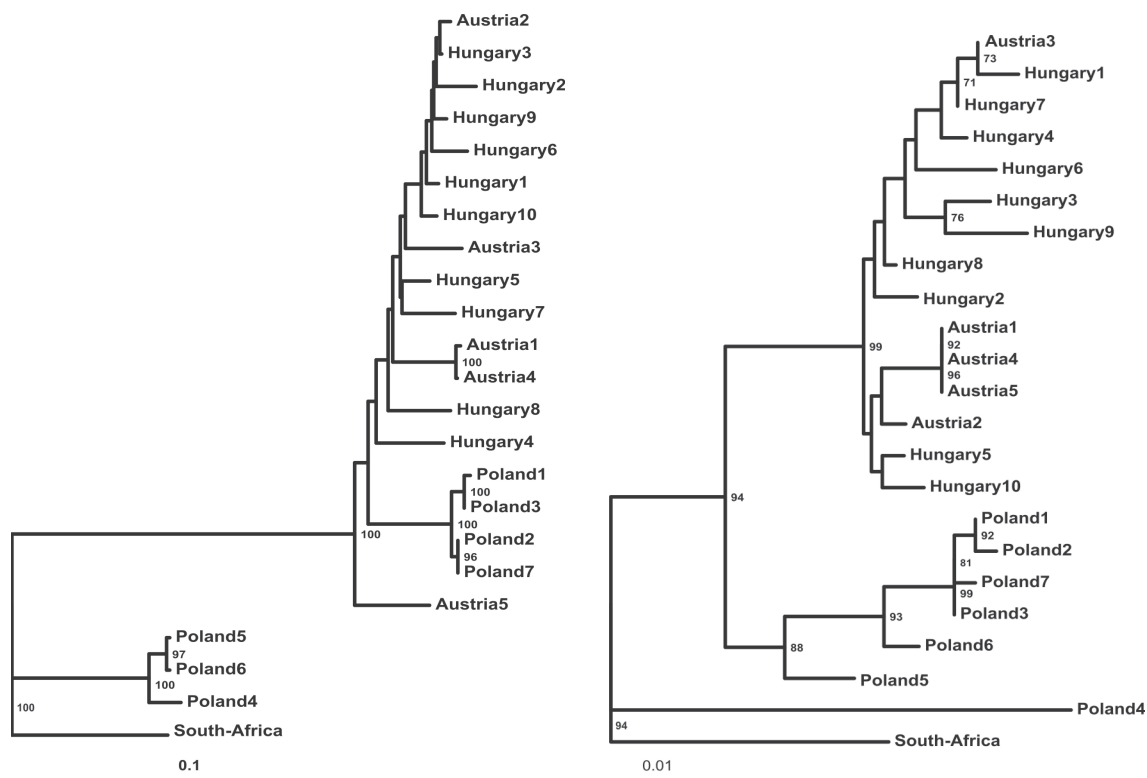
	Ausztriai genotípusok	Magyarországi genotípusok	Lengyelországi genotípusok	Dél-Afrikai (ref.) genotípus
Nukleinsav				
Ausztriai genotípusok	96-100 99-100	96-99	89-96	92-93
Magyarországi genotípusok	98-100	96-99 97-100	89-96	91-93
Lengyelországi genotípusok	98-100	97-100	89-99 98-100	91-94
Dél-Afrikai (ref.) genotípus	99-100	98-100	99-100	
Aminosav				

A kapott nukleotid szekvenciákat lefordítottuk aminosavakra is, a helikáz enzimet kódoló szakaszon 186, a szerkezeti fehérjéket kódoló szakaszon 132 aminosavat kaptunk. Az aminosav szekvenciákat is összehasonlítottuk egymással is és a referencia dél-afrikai szekvenciával is. A helikáz enzimet kódoló szakaszon 91-100%, a szerkezeti fehérjéket kódoló szakaszon 97-100% volt a hasonlóság a vizsgált minták között.

Filogenetikai vizsgálatot végeztünk a genom két különböző területeiről származó szekvenciák alapján. A törzsfá, mely a helikáz enzimet kódoló terület alapján készítettünk, három különálló csoportot mutatott. A magyarországi, az ausztriai, és a Poland₁, Poland₂, Poland₃, Poland₇ nevű lengyelországi genotípusok egy csoportot képeztek. Különálló csoportot képeztek a Poland₄, Poland₅ és a Poland₆ nevű lengyelországi genotípusok. Illetve egy különálló harmadik csoportot képezett a dél-afrikai referencia szekvencia. Érdekes, hogy a három különálló lengyelországi minta közelebb helyezkedett a dél-afrikai vírusához, mint a többi közép-európai genotípusokhoz. A 4. ábrán a baloldali törzsfá szemlélteti a helikáz enzimet kódoló terület szekvenciái alapján felállított törzsfát.

Elkészítettük a törzsfát a szerkezeti fehérjéket kódoló terület szekvenciái alapján is. Ez a törzsfá kicsit más képet mutatott, mint amit a helikáz enzimet kódoló terület alapján

készítettünk. A közép-európai genotípusok egy nagy csoportot alkottak, és ezen belül elkülönült két külön csoport. Az egyik az ausztriai és a magyarországi genotípusokat tartalmazta, a másik pedig egy közös lengyelországi csoportot. A magyarországi-ausztriai csoporton belül szintén két csoportot lehetett elkülöníteni. Az egyikbe négy ausztriai genotípus tartozott két magyarországi genotípussal. A másikba pedig a magyarországi genotípusok tartoztak, és ebbe a csoportba sorolódott még egy ausztriai minta is. Ezen a törzsfán a Poland5 és a Poland6 nevű minták a többi lengyelországi genotípus által alkotott csoportba tartoztak. A Poland4 genotípus ezen a fán teljesen külön helyezkedett el, egyenlő mértékű távolságra mind a közép-európai vírusoktól mind pedig a dél-afrikai referencia genotípustól, ezáltal egy harmadik különálló ágát képezett a fának. A szerkezeti fehérjét kódoló terület szekvenciái alapján felállított törzsfát a 4. ábrán a jobboldali törzsfá szemlélteti.

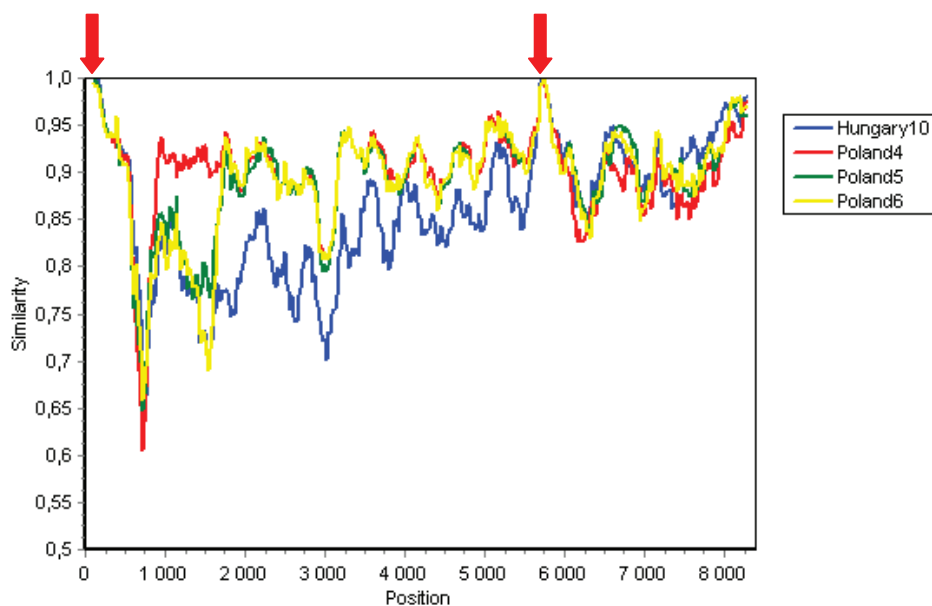


4. ábra: A fekete anyabölcső vírus genotípusok vizsgálata eredményeképpen készített filogenetikai törzsfák. A baloldali törzsfát a helikáz enzim (ORF1) kódoló génszakasz szekvenciái alapján készítettük. A jobboldali törzsfát a szerkezeti fehérjét (ORF2) kódoló génszakasz szekvenciái alapján készítettük. A számok a bootstrap értékeket jelentik %-ban. (Csak a 70%-nál nagyobb értékeket tüntettük fel. A fekete vonal a genetikai távolságot jelképezi.)

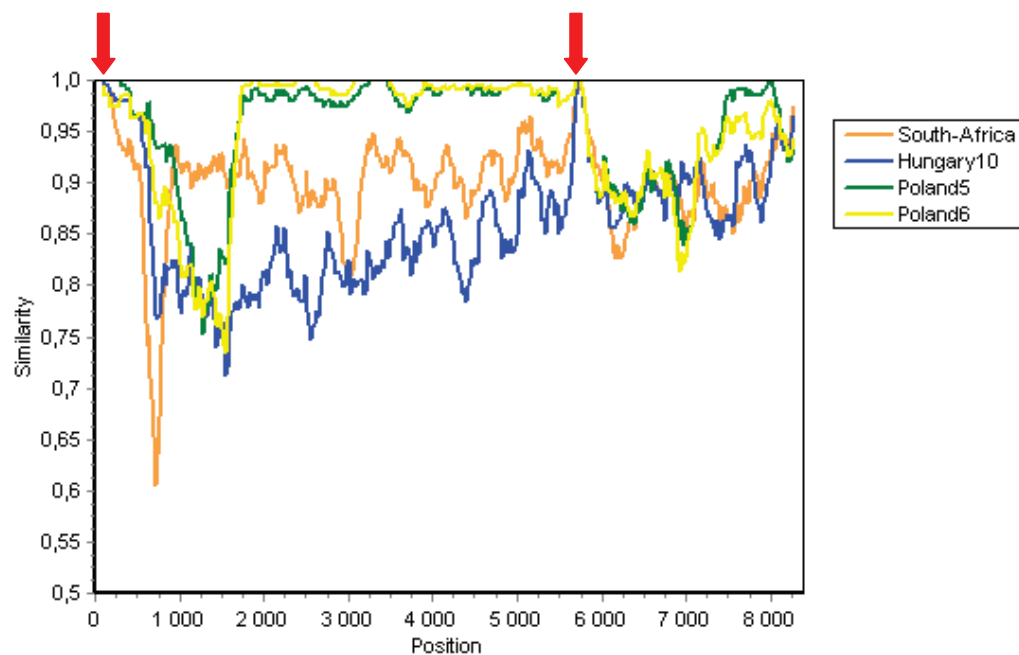
Elkészítettük a filogenetikai törzsfákat az aminosav szekvenciák alapján is. De mivel ezek a szekvenciák túl rövidek voltak és igen nagymértékű volt a hasonlóság a minták között, ezeket a fákat nem mutatom be.

3.2.2.2. BQCV genotípusok genomjának összehasonlítása

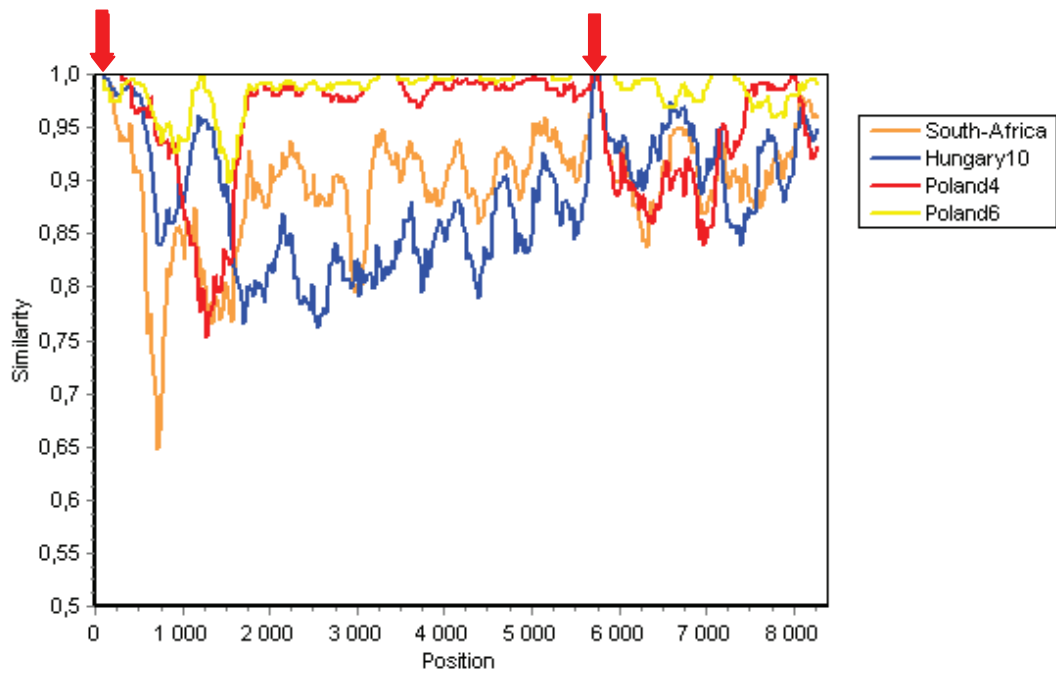
A BQCV genotípusok filogenetikai vizsgálata alapján három lengyelországi minta (Poland4, Poland5 és Poland6) egy külön csoportot képzett, amikor az ORF1 részleges szekvenciáit vizsgáltuk. Ugyanakkor az ORF2 részleges szekvenciái alapján két lengyelországi genotípus (Poland5 és Poland6) a többi lengyelországi mintával egy közös csoportot alkotott, a Poland4 pedig teljesen különálló genotípust képzett. Ez a jelenség magyarázható lenne egy esetleges intramolekuláris rekombinációval a különböző BQCV genotípusok között. A feltételezés tisztázása érdekében a Poland4, Poland5 és Poland6 genotípusok szekvenciáit meghatároztuk az 54. és a 8431. nukleotidok között a referenciaként szereplő dél-afrikai genotípus génbankban elhelyezett teljes genom szekvenciája alapján készített primerek segítségével. Az adott szakaszon a nukleotidsorrendet átfedő PCR termékekkel határoztuk meg. A terület lefedi az 5'UTR részleges szekvenciáját, az ORF1, a két nyitott leolvasási keret közti intergenikus terület, az ORF2 és a 3' oldali végső szekvencia részleges területét. Megszekvenáltunk egy magyarországi genotípust (Hungary10) is, annak érdekében, hogy egy közép-európai jellemző szekvenciához is tudjuk hasonlítani a lengyelországi genotípusokat. Továbbá megszekvenáltunk egy ausztriai genotípust (Austria5) is az 59. és a 2255. nukleotidok között, hogy az ORF1 változékonyságát megvizsgáljuk. A szekvenciákat összehasonlítottuk, és a hasonlósági arányokat a SimPlot program segítségével szemléltettük (5-9. ábra).



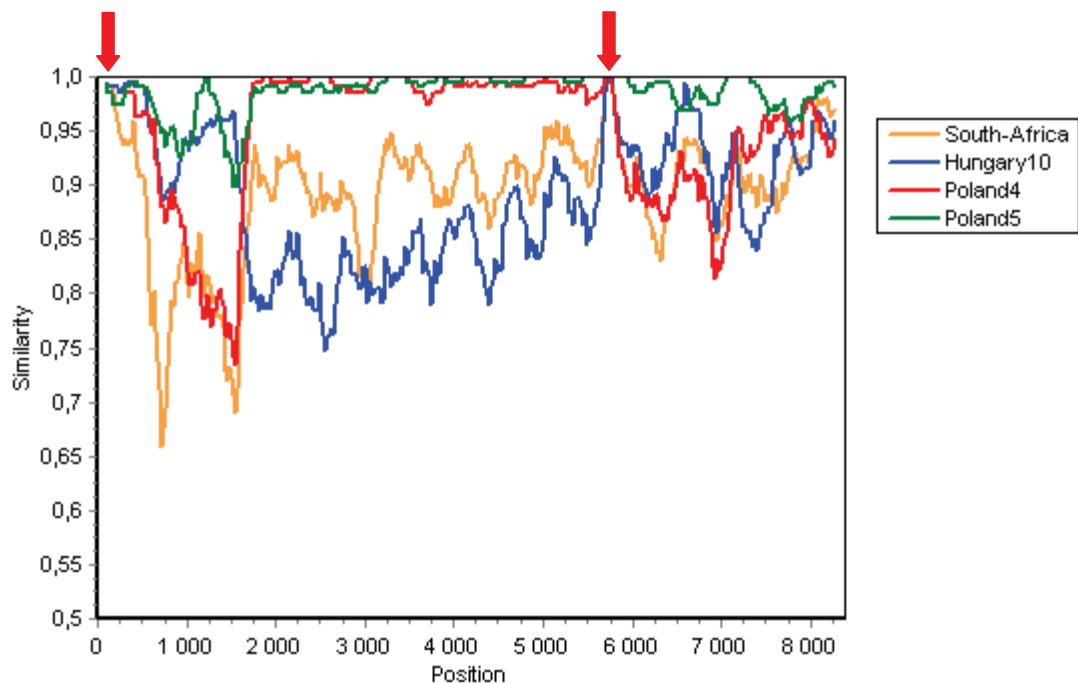
5. ábra: BQCV genotípusok hasonlósági mintázata. A Poland4, Poland5, Poland6 és Hungary10 a referencia dél-afrikai genotípushoz viszonyítva. A nyilak a 100% hasonlóságot mutató területeket jelzik.



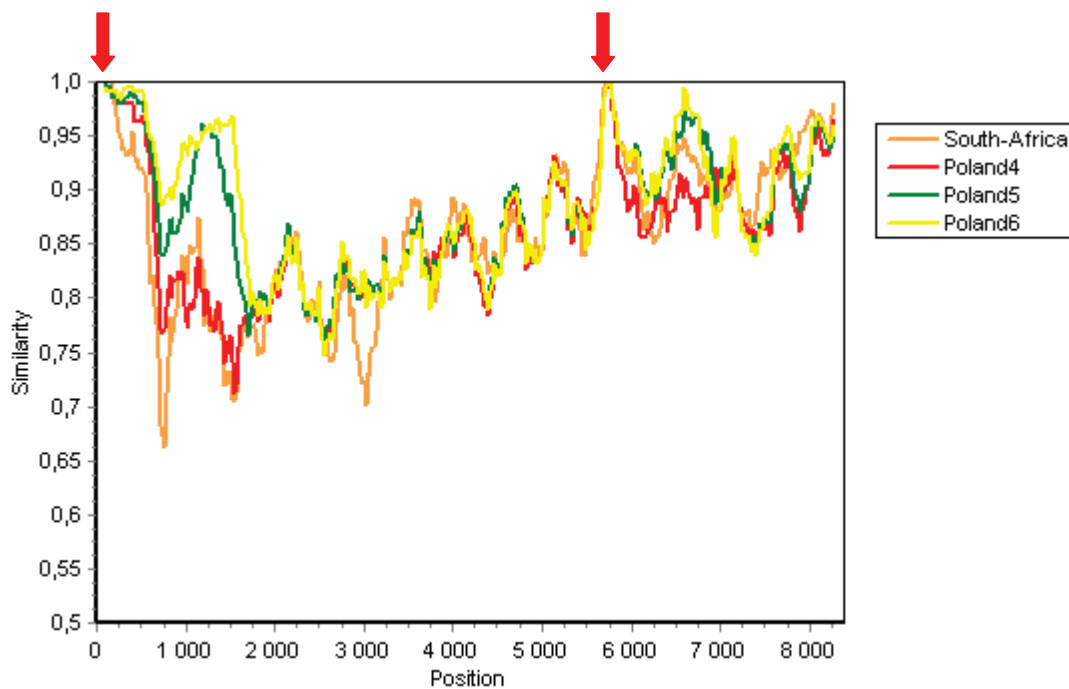
6. ábra: BQCV genotípusok hasonlósági mintázata. A dél-afrikai referencia genotípus, a Poland5, Poland6 és Hungary10 a Poland4 genotípushoz viszonyítva. A nyilak a 100% hasonlóságot mutató területeket jelzik.



7. ábra: BQCV genotípusok hasonlósági mintázata. A dél-afrikai referencia genotípus, a Poland4, Poland6 és Hungary10 a Poland5 genotípushoz viszonyítva. A nyilak a 100% hasonlóságot mutató területeket jelzik.



8. ábra: BQCV genotípusok hasonlósági mintázata. A dél-afrikai referencia genotípus, a Poland4, Poland5 és Hungary10 a Poland6 genotípushoz viszonyítva. A nyilak a 100% hasonlóságot mutató területeket jelzik.



9. ábra: BQCV genotípusok hasonlósági mintázata. A dél-afrikai referencia genotípus, a Poland4, Poland5 és Poland6 a Hungary10 genotípushoz viszonyítva. A nyilak a 100% hasonlóságot mutató területeket jelzik.

A Poland5 és a Poland6 nagy mértékben hasonlítottak egymásra (98%), kisebb mértékben a Poland4-re (95%), és legkevésbé a Hungary10-re és a dél-afrikai referencia genotípusra (89%). A Poland4 87%-ban hasonlított a Hungary10-re, és 90%-ban a dél-afrikai genotípusra. A magyarországi és a dél-afrikai genotípus 86%-ban hasonlítottak egymásra. Azonban a különböző genomterületek vizsgálata során érdekes hasonlósági arányokat lehetett felfedezni a különböző genotípusok között. Az adatok a 9. és 10. táblázatban vannak összefoglalva.

9. táblázat: A vizsgált BQCV genotípusok hasonlósági aránya (%) a teljes ORF1 szakaszon.

	Dél-afrika	Hungary 10	Poland 4	Poland 5	Poland 6	Nukleotid
Dél-Afrika		82	88	87	87	
Hungary 10	93		84	86	86	
Poland 4	95	95		96	96	
Poland 5	95	95	98		98	
Poland 6	94	96	98	99		
Aminosav						

10. táblázat: A vizsgált BQCV genotípusok hasonlósági aránya (%) a teljes ORF2 szakaszon.

	Dél-afrika	Hungary 10	Poland 4	Poland 5	Poland 6	Nukleotid
Dél-Afrika		92	90	91	91	
Hungary 10	97		90	92	92	
Poland 4	96	96		93	92	
Poland 5	96	97	98		98	
Poland 6	97	97	97	99		
Aminosav						

Az 5' véghez közeli UTR szakaszon találtunk 117 nukleotidot (69. és 235. nukleotidok között), amely az összes vizsgált genotípusnál teljesen azonos volt (Poland4, Poland5, Poland6, Hungary10, Austria5 és a dél-afrikai referencia genotípus). Az ORF1 területe érdekes módon két részre oszlott. Úgy tűnik, hogy az 5' véghez közeli körülbelül 1700 nukleotid hosszú szakaszon található a szubsztitúciók és inzerciók/deléciónak a zöme. Ezen a területen az európai szekvenciák 84 nukleotiddal rövidebbek, mint a dél-afrikai genotípus. Az 1176. és az 1244. nukleotidok között a dél-afrikai genotípusnál egy 69 nt hosszú folyamatos szekvenciát találunk, mely a vizsgált 5 európai genotípusból hiányzott. Mivel a génbankban nem található szekvencia a BQCV genom ezen szakaszáról, nem tudtuk más genotípusokkal

összehasonlítani ezt a területet. Az ORF1 3' véghez közeli kétharmada (körülbelül az 1700. nukleotidtól az 5625. nukleotidig) kevésbé volt változékony, és a hasonlósági arányok tükrözik a vírus földrajzi elhelyezkedését. A lengyelországi genotípusok nagymértékben hasonlítottak egymásra (98-99%), és érdekes módon jobban hasonlítottak a dél-afrikai genotípusra (90-91%), mint a magyarországi genotípusra (84-85%). A Hungary10 nagy mértékben különbözött a dél-afrikai vírustól ezen a szakaszon (84-85%). Az ORF1 3' véghez közeli szakaszáról már található más európai országokból elhelyezett szekvenciák a génbankban, egy szekvencia Nagy-Britanniából (helikáz kódoló terület, AF125252), és 3 Franciaországból (helikáz kódoló terület AY669847, AY669848, Tentcheva *et al.*, 2004, és RdRp kódoló terület, AY230509). Ezek a nyugat-európai genotípusok 80-96%-os hasonlóságot mutattak az általunk vizsgált közép-európai genotípusokkal, azonban a Poland5 és a Poland6 genotípusok 97%-ban hasonlítottak a francia vírusok helikáz enzimet kódoló területére. A Nagy-Britanniából származó genotípus az összes többi genotípushoz alacsony mértékben hasonlított (82-86%).

A BQCV genomjában a két ORF területet egy 208 nt hosszú intergenikus szakasz választja el egymástól. Ez a szakasz a BQCV genomon az 5626. nt és az 5833. nt között helyezkedik el (Leat *et al.*, 2000). Ennek a területnek a 3' véghez közeli területén található volt egy 155 nt hosszú szakasz (az 5679. nt és az 5833. nt között), amely 100%-ban egyezett mind az öt vizsgált genotípus esetén. Ez a 100%-os egyezés folytatódott az ORF2 kezdeti 56 nukleotidján. A génbankban további négy japán szekvenciát találtunk erről a területről, és mindegyik 100% egyezést mutatott az általunk vizsgált genotípusokkal és a dél-afrikai törzssel (BD173516, BD177020, BD294724 és BD295735).

Az ORF2 területén általánosságban nagyobb volt a hasonlóság a vizsgált genotípusok között (90-92%), mint az ORF1 területén (82-88%). Az ORF2 területén két lengyelországi (Poland5 és Poland6) nagy mértékben hasonló volt egymáshoz (98%), a másik lengyelországi genotípus a Poland4 viszont jelentősen különbözött tőlük (92-93% hasonlóság a másik két genotípushoz). A génbankban található több szekvencia is a BQCV genom ezen területéről. Egy genotípus Németországból (AF521640 Siede *et al.*, 2003), egy az Egyesült Államokból (AY626246), és egy Uruguay-ból (DQ364629, Antunez *et al.*, 2006). Ezek a vírusok 93-98%-os hasonlóságot mutattak a közép-európai genotípusokkal.

A BQCV genomon belüli diverzitást a 5-9. ábrán szemléltetjük. Elmondható, hogy az 5' végi UTR szakasz és a két ORF közti intergenikus terület igen konzervatív. Ugyanakkor az ORF1 5' véghez közel első egyharmada változékony. Ha a Poland4-et vesszük viszonyítási alapul,

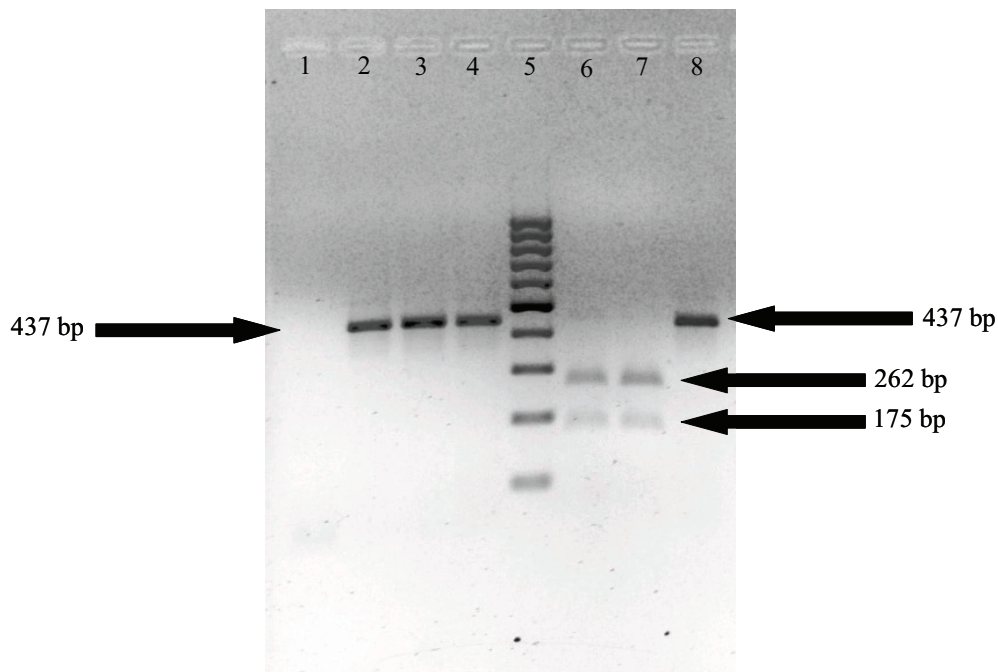
akkor azt lehet látni, hogy a másik két lengyelországi vírus hasonló hozzá az ORF1 3' véghez közeli területén, míg a magyarországi és a dél-afrikai vírusok ezen a területen is eltérnek a lengyelországi genotípusoktól. Az ORF2 területén, különösen az 5' véghez közeli szakaszán, minden vírus egyenlő mértékű diverzitást mutatott a többihez képest. Látható a grafikonokból, hogy a Poland5 és a Poland6 hasonló egymáshoz a genom általunk vizsgált csaknem teljes hosszán. Kisebb mértékben ugyan, mint a többi genotípus esetén, de itt is az ORF1 5' véghez közeli első harmadában volt a legnagyobb a diverzitás (90% hasonlóság). A genom többi területén mindenhol 95-100% volt köztük a hasonlóság. Érdekes, hogy ez a két vírus, a Poland5 és Poland6 az ORF1 említett változékony, körülbelül 1700 nt hosszú első szakaszán jobban hasonlított a magyarországi genotípusra, mint a harmadik lengyelországi (Poland4), viszont a további területeken ez a jelenség megfordult, és inkább a Poland4-re hasonlítottak jobban, mint a magyarországi vírusra. A magyarországi genotípus általánosságban hasonló mértékben különbözött a lengyelországi és a dél-afrikai genotípusoktól.

3.2.3. A *Nosema ceranae* első magyarországi kimutatása és előfordulási gyakoriságának vizsgálata

3.2.3.1. A PCR termékek elektroforézise és az RFLP vizsgálat

A *Nosema ceranae* magyarországi jelenlétének kimutatása és azonosítása céljából a tanulmány során egy PCR-RFLP módszert dolgoztunk ki a riboszóma nagy alegységét kódoló génszakaszra.

A *Nosema* fajok LSUrRNS kódoló területére tervezett PCR során körülbelül 430-440 bp hosszúságú termékeket kaptunk. Az RFLP vizsgálat során az *MspI* enzim a *Nosema ceranae* esetén egy 175 bp hosszúságú és egy 262 bp hosszúságú DNS szakaszra vágta a PCR termékünket. A *Nosema apis* esetén pedig az enzim nem vágta el az amplifikált DNS szakaszt (11. ábra).



11. ábra: A *Nosema* fajok LSUrRNS kódoló területére tervezett PCR termékek, és a termékek *MspI* enzim által történő emésztése után kapott fragmentumok gélelektroforézisének fényképe. 1. Negatív kontroll, 2. *Nosema1*, 3. *Nosema2*, 4. *Nosema3*, 5. Molekula tömeg marker (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Fermentas, Vilnius, Lithuania), 6. *Nosema1* (*N. ceranae*) enzimes kezelés után, 7. *Nosema2* (*N. ceranae*) enzimes kezelés után, 8. *Nosema3* (*N. apis*) enzimes kezelés után.

Összesen 38 méhmintát vizsgáltunk meg, melyek közül 37 méhminta PCR során keletkezett DNS terméke az enzimmel történő emésztés során 175 nt és 262 nt hosszúságú szakaszokra vágódott, tehát *Nosema ceranae* fertőzésnek bizonyult. Egy méhminta PCR során keletkezett ampliconja nem vágódott el az emésztés során, megmaradt az eredeti hosszúságú PCR termék, ez az egy minta *Nosema apis* fertőzöttnek bizonyult.

3.2.3.2. Nukleotid sorrend-meghatározás

A keletkezett PCR termékek közül négynek meghatároztuk a nukleotid-sorrendjét, és összehasonlítottuk a génbanki adatokkal. Három olyan PCR terméket választottunk, amely az enzimes emésztés során két DNS szakaszra vágódott, illetve megszekvenáltuk azt az egy mintát, melynek a DNS-e az emésztés során nem vágódott el. A kapott szekvenanciaadatok alapján a három minta amely az emésztés során két DNS szakaszra vágódott 100% egyezést

mutatott a génbankban található *Nosema ceranae* szekvenciával, és 92% hasonlóságot a *Nosema apis* szekvenciával, az az egy minta pedig, amelyik PCR során keletkezett amplikonja nem vágódott el az emésztés során, 100% egyezést mutatott a génbanki *Nosema apis* szekvenciával. Ezek alapján elmondható, hogy a magyarországi méhészeteket vizsgálva, 38 *Nosema*-pozitív méhminta esetén 37-ben *Nosema ceranae* fertőzés volt jelen, míg egy esetben *Nosema apis* fertőzés.

3.3. Megbeszélés

3.3.1. A Magyarországon előforduló vírushatóságok monitoring vizsgálata

Az utóbbi időben jelentősen megnövekedett a tudományos érdeklődés a rovarokat fertőző vírusok iránt. A Földön élő fajok többsége rovarfaj, de ugyanakkor igen keveset tudunk az ezeket fertőző vírusokról. A gerincteleneket fertőző vírusok vizsgálata számos információval szolgálhat arról, hogy milyen különbségek vannak a gerincesek és gerinctelenek vírushatóságai között szövettani, immunológiai és ökológiai tekintetben. Lehetőségként merül fel a vírusok használata a rovarkártévek elleni biológiai védekezésben. Ugyanakkor igen fontos, hogy minél többet tudjunk a rovarokat fertőző vírusokról azért is, hogy lépéseket tehessünk az ökológiailag fontos rovarok, mint például a mézelő méhek nagyobb arányú pusztulásának megelőzése érdekében. Habár a mézelő méheket fertőző vírusok ritkán okoznak klinikai tüneteket, számos esetben betegségek okozóinak tekinthetők.

A mézelő méheket fertőző vírusok jelenlétének és elterjedtségük mértékének felderítése céljából két periódusban végeztünk monitoring vizsgálatot, 1999-2004 között és 2007-ben. A 2007-es évben végzett monitoring vizsgálat eredményeit össze tudtuk vetni a korábbi eredményekkel, és ezáltal a változásokat nyomon tudtuk követni. Továbbá, a kapott eredményeket össze tudtuk vetni más európai vizsgálatok eredményeivel is. A vírusok elterjedtségében jelentős változásokat tapasztalhatunk az említett időszakban. Két vírus jelenléte jelentősen csökkent: a deformált szárny vírus és a fekete anyabölcső vírus kisebb arányban voltak jelen a 2007-es évben, mint a korábbi vizsgálatok során. Ugyanakkor két vírus jelenléte erősen emelkedett: az egyik a heveny méhbénulás vírus, melynek jelenléte majdnem a duplájára emelkedett (37%-ról 70,8%-ra), a másik pedig a költéstömlősödés vírushatóságának jelenléte igen nagymértékben, a harmincszorosára emelkedett (2%-ról 62%-ra). Ez utóbbi vírus jelenlétének emelkedése magyarázat lehet arra, hogy a méhészek igen nagyarányú fiasítás-csökkenésről számoltak be 2007. közepén. A költéstömlősödés a fiasítás betegsége, mely a lárva bábozódási zavaraihoz, majd a lárva pusztulásához vezethet. A heveny méhbénulás vírus jelenlétének növekedése pedig részben magyarázata lehet a 2007-es év során tapasztalt nagy arányú népességcsökkenésnek a méhcsaládokon belül. Az amerikai méhpusztulásért felelősnek tartott izraeli heveny méhbénulás vírust nem lehetett hazai

méhcsaládokban kimutatni, tehát Magyarországon 2007-ben ez a vírus még nem volt jelen. A vírust azonban Európában már sikerült kimutatni Franciaországban (Blanchard *et al.*, 2008).

További eltérés az 1999-2004 közötti időszakhoz képest, hogy megemelkedett azoknak a családoknak az aránya, amelyek egyszerre több vírussal is fertőzöttek voltak. Korábban összességében a fertőzések 57%-a volt szimultán fertőzés, a 2007-es év felmérése alapján pedig már a fertőzések 76%-ában volt egyszerre több vírus is jelen az adott családban. Továbbá, míg korábban az volt a jellemző, hogy legfeljebb három vírus volt jelen egy időben, addig 2007-ben már olyan családokat is találtunk, amelyben mind az öt Magyarországon eddig kimutatott méhvírus jelen volt. Összességében a méhcsaládok vírusfertőzöttsége megemelkedett, ami a családot legyengítheti, és ezáltal érzékenyebbé teszi az egyéb fertőzésekkel szemben is, ami oda vezethet, hogy a méhcsaládok kevésbé tudják tolerálni a jellemzően jelen levő ázsiai nagy méhatka fertőzéseket és a *Nosema* jelenlétét.

A kapott eredményeket össze lehetett vetni más európai monitoring vizsgálatok eredményeivel, mivel Franciaországban és Ausztriában is végeztek hasonló vizsgálatokat. Ezáltal reális képet kaphattunk arról, hogy Magyarországon milyen a vírusok elterjedtsége a többi európai országhoz képest. Alapvetően hasonló vírusok voltak jelen nálunk is, mint a másik két országban. Kivételt képez a Kashmir méhvírus (Kashmir Bee Virus, KBV), mely Franciaországban megtalálható, illetve az első felmérés során még nem sikerült kimutatni a CBPV-t hazánkban, míg a másik két országban jelen volt. Általánosságban elmondható, hogy 1999-2004 közötti időszakban Magyarországon alacsonyabb arányban voltak jelen a vírusok, mint a szomszédos Ausztriában, vagy Franciaországban. Továbbá a szimultán fertőzéseket tekintve is elmondható, hogy egyszerre több vírus fertőzött egy családot a másik két országban.

Az, hogy a vírusok előfordulása rövid időn belül változhat, összhangban van a más állatfajoknál tapasztaltakkal. Előfordul, hogy egy bizonyos vírus jelenléte hirtelen megemelkedik egy gazdafaj populációban, és ez járványok kialakulásához vezet. Kérdés a jelen vizsgálat esetében azonban, hogy a vírusok előfordulásában tapasztalt változás vajon csak időszakosan jelentkezett, vagy ez a jelenlegi helyzet tartósan fenn fog maradni. Továbbá az 1999-2004 közötti felmérés még az Európai Unióhoz való csatlakozás előtt történt. Abban az időszakban ritkábban fordultak elő a méhvírusok a magyarországi méhészetekben, mint más Európai Unió országokban. Kisebb volt a szimultán fertőzések aránya is (Forgách *et al.*, 2007). Lehetséges, hogy a vírusok megemelkedett jelenlétének hátterében az Európai Unió csatlakozás áll, és a későbbiek során Magyarországra is az Európai Unió értékek lesznek

jellemzőek. Az Európai Unió csatlakozás előtt ugyanis kisebb volt a méhcsaládok, méhanyák importja, mert egyrészt sokkal drágább volt, másrészt pedig a szigorúbb volt a kereskedelem állategészségügyi szabályozása. A csatlakozás után azonban megemelkedett és részben ellenőrizhetetlenné vált a méhcsaládok, méhanyák és a méhészeti termékek forgalma a régebbi Unió tagállamok és Magyarország között ami a fertőzések számának emelkedéséhez vezetett. Például a korábbi felmérés során nem sikerült az idült méhbénulás vírusát kimutatni a hazai méhcsaládokban, bár lehetséges, hogy csak nagyon kis arányban volt jelen az országban, és ezért nem sikerült a jelenlétét igazolni. A 2007-es év során azonban a jelenléte már 5,5%-os volt. Ez a vírus abban az időszakban, amikor az 1999-2004-es vizsgálat folyt a többi európai országban kimutatható volt. Kérdés, hogy a Franciaországban már kimutatott izraeli heveny méhbénulás vírus (Blanchard *et al.*, 2008), melyet összefüggésbe hoztak a 2007-ben tapasztalható amerikai méhpusztulással (Cox-Foster *et al.*, 2007), vajon megjelenik-e a közel jövőben a hazai méhészetekben.

3.3.2. Fekete anyabölcső vírus (BQCV) genotípusok genetikai vizsgálata és filogenetikai összehasonlítása

A fekete anyabölcső vírus a mézelő méh széles körben elterjedt kórokozója. Bár a fertőzések gyakran tünetmentesek maradnak, az esetek egy részében az anya fejlődési alakjainak pusztulását tapasztalják a méhészek. Ez különösen anyanevelő tenyészetekben okoz nagy gazdasági károkat. Az anyafiasítás pusztulása mellett a BQCV fertőzés a kifejezett tüneteket nem mutató egyedek életfolyamataira is kedvezőtlen hatással lehet. A tünetek kialakulása és súlyosságuk mértéke több tényező együttes hatásának következménye, de alapvető a gazdaszervezet, a környezeti tényezők és a kórokozó genetikai tulajdonságainak szerepe. A gazdaszervezet ellenállóképességének illetve fogékonyságának genetikai faktorai (faj, fajta, tenyészvonal) mellett a környezeti tényezők (időjárás, család népessége, táplálék, esetleges mérgező anyagok szubletális jelenléte) és a társfertőzések (nosemosis, egyéb vírusok, *Varroa destructor* fertőzöttség) is befolyásolják a BQCV által okozott károsító hatásokat. A vírus részéről pedig pl. a szaporodóképesség, a virulencia, a sejt- és szövetkárosító hatás genetikailag szabályozott tulajdonságok, ezért fontosnak tartottuk a gyűjteményünkben levő BQCV vírusok genetikai vizsgálatát.

Régóta ismert, hogy a gerinceseket fertőző vírusok különféle genotípusai különféle virulenciával rendelkezhetnek. Ez azonban a mézelő méheket fertőző vírusok esetében még

nem bizonyított. A fekete anyabölcső vírus esetében sem állnak rendelkezésre tudományos adatok arról, hogy vannak-e a kórokozónak virulencia változatai; mivel viszont az egyes országokban a fertőzés gyakorisága, megítélése és kártétele eltéréseket mutat, feltételezhető, hogy a világszerte elterjedt BQCV virulencia szempontjából nem egységes.

Korábbi tanulmányokban már vizsgálták két méhvírus a költéstömlősödés vírus (Grabensteiner *et al.*, 2001), és a heveny méhbénulás vírus (Bakonyi *et al.*, 2002b) filogenetikai változékonyságát. A heveny méhbénulás vírus ugyanabba a vírusnemzettségbe tartozik, mint a fekete anyabölcső vírus (*Dicistroviridae*, *Cripavirus*). Bár a két vírus nukleotid szekvenciája csak 45%-ban hasonlít egymásra, de genomszerveződésük igen hasonló. Az SBV és az ABPV esetén is megfigyelhető, hogy a filogenetikai csoportosulások (clusterek) követik a vírus földrajzi lokalizációját, de csak kismértékű elkülönülés figyelhető meg köztük. A közép-európai ABPV teljes genom szekvenciák összehasonlítása a referencia törzsszel lényeges eltérést nem eredményezett a vírus különböző genotípusai között (Bakonyi *et al.*, 2003), és az SBV szekvenciák vizsgálatakor sem volt nagymértékű különbség sem a szerkezeti fehérjéket kódoló területen, sem pedig a nem szerkezeti fehérjéket kódoló területen (Grabensteiner *et al.*, 2001).

Jelen tanulmányban megvizsgáltuk 22 közép-európai BQCV genotípus és a dél-afrikai referencia genotípus közti hasonlóságot. A filogenetikai fák a vírusok különféle csoportosulásait mutatják. A törzsfá alapján, amely a helikáz enzimet kódoló génszakasz egy területére épül, azt lehet látni, hogy a közép-európai genotípusok nem csoportosulnak kifejezetten földrajzi eredetük alapján, csupán három lengyelországi genotípus különül el egy csoportba a többi közép-európai vírustól (4. ábra). A BQCV genotípusok ezen elkülönülésére magyarázat lehet, hogy Lengyelország irányába kisebb a méhanyák kereskedelme, a földrajzi távolság nagyobb, illetve Lengyelországtól egy természetes ökológiai gát (a Kárpát-hegység) választja el Magyarországot és Ausztriát. Ugyanakkor a magyarországi és az ausztriai BQCV genotípusok közti nagyobb hasonlóság magyarázható a két ország közti kisebb földrajzi távolsággal, a két ország méhpopulációinak (és ezáltal az ezeket fertőző BQCV-vírusoknak) keveredésével. A nagy fokú elkülönülést mely a dél-afrikai genotípus és az európai vírusok között tapasztalható az extrém távolság magyarázhatja. Mindazonáltal egy lengyelországi genotípus teljesen különálló csoportot alkot önmagában, amely genetikailag igen távol esik mind a közép-európai vírusoktól, mind pedig a dél-afrikai genotípustól.

A szerkezeti fehérjéket kódoló génszakasz alapján készített törzsfá kissé más képet mutat (4. ábra). A lengyelországi vírusok itt is elkülönült csoportot alkotnak az ausztriai-magyarországi

csoporthoz képest, de az ausztriai és a magyarországi genotípusok sem keverednek olyan nagy mértékben egymással, mint a helikáz régió alapján készített filogenetikai fán.

Annak érdekében, hogy megbecsüljük a filogenetikai vizsgálatok valódiságát, és hogy fényt derítsünk a három lengyelországi genotípusnak a két törzsfán való különböző elhelyezkedésére, egy teljesebb vizsgálatot végeztünk a BQCV néhány genotípusának esetében a genom csaknem teljes hosszán. A genetikai rekombináció magyarázatul szolgálhatott volna arra, hogy a három lengyelországi vírus miért mutat különböző csoportosulást a genom két különböző területét (ORF1 illetve ORF2) vizsgálva. A száj és körömfájás vírusánál a különféle szerotípusok közötti rekombinációt már leírták, mint gyakori jelenséget (Heath *et al.*, 2006). Hasonlóan a *Picornaviridae* család más nemzetségeibe tartozó vírusoknál is találtak genetikai rekombinációt. A *Dicistroviridae* víruscsalád igen nagyfokú hasonlóságot mutat a *Picornaviridae* családdal, és ezért mind a ketten a *Picornavirales* rendbe tartoznak. Éppen ezért nem volna meglepő, ha a BQCV genotípusok közt is lehetséges volna a genetikai rekombináció.

A BQCV szekvenciák összehasonlításakor jellemző mintázatot találhatunk a különböző genomterületek változékonyságában. Két genomterületet találtunk – mindegyik hosszabb volt, mint 100 nukleotid – amelyek minden vizsgált genotípusnál teljesen azonosak voltak. Mind a két terület egy nem kódoló szakaszra esik, közel a nyitott leolvasási keretek kezdetéhez. Ezek a területek gyakran génexpressziót szabályzó, promóter tulajdonságú területek. Ennek a területnek a működési feladata magyarázhatja a nagyfokú hasonlóságot, bár más *Dicistroviridae* családba tartozó vírusnál ilyen 100%-os egyezést nem találhatunk.

Úgy tűnik, hogy az ORF1 5' végéhez közel első harmada a vizsgált BQCV genomok legváltozékonnyabb területe. Az ORF1 a nem szerkezeti fehérjéket kódolja, bár a pontos szerepe még nem tisztázott (Leat *et al.*, 2000). Az enzimeket (helikáz, proteáz, RdRp) kódoló terület az ORF1 3' véghez közeli területein található. A gerinceseket fertőző vírusoknál általában a nem szerkezeti fehérjéket kódoló génszakaszok a felelősek a különféle genotípusok pathogenitásában virulenciájában tapasztalható különbségekért. Az ORF1-et tekintve, hogy a vizsgált három lengyelországi genotípus inkább hasonlít a dél-afrikai genotípusra, mint a magyarországi vírusra az ORF 3' véghez közeli területén. A génbankban található francia genotípusok közül kettő közeli kapcsolatot mutatott ezekkel a lengyelországi vírusokkal. További nyugat-európai BQCV vírusok vizsgálata több információt szolgáltatna ezeknek a lengyelországi vírusoknak a lehetséges eredetéről. Az ORF2 általánosságban kisebb változékonyságot mutatott, mint az ORF1 (9. és 10. táblázat).

Ugyanakkor ezen a területen azok a vírusok, amelyek közelebbi kapcsolatban vannak egymással (pl. a lengyelországi genotípusok) nagyobb változékonyságot mutatnak, mint az ORF1 második kétharmada. Mivel a mutáció okozta egyedi különbségek ezen a területen kifejezettebbek, ezért ez a terület alkalmasabb filogenetikai vizsgálatra.

Mivel az ugyanarról a területről származó vírusok (Poland4, Poland5 és Poland6) hasonlósága a genomon hirtelen megváltozott, a különféle genotípusok közti genetikai rekombináció előfordulása lehetséges. Mivel a jelen tanulmányban a vizsgált vírusok között nem bizonyítható a rekombináció, további vizsgálatok szükségesek ennek felderítésére esetleg más genotípusok bevonásával. A Poland4 a közép-európai vírusok között egyedi helyet foglal el, ezért további vizsgálatok szükségesek ennek a vírusnak a kórtani szerepének felderítésére, és további hozzá közeli kapcsolatban álló vírusok azonosítására. Az RT-PCR alapú diagnosztikai vizsgálatok az intergenikus területen tapadó primerek alkalmazása esetén ígéreknek a legmegbízhatóbbnak, mivel ez a terület igen nagyfokú hasonlóságot mutat, függetlenül attól, hogy mely földrajzi területről származik a vírus.

3.3.3. A *Nosema ceranae* első magyarországi kimutatása és a *Nosema apis*-hoz viszonyított előfordulási gyakoriságának vizsgálata

A *Nosema* egysejtű parazita által okozott betegség nagy károkat okozhat a méhcsaládokban. A fertőzés a család elnéptelenedéséhez és nagy számú egyedpusztuláshoz vezethet (Fries *et al.*, 1984). A betegség hatásának mértékét befolyásolhatja egyéb, másodlagos fertőzések jelenléte. Számos esetben a méhcsalád elnéptelenedésének, a magas mortalitásnak, több különféle kórokozó együttes jelenléte, és szinergista kölcsönhatása, illetve a stresszokozó környezeti hatás a kofaktora (Rogers and Williams, 2007). Ebből a megfigyelésből kiindulva feltételezhető, hogy a *Nosema* jelenléte megnövelheti a vírusok okozta fertőzések kártékony hatását a méhcsaládon belül. Európában a *Nosema apis*-t tartották a *Nosema*-betegség kórokozójának (Ellis and Munn, 2005). Magyarországon a betegség tünetei elsősorban télen és tavasszal jelentkeztek, nyáron és ősszel csak ritkán számoltak be a méhészek a *Nosema*-fertőzés jellemző tüneteiről. A betegségnek ez a szezonális volta azzal is magyarázható, hogy a téli időszak után a méhcsaládok érzékenyebbek, mert kevesebb fehérje és vitamin áll ilyenkor rendelkezésükre, nem megfelelőek a higiéniai körülmények, és gyengítő körülmény a télvégi, tavasz eleji hidegebb idő is. Az utóbbi években egyre több jelentés érkezett a betegség tüneteiről késő nyáron és kora ősszel is, eredetileg erős családoknál, és meleg időjárási viszonyok mellett is (Klee *et al.*, 2007). Jelen vizsgálatban azt találtuk, hogy a

magyarországi méhészetekben 2006-ban és 2007-ben gyűjtött 38 mintából 37-ben *Nosema ceranae* volt és csupán egy mintában találtunk *Nosema apis*-t. Híges és munkatársai Spanyolországban 2006-ban hasonló eredményre jutottak. Azt találták, hogy a vizsgált 12 mintából 11-ben *N. ceranae* volt, és csak egy mintában volt *N. apis*. Kérdéses, hogy a *N. ceranae* mostanában terjedt el gyorsan Európában, és alkalmazkodott az *Apis mellifera* családokhoz, vagy korábban is jelen volt már, csak a két faj elkülönítése az alaktani hasonlóság, a gyors és megbízható elkülönítési módszerek hiánya miatt nem volt lehetséges, és ezért nem tudtunk a jelenlétéről. Az általunk kidolgozott PCR-RFLP módszer, alkalmasnak bizonyult a két *Nosema* faj elkülönítésére szekvenálás nélkül is, megfelelő mind a diagnosztikában való alkalmazásra, mind pedig további kutatások segítségével szolgálhat. A betegség évszaktól független megjelenése arra engednek következtetni, hogy csak nemrégiben terjedt el Európában a *N. ceranae*, mivel ez a kórokozó eredetileg az Ázsia trópusi és szubtrópusi területein honos *Apis cerana* parazitája volt, valószínűleg a melegebb klíma a kedvezőbb számára. Lehetséges, hogy Magyarországon a globális felmelegedés miatt emelkedő átlaghőmérséklet és a megváltozó időjárási viszonyok kedvező körülményeket teremtettek a megtelepedéséhez és elszaporodásához, ez okozta a hirtelen elterjedését, és a *Nosema*-betegség korábban szokatlan, aszezonális, egész évben megfigyelhető jelenlétét.

A *N. ceranae* Európában való elterjedése számos kérdést vet fel. Kérdéses, hogy az új kórokozónak az európai *Apis mellifera* állományokban milyen a populációdinamikája és az életciklusa. Kérdéses továbbá, hogy a két *Nosema* faj között milyen kölcsönhatás áll fenn, illetve, hogy milyen kórtani hatással van az európai méhcsaládokra. Kérdés az is, hogy milyen hatása van annak, hogy egy adott betegség korábban csak az év egy szakaszában volt jelen, de jelenleg úgy tűnik, hogy a szezonális megszűnik, és a nosemosis egész évben fennálló betegséggé alakul át. Lehetséges, hogy a 2006-ban, 2007-ben Magyarországon tapasztalható nagy arányú népességcsökkenés a méhcsaládokban (legalábbis részben) a *N. ceranae* megjelenésének tudható be, de az is lehetséges, hogy az Európában újnak számító parazita által okozott fertőzés még ha tünetekben nem is nyilvánul meg, a méhcsaládokat gyengíti, ami teljesítménycsökkenéshez, nagy számú egyedpusztuláshoz, a család leromlásához vezethet. A Magyarországon új faj megjelenésének másik következménye, hogy a betegség súlyosabb formában jelentkezhet. Megfigyelhető, ha egy kórokozó egy addig számára idegen fajban (jelen esetben az *Apis mellifera*-ban) megjelenik, akkor az adott fajban súlyosabb károkat okoz. Abban az esetben, ha egy kórokozó régebb óta jelen van a gazdafajban, a gazda ellenállóképessége a kórokozó ellen megnövekszik. Az *A. mellifera* esetében a *N. ceranae* új

kórokozónak számít, ami ezáltal súlyosabb károkat okozhat a magyarországi méhcsaládokban, mint korábban a *N. apis*. Az Európában idegen kórokozónak az elterjedése alátámasztja azt is, hogy a fertőzött biológiai termékek kontinensek közötti kereskedelme okozhatja egy tájidegen, jelen esetben trópusi parazita megjelenését és elterjedését Európában, és ennek előre nem látható következményei lehetnek. Korábban a Nosema-betegség kezelésére a Fumagillint használták, és ez teljesen hatékony a *N. ceranae* ellen is. A készítmény használatát azonban az Európai Unió 2004-ben megtiltotta. A vizsgálati időszakban a Fumagillin használata tiltott volt. Kérdéses, hogy újraengedélyezése csökkenti-e a jövőben az *Nosema* által okozott gondokat.

4. Új eredmények

1. Polimeráz láncreakcióra alapozott gyorsdiagnosztikai eljárásokat dolgoztunk ki a mézelő méh számos vírushatásának kimutatására, melyek közül több (ABPV, BQCV, DWV, IAPV) saját tervezés-fejlesztés eredménye.
2. A fenti módszereket felhasználva két periódusban Magyarországon elsőként végeztünk felméréseket az öt leggyakoribb méh-vírus elterjedtségének felmérésére, és a két periódusban tapasztalt eltérések alapján járványtani következtetéseket vontunk le a méh-vírusok fertőzéskinetikájának vonatkozásában.
3. Meghatároztuk több BQCV genotípus teljes kódoló régióinak nukleotidsorrendjét, ezek alapján filogenetikai összehasonlító vizsgálatokat végeztünk közép-európai BQCV vírusok felhasználásával.
4. Megállapítottuk, hogy a BQCV esetében (szemben a gerincesek vírusaival) jóval nagyobb a genetikai variabilitás a nem strukturális proteinek kódoló génszakaszokon, mint a struktúrproteinek génjein.
5. PCR alapú diagnosztikai módszert dolgoztunk ki a mézelő méh Nosema-fertőzésének kimutatására, ami az analitikai RFLP analízis révén lehetőséget ad a két Nosema faj (*N. apis* és *N. cerenae*) elkülönítésére.
6. Megállapítottuk, hogy Magyarországon a Nosema-fertőzések túlnyomó többségét a *N. cerenae* okozza.

5. Összefoglalás

A mézelő méh (*Apis mellifera*) jelentős szerepet tölt be a bioszférában és a mezőgazdaságban. A kultúrnövények beporzásával hozzájárul a termés mennyiségének növekedéséhez, valamint az általuk termelt termékek több iparágban fontos szerepet töltenek be. A mézelő méh jelentős szerepet tölt be a vadon élő növényfajok diverzitásának fenntartásában is. A méhcsaládok életét és teljesítményüket számos tényező befolyásolja, melyek közül igen nagy jelentőségűek az egyes fertőző betegségek kórokozói, ezért a méhek egészségvédelmében fontos szerepet játszik a fertőző betegségek felismerése, és a kórokozók vizsgálata. Az értekezésben összefoglalt munka célja a magyarországi mézelő méh családokat fertőző vírusok jelenlétének és elterjedtségének kimutatása, a fekete anyabölcső vírus filogenetikai vizsgálata, illetve egy egysejtű parazita által okozott betegség, a Nosema-betegség kórokozójának a vizsgálata volt.

Munkánk során monitoring vizsgálatokat végeztünk a mézelő méheket fertőző 6 vírus (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, SBV és IAPV) jelenlétének és elterjedtségének kimutatása érdekében két periódusban: 1999-2004 között 52, és 2007-ben 72 méhészetből gyűjtött minta segítségével. A két vizsgálat eredményeit összehasonlítva információt kaptunk, hogy az Európai Unió csatlakozás után mennyiben változott a magyarországi mézelő méhek vírusfertőzöttsége. A vizsgálatok azt mutatták, hogy 2004 előtt alacsonyabb volt az öt kimutatható vírus (ABPV, BQCV, CBPV, DWV és SBV) jelenléte Magyarországon más nyugat-európai országokhoz képest. A 2007-es felmérés eredményeképp azt találtuk, hogy a csatlakozás után némely vírus előfordulási aránya és a szimultán vírusfertőzések aránya is megemelkedett a korábbi állapotokhoz viszonyítva. Az amerikai nagy arányú méhpusztulásért felelős izraeli heveny méhbénulás vírust pedig nem sikerült kimutatni.

Elvégeztük a fekete anyabölcső vírus közép-európai genotípusainak filogenetikai vizsgálatát. A BQCV genom két különböző területének (ORF1 és ORF2) részleges szekvenciái segítségével 22 magyarországi, ausztriai és lengyelországi vírus filogenetikai törzsfáját készítettük el. A két törzsfá eltérő képet mutatott. Az ORF2 génszakasza alapján készített törzsfán a vírus genotípusainak a filogenetikai csoportosulásai követik a földrajzi elhelyezkedéseket. Az ORF1 génszakasz alapján készített törzsfán nem lehet ilyen földrajzi eredet szerinti csoportosulást megfigyelni. A két törzsfán három lengyelországi vírus eltérő módon helyezkedett el. Annak érdekében, hogy fényt derítsünk ennek okára, egy komplettebb vizsgálatot végeztünk a BQCV néhány genotípusának a genom csaknem teljes hosszán.

Ennek eredményeképp azt találtuk, hogy az ORF1 első harmada igen változékony szakasznak bizonyul, bár ennek a területnek a szerepe még tisztázatlan. Az ORF1 második kétharmada a közeli rokonságban álló vírusoknál viszont igen konzervatív volt. Az ORF2 kevésbé volt változékony, mint az ORF1 első harmada, de mivel a mutáció okozta egyedi különbségek ezen a területen kifejezettebbek, ezért elmondhatjuk, hogy ez a terület alkalmasabb filogenetikai vizsgálatra. Találtunk mindkét ORF előtt egy-egy területet, amely 100%-os homológiát mutatott. Lehetséges, hogy ezek a területek génexpressziót szabályozó promóter tulajdonsággal rendelkeznek. A kérdéses három lengyelországi vírusnak a hasonlósága a genomon hirtelen megváltozik, ezért elmondhatjuk, hogy valószínűleg genetikai rekombináció történt, de a jelen tanulmányban a vizsgált vírusok között nem találtuk meg, hogy konkrétan mely genotípussal történt a rekombináció.

A mézelő méh *Nosema*-betegsége világszerte elterjedt. Az európai és magyarországi méhészetekben korábban a *Nosema apis* okozta ezt a betegséget, mely jelentős károkat képes okozni a méhészetekben. Azonban az elmúlt évek során számos jelentés érkezett, hogy a betegség tünetei nyáron és ősszel is megfigyelhetőek, holott a *N. apis* csak télen és kora tavasszal okoz tüneteket. Felmerült a kérdés, hogy nem egy Európában eddig új faj, az Ázsiában honos és az eredetileg ázsiai méheket (*Apis cerana*) fertőző *Nosema ceranae* terjedt-e el az európai méhészetekben. 2006-ban Spanyolországban sikerült kimutatni a *N. ceranae* jelenlétét az európai méhcsaládokban. Mivel a két *Nosema* faj elkülönítése alak alapján igen nehéz, kidolgoztunk egy molekuláris biológiai módszert, mellyel gyorsan és megbízhatóan ki lehet mutatni a *Nosema* kórokozót, és a két fajt el lehet egymástól különíteni. Az ország egész területéről 38 méhmintát vizsgáltunk meg, minden megyéből legalább egyet, ezáltal a vizsgálat az ország egész területére kiterjedt. A PCR-RFLP módszer segítségével sikerült Magyarországon először kimutatnunk az eddig idegen *Nosema ceranae*-t, és megállapítottuk, hogy a 38 méhmintában *N. ceranae* fertőzés volt jelen, míg egy mintában volt csak jelen a korábban jellemző *N. apis*. Ez azt jelenti, hogy Magyarországon a *N. ceranae* van többségében jelen a *N. apishoz* viszonyítva.

6. Summary

Honey bees (*Apis mellifera* L.) play an important role in nature and agriculture. They are the most important pollinators of different plants among the field crops. Besides that bee products were used from ancient times until today, for therapeutic purposes, and consumption. Since the awareness to the importance of bees as producers of food, as well as pollinators and producers of industrial raw material have been increased, different bee diseases are regarded with more attention, and scientific research of bee pathogens has been continued with increased effort and interest. The aim of this study was to carry out a survey on the occurrence of the most important bee-pathogenic viruses in Hungary, a phylogenetic analyses of Black Queen Cell Virus genotypes, and to diagnose and identify *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in Hungarian *Apis mellifera* colonies.

This survey aimed to reveal occurrence and prevalence of six bee-pathogenic viruses (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, SBV and IAPV) in Hungary. The investigated samples were collected in 2007 from 72 Hungarian apiaries located in different regions of the country. Our research group managed to make a similar survey before joining the EU between 1999 and 2004. In this study we compared the results of the monitoring survey in 1999-2004 to that 2007. After joining the European Union changed the prevalence of the bee infecting viruses in Hungarian apiaries. The results of the earlier survey showed that the prevalence of the five viruses (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, SBV) in Hungarian apiaries was generally lower than that found in surveys performed in France and Austria. In the survey in 2007 we found that after joining the EU the prevalence of some viruses increased. In 2007 there were more simultaneous infections in Hungarian apiaries compared to that in 1999-2004. We have not found the Israeli Acute Bee Paralysis Virus in Hungary, which virus is strongly correlated with the presence of colony collapse disorder in the United States.

Phylogenetic analyses of 22 black queen cell virus (BQCV) genotypes collected from honeybee colonies in Poland, Austria and Hungary was performed on a partial ORF1 and partial ORF2. The two phylogenetic tree showed different pictures. The phylogeny based on the ORF2 region showed clustering of the genotypes corresponding to their geographic origin. This clustering on the ORF1 cannot be observed. Three Polish samples showed different distribution on the two tree. In order to investigate this discrepancy in more detail, the nearly complete genome sequences of some BQCV strains were determined. Comparison of the different genome regions revealed that ORF1 was found more variable on the first 1700 nt

compared to ORF2. The 3' proximal ORF1 was more conserve than ORF2 regarding the closely related genotypes. However, ORF2 seems to be a more suitable target region for phylogenetic analysis of BQCV, because the mutation-derived individual sequence changes are more characteristic in this area. The 5'-UTR and the intergenic regions of the BQCV genome are highly conserved with longer homologous sections. These areas usually play central roles in the transcription-initiation and the expression regulation of the subsequent genes. The sudden changes in the similarity levels of the three Polish BQCV strains in different genomic regions are indicative of preceding recombination events.

The nosema disease of the European honeybee is present worldwide in bee colonies. *Nosema apis* was considered as the causative agent of the disease in European and Hungarian apiaries, which may have many negative effect on the colony, and may cause heavy economic losses in apicultures. *Nosema apis* usually infects bees during the spring in Europe. A new tendency is for parasitic disease to occur at a wider range of season, resulting in infected bees from spring until the beginning of autumn. This has led to the suspicion that a new species *Nosema ceranae*, that infest originally the Asian honeybee (*Apis cerana*) is infecting bees in Hungary and other European countries. *N. ceranae* was first detected in European honeybee in Spain in 2006. Because it is difficult to distinguish *N. ceranae* and *N. apis* morphologically, a rapid and accurate assay has been developed to differentiate *N. apis* and *N. ceranae* based on PCR-RFLP. The assay was tested on 38 *Nosema*-infested bee samples, which were collected from geographically distant Hungarian bee colonies representing all regions of the country. Only one sample contained *N. apis*, and the other 37 *N. ceranae*, which indicates the dominance of *N. ceranae* in Hungarian apiaries. This is the first report on the presence of *Nosema ceranae* in Hungary.

7. A témával összefüggő saját közlemények jegyzéke

Forgách, P., T. Bakonyi, **Zs. Tapaszti**, N. Nowotny, M. Rusvai. (2007) Prevalence of pathogenic bee viruses in Hungarian apiaries: Situation before joining the European Union. J. Invertebr. Pathol. 98 (2): 235-238.

Zsuzsanna Tapaszti, Petra Forgách, Csaba Kővágó, László Békési, Tamás Bakonyi, Miklós Rusvai. (2009) First detection and dominance of *Nosema ceranae* in Hungarian honeybee colonies. Acta Veterinaria Hungarica 57 (3): 383-388.

Zsuzsanna Tapaszti, Petra Forgách, Csaba Kővágó, Grażyna Topolska, Norbert Nowotny, Miklós Rusvai, Tamás Bakonyi. (2009) Genetic analysis and phylogenetic comparison of Black Queen Cell Virus genotypes. Veterinary Microbiology 139 (3-4): 227-234.

Tapaszti Zsuzsanna, Forgách Petra, Bakonyi Tamás, Rusvai Miklós. (2010) A mézelő méh (*Apis mellifera* L.) vírusfertőzéseinek előfordulása a magyarországi méhészetekben. Magyar Állatorvosok Lapja 132: 119-125.

8. Egyéb közlemények jegyzéke

Tóth I. E., O. Wiesel, Zs. Boldogkői, K. Bálint, **Zs. Tapaszi**, I. Gerendai.2007.
Predominance of supraspinal innervation of the left ovary. *Microsc. Res. Tech.* 70(8): 710-718.

9. Előadások jegyzéke

Tapaszti Zsuzsanna, Forgách Petra, Kővágó Csaba, Bakonyi Tamás, Hornyák Ákos, Doron Harel, Grażyna Topolska, Rusvai Miklós. (2004) A fekete anyabölcső vírus közép-európai izolátumainak filogenetikai vizsgálata. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely

Tapaszti Zsuzsanna, Forgách Petra, Grażyna Topolska, Norbert Nowotny, Rusvai Miklós, Bakonyi Tamás. (2005) A fekete anyabölcső vírus közép-európai izolátumainak filogenetikai vizsgálata. Akadémiai beszámolók, Budapest

Zsuzsanna Tapaszti, Petra Forgách, Csaba Kővágó, Tamás Bakonyi, Grażyna Topolska, Miklós Rusvai. (2005) Investigations on possible genetic recombinations between central-european black queen cell virus genotypes. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely

Petra Forgách, Alina Palade, **Zsuzsanna Tapaszti**, Tamás Bakonyi, Miklós Rusvai. (2005) Demonstration of chronic paralysis virus of honey bees using RT-PCR and electron microscopic survey of the causative agent. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely

Zsuzsanna Tapaszti, Petra Forgách, Grażyna Topolska, Norbert Nowotny, Miklós Rusvai, Tamás Bakonyi. (2005) Phylogenetic diversity of Central-European Black Queen Cell Virus genotypes. Apimondia 2005, 39 th Apimondia International Apicultural Congress, Dublin, Ireland

Petra Forgách, Tamás Bakonyi, **Zsuzsanna Tapaszti**, Norbert Nowotny, Miklós Rusvai. (2005) Investigations on the prevalence of bee pathogen viruses in Hungarian apiaries – situation before joining the EU. Apimondia 2005, 39 th Apimondia International Apicultural Congress, Dublin, Ireland

Tapaszti Zsuzsanna, Forgách Petra, Bakonyi Tamás, Grażyna Topolska, Rusvai Miklós. (2006) A fekete anyabölcső vírus közép-európai izolátumai közti lehetséges rekombináció vizsgálata. Akadémiai beszámolók, Budapest

Forgách Petra, **Tapaszi Zsuzsanna**, Rusvai Miklós, Bakonyi Tamás. (2006) A krónikus méhbénulás vírus vizsgálata és kimutatása Magyarországon. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely

Tapaszi Zsuzsanna, Forgách Petra, Bakonyi Tamás, Rusvai Miklós. (2007) A krónikus méhbénulás vírus genetikai vizsgálata. Akadémiai beszámolók, Budapest

Zsuzsanna Tapaszi, Petra Forgách, Csaba Kővágó, László Békési, Tamás Bakonyi, Miklós Rusvai. (2007) Detection of the microsporidian parasite *Nosema ceranae* in European honeybee (*Apis mellifera l.*) colonies in Hungary. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely

Tapaszi Zsuzsanna, Lucija Poljansek, Aleš Gregorc, Bakonyi Tamás, Rusvai Miklós. (2008) A méhanyák és dajkaméheik vírusfertőzéseinek összehasonlítása. Akadémiai beszámolók, Budapest

10. Irodalomjegyzék

- Allen, M., B. V. Ball, R. F. White, J. F. Antoniw.** 1986. The detection of acute paralysis virus in *Varroa jacobsoni* by the use of a simple indirect ELISA. *J. Apic. Res.* 25: 100-105.
- Allen, M., B. V. Ball.** 1995. Characterisation and serological relationships of strains of Kashmir bee virus. *Annales Applied Biology* 126:471-484.
- Allen, M., B. V. Ball.** 1996. The incidence and world distribution of the honey bee viruses. *Bee World* 77: 141-162.
- Anderson, J.** 1938. Chalkbrood. *Scott. Beekpr.* 14: 106.
- Anderson, D. L.,** 1984. A comparison of serological techniques for detecting and identifying honeybee viruses. *J. Invertebr. Pathol.* 44: 233-243.
- Antunez, K., B. D'Alessandro, E. Corbella, G. Ramallo, P. Zunino.** 2006. Honeybee viruses in Uruguay. *J. Invertebr. Pathol.* 93 (1): 67-70.
- Bailey, L.** 1965. The occurrence of chronic and acute paralysis viruses in bees outside Britain. *Journal of Invertebrate Pathology* 7: 167-169.
- Bailey, L.,** 1967. The incidence of virus diseases in the honey bee. *Ann. Appl. Biol.* 60: 43-48.
- Bailey, L.** 1975. Recent research on honey bee viruses. *Bee World* 56: 55-64.
- Bailey, L.** 1976. Viruses attacking the honey bee. *Adv. Virus Res.* 20: 271-304.
- Bailey, L.** 1983. *Melissococcus pluton*, the cause of European foulbrood of honey bees (*Apis* spp.), *J. Appl. Bacteriol.* 55: 65-69

- Bailey, L., A. J. Gibbs, R. D. Woods.** 1963. Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology* 21: 390-395.
- Bailey, L., A. J. Gibbs, R. D. Woods.** 1964. Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology* 23: 425-429.
- Bailey, L., A. J. Gibbs.** 1964. Acute infection of bees with paralysis virus. *Journal of Insect Pathology* 6: 396-407.
- Bailey, L., E. F. W. Fernando.** 1972. Effects of sacbrood virus on adult honeybees. *Annals of Applied Biology* 72: 27-35.
- Bailey, L., R. D. Woods.** 1977. Three previously undescribed viruses from the honey bee. *Journal of General Virology* 25: 175-186.
- Bailey L., B. V. Ball, J. N. Perry.** 1981. The prevalence of viruses of honeybees in Britain. *Ann. Appl. Biol.* 97: 108-118.
- Bailey, L., M. D. Collins.** 1982. Reclassification of '*Streptococcus pluton*' (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton*, nom. rev.; comb. nov., *J. Appl. Bacteriol.* 53: 215-217
- Bailey, L., B. V. Ball and J. N. Perry.** 1983. Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Annals of Applied Biology* 103: 13-20.
- Bailey, L. and B. V. Ball.** 1991. Honeybee pathology = Hartcourt Brace Jovanovich Sidcup, Kent, UK. 21-24. p.
- Bakonyi T., R. Farkas, A. Szendrői, M. Dobos-Kovács, M. Rusvai.** 2002. (a) Detection of acute bee paralysis virus by RT-PCR in honey bee and *Varroa destructor* field samples: rapid screening of representative Hungarian apiaries. *Apidologie* 33: 63-74.

- Bakonyi, T., E. Grabensteiner, J. Kolodziejek, M. Rusvai, G. Topolska, W. Ritter, N. Nowotny.** 2002. (b) Phylogenetic analysis of acute bee paralysis strains. *Appl. Environm. Microbiol.* 68 (12): 6446-6450.
- Bakonyi, T., P. Forgách, G. Topolska, N. Nowotny and M. Rusvai.** 2003. Nucleic acid investigations of two central European strains of acute bee paralysis virus isolated from honey bees (*Apis mellifera* L.), *Apimondia 2003*, 38th International Scientific Apicultural Congress, Ljubljana, Slovenia
- Ball, B. V.** 1989. The incidence of pathogens in honey bee colonies infested with *Varroa jacobsoni*. Rothamsted Experimental Station, Harpenden, UK, p 13. (unpublished).
- Ball, B. V. and M. F. Allen.** 1988. The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Annals of Applied Biology* 113: 237-244.
- Batujev, J. M.** 1979. Újdonságok a méhbénulás vírusáról. *Méhészet*, 7. 10. (orosz nyelven)
- Beetsma, J.** 1994. The varroa mite, a devastating parasite of western honeybees and an economic threat to beekeeping. *Outlook on Agriculture* 23: 169-175.
- Békési L., B. V. Ball, M. Dobos-Kovács, T. Bakonyi, M. Rusvai.** 1999. Occurrence of acute paralysis of the honey bee (*Apis mellifera*) in a Hungarian apiary infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Acta Veterinaria Hungarica* 47: 319-324.
- Békési, L.** 1999. *Méhészet és méhegészségügy*. Budapest
- Benjeddou, M., N. Leat, M. Allsopp, S. Davison.** 2001. Detection of Acute Bee Paralysis Virus and Black Queen Cell Virus from Honeybees by Reverse Transcriptase PCR. *Appl. Environm. Microbiol.* 67 (5): 2384-2387.
- Betts, A. D.** 1919. Fungus diseases of bees. *Bee World* 1: 132.

- Blanchard, P., F. Schurr, O. Celle, N. Cougoule, P. Drajnudel, R. Thiéry, J. P. Faucon, M. Ribière.** 2008. First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 99 (3): 348-350.
- Bowen-Walker, P. L., S. J. Martin and A. Gunn.** 1999. The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *J. Invertebr. Pathol.* 73: 101-106.
- Brčák, J., O. Kralik.** 1965. On the structure of the virus causing sacbrood of the honey bee. *J. Invertebr. Pathol.* 7: 110–111.
- Burges, H. D., E. U. Canning, I. K. Hulls.** 1974. Ultrastructure of *Nosema oryzaephili* and the taxonomic value of the polar filament. *J. Invertebr. Pathol.* 23 (2): 135-139.
- Burnside, C. E.** 1930. Fungous Diseases of the Honeybee. U.S. Department of Agriculture Technical Bulletin 149:1-43.
- Calderón, R. A., J. van Veen, H. G. Arce, M. E. Esquivel.** 2003. Presence of deformed wing virus and Kashmir bee virus in Africanized honey bee colonies in Costa Rica infested with *Varroa destructor*. *Bee World* 84: 112-116.
- Chen, Y., Y. Zhao, J. Hammond, H. Hsu, J. Evans, M. Feldlaufer.** 2004. Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. *J. Invertebr. Pathol.* 87 (2-3): 84-93.
- Corbet, S. A., I. H. Williams, J. L. Osborne.** 1991. Bees and the pollination of crops and wild flowers in the European Community. *Bee World* 72: 47-59.
- Cox-Foster, D. L., S. Conlan, E. C. Holmes, G. Palacios, J. D. Evans, N. A. Moran, P. L. Quan, T. Briese, M. Hornig, D. M. Geiser, V. Martinson, D. vanEngelsdorp, A. L. Kalkstein, A. Drysdale, J. Hui, J. Zhai, L. Cui, S. K. Hutchison, J. F. Simons, M. Egholm, J. S. Pettis, W. I. Lipkin.** 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318: 283-287.

- De Guzman, L. I., T. E. Rinderer, L. D. Beaman.** 1993. Survival of *Varroa jacobsoni* Oud. (Acari: Varroidae) away from its living host *Apis mellifera* L. Exp. Appl. Acarol. 17: 283-290.
- De La Torre, J. C. and M. B. A. Oldstone.** 1996. Anatomy of viral persistence: mechanisms of persistence and associated disease. Advances in Virus Research 46: 0-12.
- Ellis, J. D. and P. A. Munn.** 2005. The worldwide health status of honey bees. Bee World 86: 88-101.
- Evans, J. D., A. C. Hung.** 2000. Molecular phylogenetics and the classification of honey bee viruses. Arch. Virol. 145: 2015-2026.
- Evans, J. D.** 2001. Genetic evidence for coinfection of honey bees by acute bee paralysis and Kashmir bee viruses. J. Invertebr. Pathol. 78: 189-193.
- Faucon, J. P., C. Vitu, P. Russo, M. Vignoni.** 1992. Diagnosis of acute paralysis: application to the epidemiology of honey bee viral diseases in France in 1990. *Apidologie* 23:139-146.
- Fehér, I.** 2003. Magyarország méztermelésének és exportjának alakulása (1992-2002). Világgazdaság (május 17.) 12-17.
- Forgách, P., T. Bakonyi, Zs. Tapasztai, N. Nowotny, M. Rusvai.** 2007. Prevalence of pathogenic bee viruses in Hungarian apiaries: Situation before joining the European Union. J. Invertebr. Pathol. 98 (2): 235-238.
- Fries, I.** 1993. *Nosema apis* – A parasite in the honey bee colony. Bee World 74: 5-19.
- Fries, I.** 1997. Protozoa, in: Morse R.A. and Flottum K. (Eds.) Honey bee pests, predators, and diseases, A.I. Root Company, Medina, Ohio USA, 3rd ed. pp. 57-76.
- Fries, I., G. Ekbohm, E. Villumstad.** 1984. *Nosema apis*, sampling techniques and honey yield. J. Apicult. Res. 23: 102-105.

- 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.
- Genersch, E., E. Forsgren, J. Pentikäinen, A. Ashiralieva, S. Rauch, J. Kilwinski, I. Fries.** 2006. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:501-511.
- Ghosh, R. C., B. V. Ball, M. M. Willcocks, M. J. Carter.** 1999. The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-like virus. Journal of General Virology 80: 1541-1549.
- Giauffret, A., Y. P. Tahercio.** 1967. Les mycoses de l'Abeille (*Apis mellifica* L.) etude de quelques antimycosiques. Bulletin Apicole 10: 163-174.
- Gilliam, M.** 1993. Chalkbrood control. En: Connor LJ, Rinderer T, Sylvester HA, Wongsiri S (Ed), Asian Apiculture, Wicwas Press, Cheshire, Connecticut, USA, pp. 589-595.
- Gilliam, M., J. D. Vandenberg.** 1997. Fungi. In Honey Bee Pests, Predators, and Diseases, Third Edition, R. A. Morse and K. Flottum [eds.]. The A. I. Root Company, Medina, OH., Pp. 81-110.
- Govan, V. A., N. Leat, M. Allsopp, S. Davison.** 2000. Analysis of the complete genome sequence of acute bee paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect-infecting RNA viruses. Virology 277: 457-463.
- Grabensteiner, E., W. Ritter, M. J. Carter, S. Davison, H. Pechhacker, J. Kolodziejek, O. Boecking, I. Derakhshifar, R. Moosbeckhofer, E. Licek, N. Nowotny.** 2001. Sacbrood virus of the honeybee (*Apis mellifera*): Rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription-PCR. Clin Diagn. Lab. Immunol. 8(1): 93-104.

- Hansen, H., and C. J. Brodsgaard.** 1999. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World* 80:5-23.
- Heath, L., E. van der Walt, A. Varsani and D. P. Martin.** 2006. Recombination patterns in aphthoviruses mirror those found in other picornaviruses. *J Virol.* 80: 11827-11832.
- Heyndrickx, M., K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, P. Janssen, K. Kersters, P. de Vos, N. A. Logan, N. Ali, R. C. W. Kerkeley.** 1996. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al., 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 270-279.
- Higes, M., R. Martin and A. Meana.** 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J. Invertebr. Pathol.* 92: 93-95.
- Higes, M., R. Martin, E. Garriado-Bail'on, A. Meana.** 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invertebr. Pathol.* (2007), doi: 10.1016/j.jip.2006.11.001
- Hornitzky, M. A. Z., S. Wilson.** 1989. A system for the diagnosis of the major bacterial brood diseases. *Journal of Apicultural Research* 28: 191-195.
- Huang, W.-F., Jiang, J.-H. and Chen, Y.-W. , Wang, C.-H.** 2005. Complete rRNA Sequence of the *Nosema ceranae* from honeybee (*Apis mellifera*). <https://gra103.aca.ntu.edu.tw/gdoc/F90632004a.pdf>
- Hung, A. C. F., C. Y. S. Peng, H. Shimanuki.** 2000. Nucleotide sequence variations in Kashmir bee virus isolated from *Apis mellifera* and *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 31:17-23.
- Klee, J., A. M. Besana, E. Genersch, S. Gisder, A. Nanetti, D. Q. Tam, T. X. Chinh, F. Puerta, J. M. Ruz, P. Kryger, D. Message, F. Hatjina, S. Korpela, I. Fries, R. J.**

- Paxton.** 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* 96: 1-10.
- Kulincevic, J. M., W. C. Rothenbuhler.** 1989. The effects of artificial infection with chronic bee paralysis virus on queens from strains of honeybee resistant or subceptible to hairless-black syndrome. *Journal of Apicultural Research* 28(2): 79-80.
- Lanzi, G., J. R. De Miranda, M. B. Boniotti, C. E. Cameron, A. Lavazza, L. Capucci, S. M. Camazine, C. Rossi.** 2006. Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.). *J. Virol.* 80: 4998–5009. doi: 10.1128/JVI.80.10.4998-5009.2006.
- L'Arrivée, J. C. M.** 1965. Sources of *nosema* infection. *Amer. Bee J.* 105: 246-248.
- Leat, N., B. V. Ball, V. Govan, S. Davison.** 2000. Analysis of the complete genome sequence of black queen-cell virus, a picorna-like virus from honey bees. *J. Gen. Virol.* 81: 2111-2119.
- Maassen, A.** 1906. Die Aspergillusmykose der Bienen. *Mitteilungen aus der Kaiserlichen Biologischen Anstalt für Land- und Forstwirtschaft* 2: 30-31.
- Mansy, F., F. Brancart, C. Liesnard, A. Bollen, E. Godfroid.** 1999. A PCR based DNA hybridization capture system for the detection of human cytomegalovirus. A comparative study with other identification methods. *Journal of Virological Methods* 80: 113–122.
- Martin, S. J.** 1998. A population dynamic model of the mite *Varroa jacobsoni*. *Ecological Modelling* 109: 267-281.
- Martin, S. J.** 2001. The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. *Journal of Applied Ecology* 38: 1082-1093.
- Martin, S. J., A. Hogarth, J. van Breda, J. Perrett.** 1998. A scientific note on *Varroa jacobsoni* Oudemans and the collapse of *Apis mellifera* colonies in the United Kingdom. *Apidologie* 29: 369-370.

- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A. M., Garrido-Bailón, E. and Higes, M.** 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. Appl. Environ. Microbiol. 73(20): 6331–6338.
- Matheson, A.** 1996. World bee health update 1996. Bee world 77: 45-51.
- Oldstone, M.B.A.** 1989. Viral persistence. Cell 56: 517-520.
- Ribiére, M., C. Triboulot, L. Mathieu, C. Aurieres, J.-P. Faucon, M. Pepin.** 2002. Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. Apidologie 33: 339-351.
- Rinderer, T. E., T. J. Green.** 1976. Serological relationship between chronic bee paralysis virus and the virus causing hairless-black syndrome in the honeybee. Journal of Invertebrate Pathology 27: 403–405.
- Rogers, R. E. L., G. R. Williams.** 2007. Honey bee health in crisis: what is causing bee mortality? Amer. Bee J. 147: 441.
- Roussy, L.** 1962. Nouvelles contributions à l'étude du Pericystis apis G. az. Apic. 63: 101-105.
- Sammataro, D., U. Gerson, G. Needham.** 2000. Parasitic mites of honey bees: life, history, implications, and impact. Annu. Rev. Entomol. 45: 519-548.
- Sathe, T. V.** 2006. Fundamentals of beekeeping. 1st edition Daya Publishing House, India
- Shimanuki, H., D. A. Knox.** 1991. Diagnosis of honey bee diseases. USDA Agricultural Handbook No. AH-690, Washington, DC, USA
- Shimanuki, H., N. W. Calderone and D. A. Knox.** 1994. Parasitic mite syndrome: the symptoms. Amer. Bee J. 134: 827-828.

- Siede, R., R. Buchler.** 2003. Symptomatic Black Queen Cell Virus infection of drone brood in Hessian apiaries. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 116: 130-133.
- Singh, Y.** 1975. Nosema in Indian honeybee (*Apis cerana indica*). *Amer. Bee J.* 115: 59.
- Spivak, M., M. Gilliam.** 1998. Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and varroa. Part I Hygienic behaviour and resistance to American Foulbrood. *Bee world* 79: 124-134.
- Stoltz, D., X. R. Shen, C. Boggis, G. Sisson.** 1995. Molecular diagnosis of Kashmir bee virus infection. *J. Apic. Res.* 34: 153-160.
- Stroop, W. G. and J. R. Baringer.** 1982. Persistent, slow and latent viral infections. *Progress in Medical Entomology* 28: 1-43.
- Tentcheva, D., L. Gauthier, N. Zappulla, B. Dainat, F. Cousserans, M. E. Colin, M. Bergoin.** 2004. Prevalence and Seasonal Variations of Six Bee Viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* Mite Populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7185-7191.
- Topolska, G. B. Ball, M. Allen.** 1995. Identification of viruses in bees from two Warsaw apiaries. *Medycyna Weterynaryjna* 51(3): 145-147.
- Van Regenmortel, M. H., C. M. Fauquet, D. H. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Manuloff, M. A. Mayo, C. R. Pringle, R. B. Wickner.** Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego. Academic Press.
- Vincze, E.** 2000. Méhek, méhészet, környezet. *Méhészet* (december) 10-16.
- von der Ohe, W., and J. H. Dustmann.** 1997. Efficient prophylactic measures against American foulbrood by bacteriological analysis of honey for spore contamination. *Amer. Bee J.* 137: 603-606.

White, G. F. 1917. Sacbrood. U. S. Dep. Agric. Bull. 431:1-55. (Cit.: Grabensteiner, E., W. Ritter, M. J. Carter, S. Davison, H. Pechhacker, J. Kolodziejek, O. Boecking, I. Derakhshifar, R. Moosbeckhofer, E. Licek, N. Nowotny. 2001. Sacbrood virus of the honeybee (*Apis mellifera*): Rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription-PCR. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8(1): 93-104.)

11. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Rusvai Miklós témavezetőmnek mérhetetlen segítőkészségéért, tapasztalataért, és igen nagy türelméért, mellyel munkám segítette.

Köszönetemet szeretném továbbá kifejezni a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék jelenlegi és korábbi dolgozóinak: Dr. Bakonyi Tamásnak, Dr. Forgách Petrának, Dr. Hornyák Ákosnak, Dr. Kővágó Csabának és Kojnok Ádámnének a rengeteg segítségért, amit tőlük kaptam.

Egyúttal köszönetet szeretnék mondani Dr. Békési Lászlónak, Deákné Dr. Paulus Petrának és Dr. Tóth Idának.