

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

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

PhD értekezés tézisei

Tapaszti 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

.....

Tapaszti Zsuzsanna

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.

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.

Vizsgálataim célja 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. További cél 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 Magyarország 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. 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.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A Magyarországon előforduló vírusfertőzések monitoring vizsgálata

Vizsgálataink során 7 méhvírus (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) és az izraeli heveny méhbénulás vírus (IAPV)) jelenlétének kimutatására irányuló vizsgálatokat végeztünk két periódusban: 1999-2004 közötti időszakban 52, és a 2007-es év során gyűjtött 72 méhészet méhmintáinak segítségével. A mintákból homogenizálás után virális RNS-t vontunk ki QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Düsseldorf, Németország) segítségével. Az általunk vizsgált 7 méhvírus mindegyikére külön primerpárt használtunk. 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 (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) megtalálható teljes genomokból származtak. A 2007-es év során a CBPV kimutatásra egy olyan primer párt használtuk, melyet a génbankban található részleges CBPV szekvencia alapján terveztek. Az IAPV kimutatására két, a kutatócsoportunk által tervezett primer párt is használtunk. Az RT-PCR reakcióhoz a QIAgen OneStep RT-PCR Kitet (Qiagen, Düsseldorf, Németország) használtuk. 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 egyes reakciók, ill. termékek ellenőrzéséhez az alábbi kontrollokat használtuk. Negatív kontrollként RNS mentes reakcióelegy 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.

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

Elvégeztük BQCV genotípusok genetikai vizsgálatát, és filogenetikai összehasonlítását. A minták három európai országból származtak: Magyarországról, Lengyelországból és Ausztriából. A mintafeldolgozás, és a virális RNS kinyerése a fent leírtak alapján történt. Két oligonukleotid primerpárt terveztünk a génbankban elhelyezett teljes BQCV genom alapján (akcessziós szám: AF183905). Az egyik primer pár a szerkezeti fehérjéket kódoló génszakasz egy területére, a másik primer pár a nem szerkezeti fehérjéket (feltételezhetően a helikáz enzimet) kódoló génszakasz egy területére tapadt. További primerpárokat is terveztünk, hogy néhány kiválasztott genotípus csaknem teljes szekvenciáját meghatározzuk. Az RT-PCR-t és a termékek gél-elektroforézisét a fent leírtak alapján végeztük. A szekvenciameghatározás céljából sokszorosított PCR termékeket 0,8%-os Standard Low_{mr} Agarose Gélben (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) elektroforetizáltuk, 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. 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) programcsomag segítségével hajtottuk végre. A bootstrap értékeket 1000 léptékkal a SEQBOOT programmal állapítottuk meg, a távolsági mátrix analízist pedig a DNADIST/Neighbor-Joining és Fitch programok segítségével végeztük. A filogenetikai fákat 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.,) program segítségével szemléltettük a 2-paraméteres (Kimura) távolság modelljét használva. A BQCV amplikonok szekvenciáit elhelyeztük a nemzetközi génbankban, akcessziós számuk: EF517501 - EF517522.

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

A vizsgálat során 2006-ban és 2007-ben 38 méhmintát gyűjtöttünk különböző magyarországi méhészetekből. 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, Düsseldorf, Németország) segítségével izoláltuk. Oligonukleotid primerpárokat terveztünk a *Nosema* genomjának LSUrRNA 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 PCR reakciót követően, a termékek gél-elektroforézisét a fent leírtak lapján végeztük. A két *Nosema* faj elkülönítésére gyors, restriktív enzimmel történő emésztéses eljárást (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) alkalmaztunk. Az *MspI* restriktív endonukleáz a *N. ceranae* genomjáról készült amplicont elvágja a CACTAIGTATG szekvenciánál egy 175 és egy 262bp hosszú DNS szakaszra. A *N. apis* ampliconját nem vágja el mivel az adott DNS szakaszon a genom szekvenciája eltér (CACTAGTATA), így a keletkezett PCR termék megmarad eredeti hosszúságában. A PCR termékek szekvenciáját 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.

EREDMÉNYEK, MEGBESZÉLÉS

A Magyarországon előforduló vírusfertőzések monitoring vizsgálata

A felmérés során az 1999-2004 terjedő időszakban négy, Magyarországon előforduló méhvírus jelenlétét sikerült kimutatni, és elterjedtségüket feltérképezni. Ez a négy vírus az ABPV, BQCV, DWV, és az SBV. A vizsgálat kimutatta, hogy a magyarországi méhészetekben a legelterjedtebb vírus a DWV (a méhészetek 72%-ban jelen volt), a második a BQCV (méhészetek 54%-ban volt jelen), a harmadik az ABPV (37%-ban volt jelen), és igen kis arányban volt jelen az SBV, a vizsgált méhészetek 2%-ában (1. táblázat). A 2007-ben vizsgált 72 méhmintában a legnagyobb arányban az ABPV fordult elő, jelenléte 70,8%-os volt. A második az SBV volt 62%-al, a harmadik a DWV 48,6%-al, a negyedik a BQCV 40%-al. Ebben a vizsgálat sorozatban már ki tudtuk mutatni a CBPV-t is a családok 5,5%-ában. Ezeket az adatokat összehasonlítva a

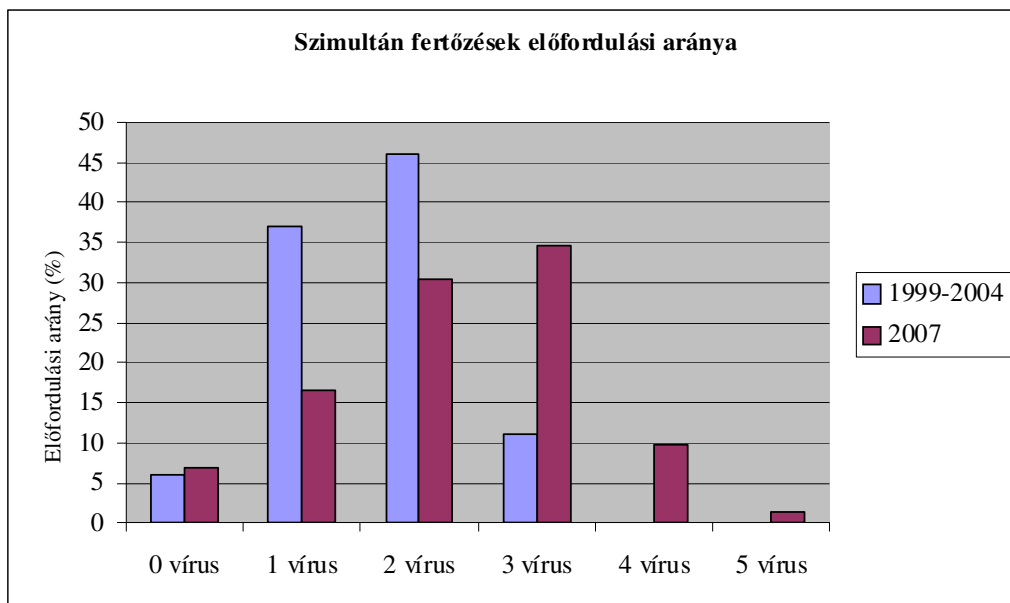
korábbi felmérés eredményeivel azt láthatjuk, hogy jelentősen megváltozott a legtöbb vírus előfordulási aránya. Az adatokat a 1. táblázat tartalmazza.

1. 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%

Vizsgáltuk azt is, hogy egy család egyszerre hány vírussal volt fertőzött. Az első felmérés során 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. 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. Az 1. ábra foglalja össze a szimultán vírusfertőzések arányának változását az 1999-2004 időszakhoz viszonyítva.

A vírusok elterjedtségében jelentős változásokat tapasztalhatunk az említett időszakban. Két vírus jelenléte jelentősen csökkent: a DWV és a BQCV kisebb arányban voltak jelen a 2007-es évben, mint a korábbi vizsgálatok során. Ugyanakkor két vírus jelenléte erősen emelkedett: az egyik az ABPV, melynek jelenléte majdnem a duplájára emelkedett (37%-ról 70,8%-ra), a másik pedig az SBV melynek 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. Az ABPV 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 vizsgálataink során nem lehetett hazai méhcsaládokban kimutatni.



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

Megemelkedett azoknak a családoknak az aránya, amelyek egyszerre több vírussal is fertőzöttek voltak (1. ábra). 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. 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 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. Kiseb volt a szimultán fertőzések aránya is. Lehetséges, hogy a vírusok megemelkedett jelenlétének háttérében az Európai Unió csatlakozás áll, és a későbbiek során Magyarországra is az Európai Unió értékek lesznek jellemzőek.

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

A vizsgálat során 5 ausztriai, 10 magyarországi és 7 lengyelországi mintán végeztünk PCR vizsgálatot a vírus két különböző genomterületén (a helikáz enzimet kódoló területen és a szerkezeti fehérjét kódoló területen). A hasonlósági arányokat a 2. és 3. táblázat tartalmazza.

2. 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			

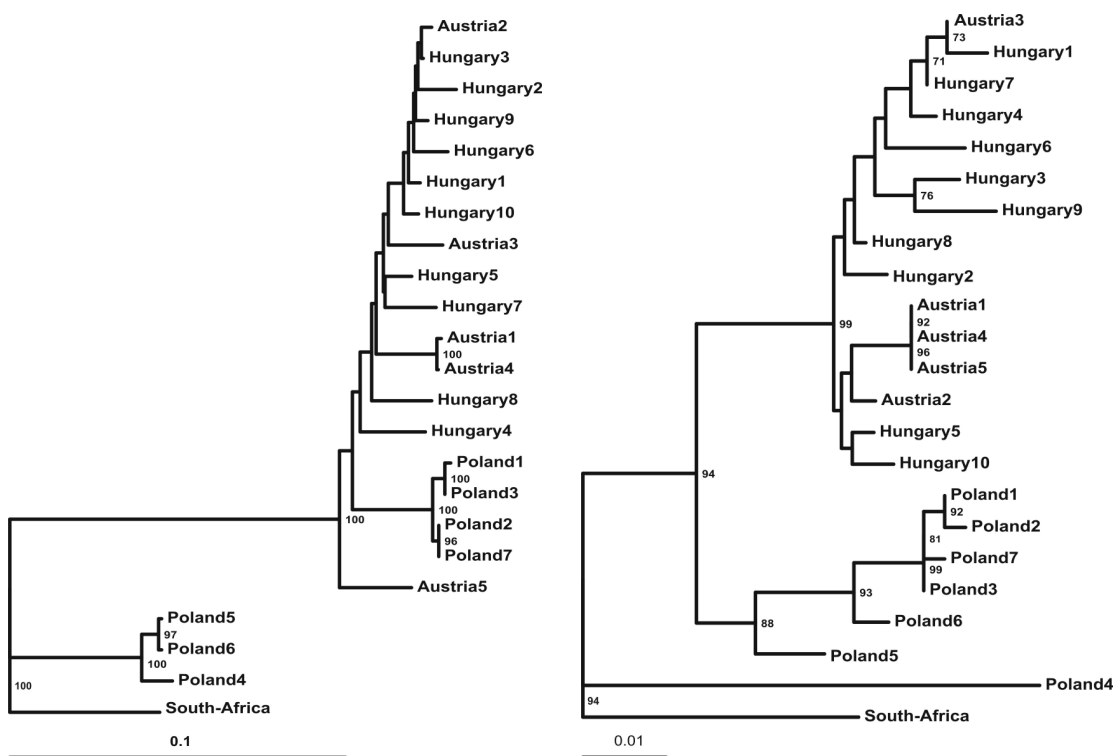
3. táblázat: A hasonlósági arányok (%) a vizsgált közép-európai genotípusok és a dél-afrikai referencia szekvencia között a szerkezeti fehérjét kódoló területen.

	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				

Filogenetikai vizsgálatot végeztünk a genom két különböző területeiről származó szekvenciák alapján. A törzsfa, mely a helikáz enzimet kódoló terület alapján készítettünk a 2. ábra a bal oldalán látható a törzsfa, mely a szerkezeti fehérjét kódoló terület szekvenciái alapján készült, a jobb oldalon helyezkedik el.

A törzsfa 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 (a Poland4, Poland5 és a Poland6).

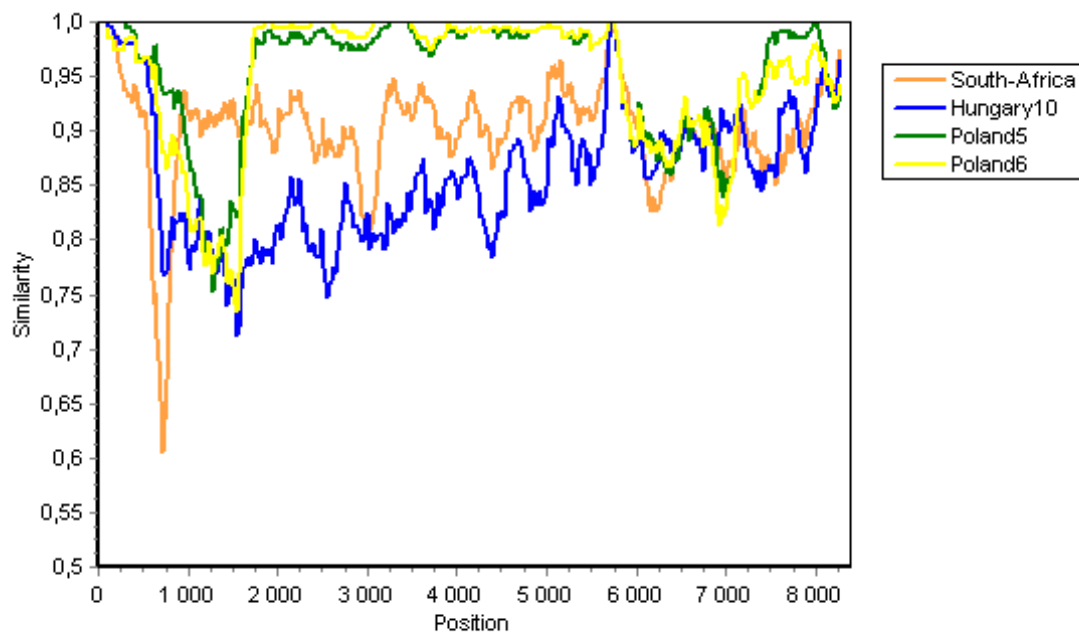
A szerkezeti fehérjét kódoló génszakasz alapján készített törzsfa kissé más képet mutat. A lengyelországi vírusok itt is elkülönült csoportot alkotnak az ausztriai-magyarországi csoporthoz képest, de az ausztriai és a magyarországi genotípusok sem keverednek olyan nagy mértékben egymással, mint a helikáz régió alapján készített filogenetikai fán. Továbbá ezen a törzsfán a Poland5 és a Poland6 jelzésű vírusok – melyek a másik törzsfán a Poland4-el különálló csoportot alkottak – a Poland4-től elkülönülve a többi lengyel vírussal alkotnak közös csoportot.



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

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.

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 szolgálhat arra, hogy a három lengyelországi vírus miért mutat különböző csoportosulást a genom két különböző területét (ORF1 illetve ORF2) vizsgálva. A feltételezés tisztázása érdekében a Poland4, Poland5 és Poland6 genotípusok szekvenciáit meghatároztuk csaknem a genom teljes hosszán átfedő primerpárokat használva. A szekvenált 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. A szekvenciákat összehasonlítottuk, és a hasonlósági arányokat a SimPlot program segítségével szemléltetjük a 3. ábrán.



3. ábra: BQCV genotípusok hasonlósági mintázata. A dél-afrikai referencia genotípus, a Poland5, Poland6 és Hungary10 a Poland4 genotípushoz viszonyítva.

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.

Úgy tűnik, hogy az ORF1 5' végéhez közel első harmada a vizsgált BQCV genomok legváltozékonyabb területe. Az ORF1 a nem szerkezeti fehérjéket kódolja, de ennek a területnek a pontos szerepe még nem tisztázott. A gerinceseket fertőző vírusoknál általában a nem szerkezeti fehérjéket kódoló génszakaszok a felelősek a különféle genotípusok pathogenitásában virulenciájában tapasztalható különbségekért. Az ORF1-et tekintve a vizsgált három lengyelországi genotípus inkább hasonlít a dél-afrikai genotípusra, mint a magyarországi vírusra az ORF1 3' véghez közeli területén.

Az ORF2 általánosságban kisebb változékonyságot mutatott, mint az ORF1. 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 *Nosema ceranae* első magyarországi kimutatása és előfordulási gyakoriságának vizsgálata

A *Nosema* egysejtű parazita által okozott betegség nagy károkat okozhat a méhcsaládokban. A fertőzés gyakran hasmenéssel jár, a család elnéptelenedéséhez és nagy számú egyedpusztuláshoz vezethet. Európában a *Nosema apis*-t tartották a *Nosema*-betegség kórokozójának. Magyarországon a betegség tünetei elsősorban télen és tavasszal jelentkeztek, nyáron és ősszel csak ritkán számoltak be a méhészek a *Nosema*-fertőzés jellemző tüneteiről. 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.

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.

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.

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 szekvenciaadatok alapján a három minta amely az emésztés során két DNS szakaszra vágódott 100% egyezést mutatott a génbankban található *Nosema ceranae* 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.

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy 2007-ben Magyarországon a *Nosema ceranae* elterjedtebb, mint a *Nosema apis*. Higes 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*. A betegség évszaktól független megjelenése arra enged 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. 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.

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 segítségéül szolgálhat.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Polimeráz láncreakcióra alapozott gyorsdiagnosztikai eljárásokat dolgoztunk ki a mézelő méh számos vírusfertőzésének 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 génszakaszo-kon, 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.

A TÉMÁVAL ÖSSZEFÜGGŐ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Forgách, Petra, Tamás Bakonyi, **Zsuzsanna Tapaszti**, Norbert Nowotny, Miklós Rusvai. (2007) Prevalence of pathogenic bee viruses in Hungarian apiaries: Situation before joining the European Union. J. Invertebr. Pathol. 98 (2): 235-238. **IF: 2,005**

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. **IF: 0,624**

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. **IF: 2,370**

Tapaszti Zsuzsanna, Forgách Petra, Bakonyi Tamás, Rusvai Miklós. (2010) A mézelő méh (*Apis mellifera* L.) vírushordozásának előfordulása a magyarországi méhészetekben. Magyar Állatorvosok Lapja 132: 119-125. **IF: 0.088**

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 beszámoló, 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 Tapaszi**, 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 Tapaszi, 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 Tapaszi**, 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

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

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

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 Ádámnénak a rengeteg segítségért, amit tőlük kaptam.

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