

Állatorvostudományi Egyetem  
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

**A mézelő méhek spiroplasma fertőzésének  
felmérő vizsgálata Magyarországon**

Készítette: Vass István Dániel

Témavezető: Dr. Forgách Petra  
egyetemi docens

Budapest

2020.

## TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
2. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS .....	4
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	6
4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	11
5. EREDMÉNYEK .....	18
6. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE, KÖVETKEZTETÉSEK .....	21
7. ÖSSZEFOGLALÁS .....	24
8. ANGOL CÍM ÉS RÖVID ÖSSZEFOGLALÁS .....	25
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	26
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	29

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

bp	bázispár
DNS	dezoxiribonukleinsav
TSE	transmissible spongiform encephalopathies = fertőző szivacsos agyvelőbántalmak
EDTA	ethylen-diamin tetra-acetate = etiléndiamin tetraacetát
kbp	kilobázispár
OMME	Országos Magyar Méhészeti Egyesület
NÉBIH ÁDI	Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság
PBS	phosphate buffered saline = foszfáttal pufferolt fiziológiás sóoldat
PCR	polymerase chain reaction = polimeráz láncreakció
SMCA	suckling mouse cataract agent
SRO	sex ratio organism

## 2. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉS

Szakedolgozatom témája a mézelő méhet (*Apis mellifera* L.) megbetegítő *Spiroplasma melliferum* és *Spiroplasma apis* hazai előfordulásának vizsgálata. Előbbit az USA-ban mutatták ki először (Clark, 1977.) utóbbit Franciaországban (Mouches és mtsai. 1984), közös bennük, hogy amennyiben fertőzést okoznak egy méhcsaládban, akkor tavasz környékén, a kaptár bejáratában összegyűlő, röpképtelen, lassú mozgású, illetve elhullott méhekben fordulnak elő legtöbbször.

Hazánkban a méhészek évről évre tapasztalnak tavasz végén, nyár elején „mászkalást”, amit legtöbbször az egyik legfontosabb nektártermelő növény, a repce virágzásával, illetve a repce permetezésével hoznak összefüggésbe, és enyhe, pusztulást nem okozó növényvédőszer-mérgezésre gyanakodnak. Ugyanakkor számos esetben nem történt permetezés a röpkörzetben, ezért munkahipotézisként felmerült az, hogy esetleg nem mérgezés, hanem valamilyen más ok, esetleg fertőző jellegű megbetegedés van a röpképtelenség és a kismértékű pusztulás hátterében. Más országok felmérő vizsgálatai is azt mutatták, hogy előfordul ilyen jelenség, és a prevalencia tavasszal, május környékén tetőzik. Több esetben igazolták valamelyik spiroplasma faj (vagy mindkettő) jelenlétét az ilyen röpképtelen méhekben. A spiroplasma fertőzés angol elnevezése is ebből a szezonális előfordulásból ered: májusi betegség (May disease).

Magyarországon korábban igazolták ugyan a méhek spiroplasmosisának előfordulását, de a vizsgálati módszer (vérvétel mászkáló méhekből, és a haemolympha fáziskontraszt mikroszkóppal történő ellenőrzése a baktériumok jelenlétének kimutatására) meglehetősen munka- és időigényes volt, ezért tömeges vizsgálat elvégzésére nem volt alkalmas, így eddig még nem történt felmérés nagyobb számú mintán a betegség hazai előfordulásával kapcsolatban.

Ezért célul tűztük ki polimeráz láncreakcióra (polymerase chain reaction, PCR) alapozott molekuláris biológiai módszer kidolgozását, hogy ezzel a viszonylag gyors és a korábbi módszernél kevésbé munkaigényes módszerrel nagyszámú mintán próbáljuk megállapítani a fertőzés előfordulását azokban az esetekben, amikor a méhész tömeges röpképtelenségre panaszkodott. A vizsgálatokat egész évben végeztük ilyen jellegű probléma jelentkezése esetén, hogy a szezonaritást illetően is adatokat kapjunk. A vizsgálat az Országos Magyar Méhészeti

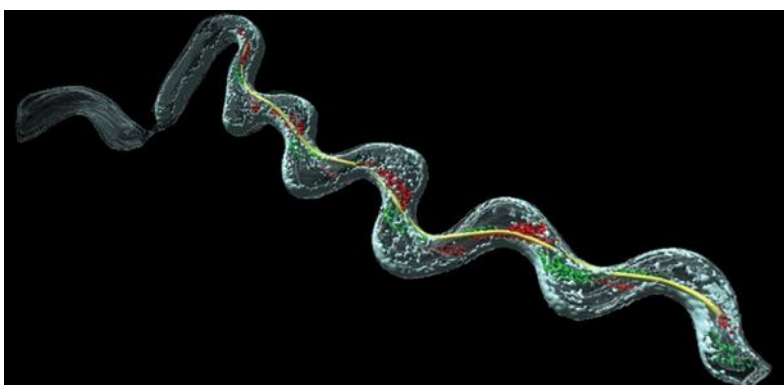
Egyesület (OMME) szervezésében a megyei méhegészségügyi szaktanácsadók által a Nébih ÁDI Méh-és Halegészségügyi Laboratóriumába beküldött minták felhasználásával történt, miután ott a Varroa atka és nosema fertőzés vizsgálata a mintákon megtörtént.

A felmérés mostani, első fázisában csak korlátozott számú minta vizsgálatát tűztük ki célul, és elsődleges célunk az volt, hogy a korábban még nem használt PCR vizsgálatot optimalizáljuk, és bevezessük a mézelő méhek fertőző betegségeinek (vírusfertőzések, nyúlós költésrothadás, nosemosis stb.) kimutatására korábban kidolgozott rutinszerű laboratóriumi diagnosztikai vizsgálatok közé, melyeket rendszeresen végeznek az Állatorvostudományi Egyetem Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékének virológiai laboratóriumában.

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### A spiroplasmákról általánosságban

A spiroplasma fajok a *Mollicutes* osztályba tartozó mikroorganizmusok. Közelebbi rokonságban állnak a mycobacteriumokkal. Eddigi vizsgálatok alapján Amerikától Kínáig előforduló növény- és rovarpatogének, de emlősökben betegséget okozó fajok is vannak köztük. Burkuk nincs, alakjuk spirális (melyről elnevezésüket kapták), hosszúkás, 0,2-10  $\mu\text{m}$  nagyságúak, nincs merev sejtfaluk. Gram szerint nem festődnek, csillóval, flagellummal nem rendelkeznek (1. ábra). Dugóhúzó szerű mozgást végezve képesek hossz tengelyük mentén mozogni. Genomjuk hozzávetőlegesen 1400 kbp méretű. Tenyésztésük nehézkes, speciális táptalajokon is heteket vesz igénybe (Liao és Chen, 1982).



1. ábra: A képen jól látható a spiroplasmák jellegzetes morfológiája

#### Spiroplasmák a növényvilágban

A spiroplasmák fő rezervoár fajai a virágokat gyakran látogató rovarok, és maguk a virágok. A baktériumok a rovarok bélcsövében és vérnyirkában szabadon illetve intracellulárisan is megtalálhatóak, a rovarok feltehetően bélsarukkal terjesztik a kórokozót.

A spiroplasmák felfedezése Davis és Worley nevéhez köthető, akik a kukorica satnyaságnak (corn stunt disease) nevezett betegséggel kapcsolatos kutatásaik során felfedeztek egy addig ismeretlen mikroorganizmust (Davis és Worley, 1972), amit csak jóval később írtak le *Spiroplasma kunkelii* néven (Whitcomb és mtsai, 1986). Az elsőként leírt spiroplasma fajt

(*Spiroplasma citri*) ugyanis a citrom terméketlensége (citrus subborn) néven ismert betegségből mutatták ki és 1973-ban írták le (Saglio és mtsai, 1973).

### **Spiroplasmák az állatvilágban**

Clark 1964-es vizsgálataiban során - mely rickettsiák kimutatására irányult - kullancsokban felfedezett egy szűrhető, embrionált tyúktojásban szaporítható, ismeretlen kórokozót, mellyel szopós egereket fertőzve azokban szürkehályogot idézett elő, így SMCA-nak nevezte el (*Suckling Mouse Cataract Agent*), bár az idegrendszeri tünetek, satnyaság is a betegség jellemzője volt. Felnőtt egereket fertőzve, azok szinte kivétel nélkül tünetmentesen átvészelték a fertőzést. Clark ekkor még azt hitte, hogy egy vírussal van dolga, és csak jóval később, a 1980-es évek elején tudtak meg eleget a kórokozóról, melyet így már be tudtak sorolni a spiroplasmák közé és *Spiroplasma mirum*-nak nevezték el (Tully és mtsai, 1982). Későbbi kutatások párhuzamot véltek felfedezni a *S. mirum* fertőzöttség és a fertőző szivacsos agyvelőbántalom kialakulása között szarvasokban, juhokban és kecskében (Bastian és mtsai, 2007).

Más vizsgálatok az ecetmuslicák (*Drosophila nebulosa*, *D. willistoni*, *D. melanogaster*) ivararányát (SR, sex ratio) befolyásoló mikroorganizmust detektáltak, azonban nem tudták taxonómiailag besorolni, így csak „sex-ratio organism” (SRO)-nak nevezték el (Poulson és Sakaguchi, 1961). Később számos kutatás foglalkozott ezekkel a mikroorganizmusokkal és kiderítették, hogy spiroplasmák okozzák az ivararány-eltolódást oly módon, hogy a hím egyedeket elpusztítják (Tsushima és mtsai., 2015). Mindmáig számos növényből, vérszívó kétszárnyúból (szúnyogból, bögölyből), kullancsból is írtak le spiroplasma fajokat (Ballinger és mtsai., 2018, Jaenike és mtsai., 2010, Koch és Schmid-Hempel, 2011).

### **A mézelő méhek spiroplasmáiról**

A spiroplasmosis egy máig kevésbé feltérképezett betegség. Davis és Worley ugyanis véletlenszerű felfedezése kapcsán csak morfológiáját írták le, és azóta is csak kis számú kutatás foglalkozott a spiroplasmák okozta betegségekkel. A mézlő méhekben fertőzést okozó spiroplasma fajoknak (*S. apis*, *S. melliferum*), mint potenciális méh-patogéneknek a fontossága az ezredforduló után kezdett felértékelődni, ahogy a megporzó rovarok mennyisége, főleg a

mézelő méhek populációjának drasztikus csökkenése felvetette egy globális katasztrófa esélyét (Kluser és Peduzzi, 2007).



Kezdetben a mycoplasmák tenyésztéséhez használt táptalajokon tenyésztették a spiroplasmákat, de ez több szempontból is nehézkes volt. A betegségre gyanús méhekből először üvegkapillárisal vérnyirkot kellett kinyerni (2. ábra), majd ezt speciális táptalajba oltani. A telepek lassú növekedése miatt ez a módszer nem volt elég hatékony a diagnosztikában. Hasonló mintavételi eljárással direkt mikroszkópos vizsgálatot is használhatunk az azonosításra; az élő spiroplasmák a méhekből vett haemolymphában jellegzetes alakjukról és mozgásukról könnyen felismerhetők, viszont ehhez a vizsgálathoz speciális fáziskontraszt vagy sötétlátóteres mikroszkóp szükséges. Ugyanakkor a spiroplasmák fajai között nem tudunk ilyen módszerrel különbséget tenni, ehhez speciális immunsavók és agglutinációs próba szükséges.



2. ábra: Haemolympha gyűjtése mézelő méh dolgozóból

A PCR technológia alkalmazásával lehetőség nyílt pontos fajmeghatározásra specifikus primerek segítségével, megkönnyítve a spiroplasma fajok identifikációját még erősen szennyezett mintákban is (Yokomi és mtsai., 2008, Meeus és mtsai. 2012). A két fő méhpatogén spiroplasma fajt vizsgálva feltérképezték a méhek immunválaszát a fertőződés után, illetve megvizsgálták az elhullásuk után a testükben végbement változásokat. Ezek alapján egyértelművé vált, hogy olyan méhbetegségről van szó, amely veszélyt jelenthet bármely kolóniára (Yang, 2017).

## **Spiroplasma vizsgálatok Magyarországon**

A hazai spiroplasmákkal kapcsolatos vizsgálatok dr. Csaba György nevéhez fűződnek, aki hozzávetőlegesen 1993 óta folytatott vizsgálatokat a betegség kimutatásával kapcsolatban. Az ő vizsgálatai során is körvonalazódtak a házi méh spiroplasmosisának jellemző vonásai. Ezek a főleg tavasz végi és nyár eleji megbetegedések, legjellemzőbben május környékén, a repcevirágzással párhuzamosan, illetve a beteg méhekre jellemző tünetek, melyek közül a leggyakrabban említettek, hogy a méhek a kaptár bejáratának a közelében „mászálnak”, remegnek, csomókba gyűlnek, a kaptár közelében tömegesen elhullanak. Ezeket a vizsgálatokat a fentebb leírt vérnyirokvétellel, majd annak mikroszkópos vizsgálatával végezték el, illetve mycoplasmák tenyésztésére szolgáló táplevesbe oltva tenyésztették is. Vizsgálataik kapcsán gyakran találtak spiroplasmákat a levett mintákban. (Csaba, 2008)

## 4. ANYAG ÉS MÓDSZER

### Méhminták

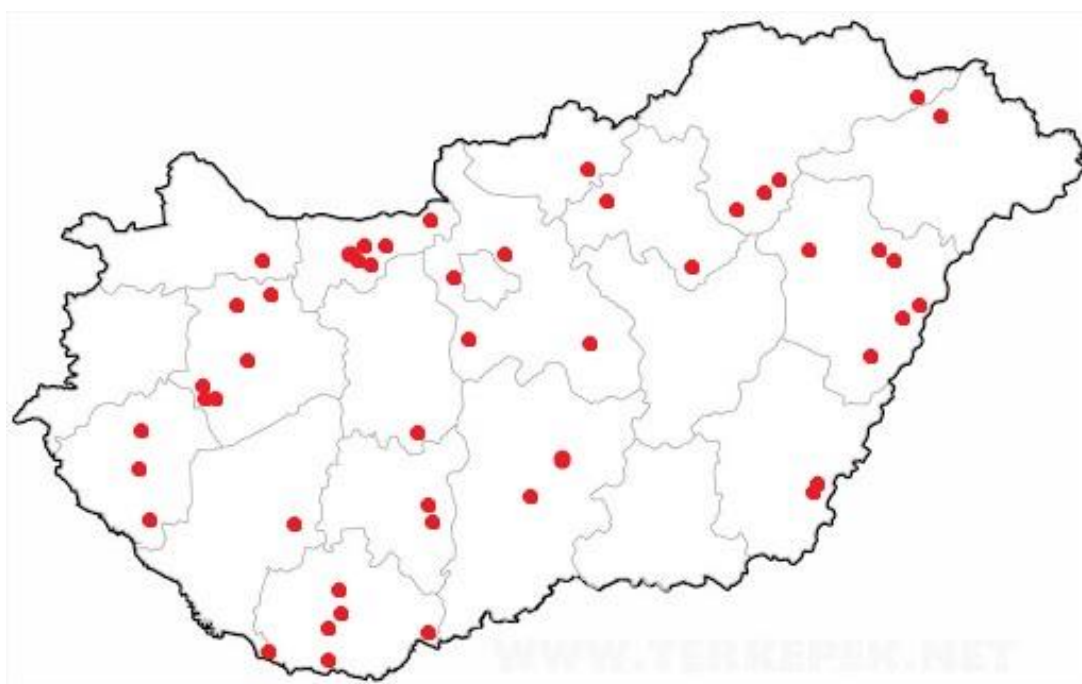
A minták az OMME szervezésében a Nébih ÁDI Méh-és Halegészségügyi Laboratóriumából vagy közvetlenül a méhészekről jutottak el hozzánk. A gyűjtés másfél év alatt (2019. májusától 2020. szeptemberéig) történt. A méhminták beérkezésének időbeli eloszlását az Állatorvostudományi Egyetem Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékének virológiai laboratóriumába az év hónapjai szerint az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat: A vizsgálat másfél éve alatt beérkező minták száma havonkénti bontásban:

	2019	2020	Összesen
Január			0
Február		28	28
Március			0
Április		8	8
Május	6	11	17
Június	11	4	15
Július	8	12	20
Augusztus	0	2	2
Szeptember	7	19	26
Október	20		20
November	11		11
December	2		2
<b>Összesen</b>	<b>65</b>	<b>84</b>	<b>149</b>

Minták Magyarország egész területéről, 3 híján minden megyéből érkeztek. Összesen 52 méhészetből 149 mintát kaptunk, a mintaküldő méhészetek földrajzi helyeződését a 3. ábra mutatja.

A mintagyűjtést a méhész végezte a kaptárak előtt mászkáló méhekből. Méhcsaládonként 60-100 db agonizáló, frissen elpusztult vagy csak enyhe tüneteket (mozgási rendellenességet) mutató kifejlett méhet küldtek vizsgálatra. A mintákat papírborítékba csomagolva, postai úton vagy (a Nébih ÁDI Méh-és Halegészségügyi Laboratóriumából érkező minták esetében) küldönc segítségével jutatták el hozzánk (4. ábra).



3. ábra: A mintát küldő méhészetek földrajzi elhelyezkedése Magyarország vaktérképén.



4. ábra: A laboratóriumi vizsgálatra érkező méhminták

## Mintafeldolgozás

Laboratóriumba érkezésük után a mintákat feldolgozásukig, illetve a minták előkészítését követően a homogenizátumokat is  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a nukleinsav tisztításig. A mintaelőkészítés során steril kvarchomok segítségével steril dörzsmozsárban 50 db a beérkezett mintából véletlenszerűen kiválasztott, kifejtett méhet homogenizáltuk és 10 ml PBS-ben (phosphate buffered saline, foszfátsókkal pufferolt fiziológias konyhasó-oldat) szuszpendáltuk. A homogenizátumokat 10 percig  $1500\times g$  gyorsulással centrifugáltuk, így a durvább szövettörmelékek leülepedtek, majd a felülúszót  $12.000\times g$  gyorsulással ismételtelen centrifugáltuk 15 percig, amivel a kis méretű szennyező anyagoktól (baktériumok, apróbb szövettörmelékek) is megtisztult a minta. A centrifugátum víztiszta felülúszóját használtuk nukleinsav tisztításra. A minták egyedi számozást kaptak, melyeket a mintatároló csöveken feltüntettünk.

### **Nukleinsavtisztítás**

A mintafeldolgozás végén képződött víztiszta felülúszóból  $140\ \mu\text{l}$ -t  $560\ \mu\text{l}$  lízis pufferbe mértünk (20mg/ml lysosime, 20mM Tris-HCl [pH 8], 2mM EDTA, 1,2% Triton), majd minimum 10 percig szobahőn inkubáltuk.

Ezután  $560\ \mu\text{l}$  etanolt adtunk a mintához, amit vortex segítségével összekevertünk. A következő lépésben filteres csőbe mértünk  $630\ \mu\text{l}$ -nyi keveréket, amit  $6000\times g$  gyorsulással 1 percig centrifugáltunk. Az filteres csövet megtartva, az alsó csövet cserélve ezt megismételtük újból  $630\ \mu\text{l}$ -nyi minta bemérésével.

Amikor ezzel készen voltunk a filteres csövet új gyűjtőcsőbe helyeztük és ráértünk  $500\ \mu\text{l}$  AW1 mósópuffert, majd ezt is  $6000\times g$  gyorsulással centrifugáltuk 1 percig. Ugyanezt a lépést megismételtük, ezúttal AW2 mósópuffert mérve a filteres csőbe, de ezt már  $20.000\times g$  gyorsulással centrifugálva 3 percen át. Végül a gyűjtőcsövet eldobva a minta számával ellátott eppendorf csőbe helyeztük a filteres csövet és  $60\ \mu\text{l}$  AVE eluáló puffert mértünk közvetlenül a filterre és újból  $6000\times g$  gyorsulással centrifugáltuk. Így az eljárás végére  $60\ \mu\text{l}$ -nyi tisztított nukleinsavat tartalmazó oldatot kaptunk, melyet felhasználásig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltunk.

A tisztított DNS-t QIAamp viral DNA Mini kit (Qiagen, Németország) segítségével izoláltuk, követve a gyártó utasításait.

## Polimeráz láncreakció (PCR)

A PCR vizsgálatokat az Állatorvostudományi Egyetem Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékének virológiai laboratóriumában végeztük.

### Felhasznált primerek

Az általunk vizsgált 2 spiropasma faj kimutatására ugyanazt az univerzális spiroplasma primerpárt használtuk, amely mindkét faj (*S. apis*, *S. melliferum*) 16S rDNS-ének egy 976 bp hosszúságú szakaszát amplifikálja. A szükséges primereket a Sigma-Aldrich-től (Merck cégcsoport) szereztük be. A felhasznált primerek nukleotidsorrendjét és egyéb jellemzőit a 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat: Az amplifikációra felhasznált primerek jellemzői

Primer neve	Primer szekvencia (5'-3')	Tapadási hely	A termék hossza (bp)
BS1-976forward	5'-AAGTCGAACGGGGTGCTT-3'	16S rDNS	976
BS1-976reverse	5'-TGCACCACCTGTCTCAATGT-3'		

### Nukleinsav amplifikáció

A vizsgálatot egy lépéses amplifikációs módszerrel végeztük, melynek előnye a szennyeződés veszélyének minimálisra csökkentése, illetve a gyorsabb kivitelezhetőség.

A PCR-hoz felhasznált reakciókeverék 5 µl 10×reakció puffert, 5 µl dezoxinukleozid trifoszfát mixet (dNTP), 0,3 µl polimeráz enzimet (Taq DNS polimerázt), 3 µl MgCl<sub>2</sub>-t (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 50 pmol genomikus és komplementer primert, 2 µl templát DNS-t és a reakcióelegyet 50 µl-re kiegészítő mennyiségű desztillált vizet tartalmazott. Az amplifikációt MJ Research Mini Cycler készülékben végeztük (MJ Research Inc., Watertown, Massachusetts, USA) (5. ábra).



5. ábra: Az amplifikációra használt Mini Cycler készülék feltöltése mintákkal.

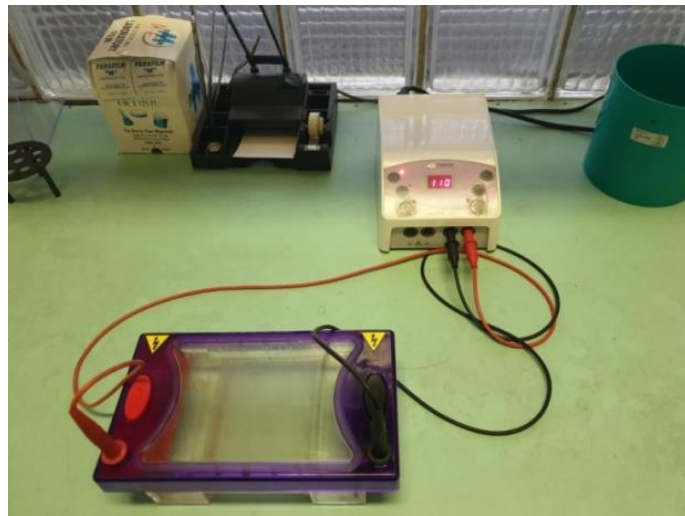
Az amplifikációs program lépései a következők voltak:

- - A polimeráz ciklusok előtt hosszabb ideig, 5 percig (min) 95°C-ra hevítik a reakcióelegyet, ezáltal a templát DNS és a primerek kettős szálai is szeparálódnak a hidrogénhidak felbomlása révén.
- - Ezután 45 ciklusban ismétlődnek a következő szakaszok:
  - - A hőmérsékletet 57°C-ra csökkentve a primerek képesek kapcsolódni a templát szálakhoz. Ez az úgynevezett *annealing*, mely 40 másodpercig (s) tart.
  - - Ezután a DNS polimeráz enzim létrehozza az új DNS szálakat 72°C-on 1 perc (min) alatt (láncépítés, *extension*).
  - - Végül 95°C-on 40s alatt a képződött nukleinsav szálak denaturálódnak, elválnak egymástól (*denaturation*).
  - - A folyamatot egy 7 percig tartó 72°C-os folyamat zárja, mely során a láncszintézis lezárul.
  - - További felhasználásig a készülék 4°C-on tárolja a termékeket.

### A PCR termékek azonosítása

Az azonosítás gél-elektroforézissel történt. Az RT-PCR reakciót követően, a terméket 2%-os Tris-acetát-EDTA agaróz gélben 0,5 µg/ml ethidium-bromid jelenlétében elektroforetizáltuk OmniPur horizontális gélelektroforézis készülékben (Darmstadt, Németország) futtattuk (6.

ábra), az alábbiak szerint: 5  $\mu$ l terméket 1  $\mu$ l 6 $\times$ Loading Buffer-rel (Fermentas, Vilnius, Livánia) elkevertünk és a gél zsebébe mértünk, majd 8 V/gélcm feszültség mellett 40 percig futtattuk. Science ID szoftvert használva. A termékek méretét 100 bp DNS létra segítségével határozzuk meg (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Fermentas, Vilnius, Litvánia). Az egyes reakciók, ill. termékek ellenőrzéséhez az alábbi kontrollokat használtuk. Negatív kontrollként DNS mentes reakcióelegy szolgált. A pozitív kontrollt a korábbi kísérletekben pozitívnak minősített mintából származó DNS képezte.



6. ábra: Az elektroforézisre használt horizontális gélelektroforézis készülék.

A termékeket ultraibolya (UV) fényben 312 nm-en tettük láthatóvá és pozíciójukat Kodak DS Electrophoresis Documentation and Analysis System készülék segítségével lefényképeztük (7. ábra).



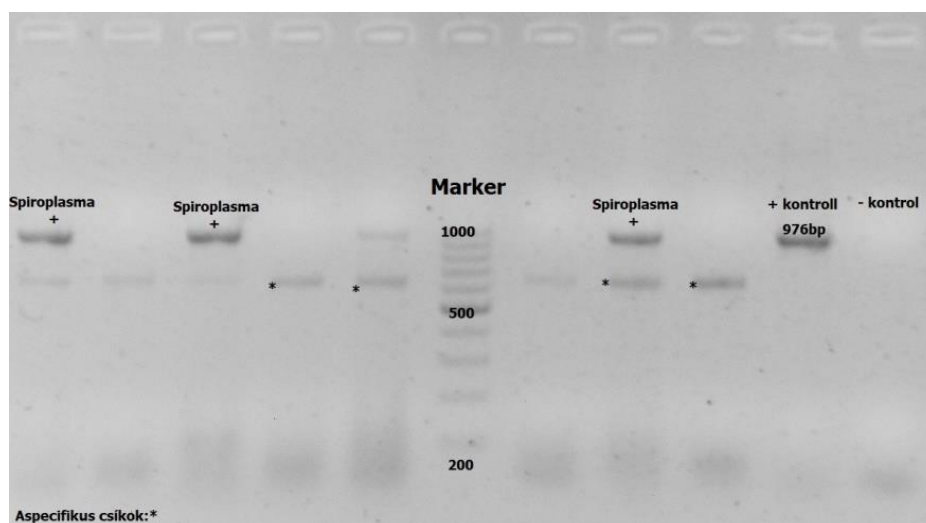


7. ábra: A géldokumentáció elkészítésére használt Kodak Digital készülék.

## 5. EREDMÉNYEK

### Az elektroforézis során kapott spiroplasma specifikus termékek

Az izolált bakteriális DNS-eknek megfelelő primerekkel végzett PCR termékei (amplikonok) a spiroplasma genom alapján számítható amplikonnak megfelelően 976 bp méretű terméket adtak. A végzett vizsgálatok közül egy gélelektroforézis után készült, pozitív és negatív eredményt adó mintákat egyaránt tartalmazó gél képét a 8. ábra mutatja be.

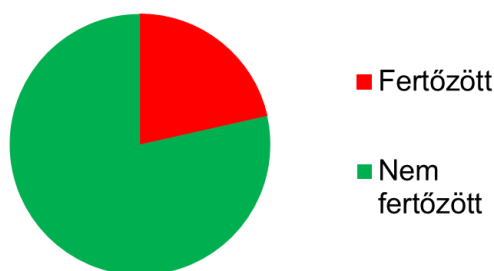


8. ábra: Gélelektroforézis során kapott spiroplasma specifikus termékek (+). A vizsgált minták többsége adott egy kb. 650 bp méretű aspecifikus terméket is (\*). Ennek esetleges eredetére a „Megbeszélés” fejezetben térek ki.

### A fertőzöttség a vizsgált minták százalékában

A vizsgált 149 mintából 32 volt fertőzött (21,5%), míg 117 mintában nem mutattunk ki spiroplasma nukleinsavat (9. ábra).

### Fertőzöttségi arány



9. ábra: A spiroplasma pozitív minták aránya az összes mintán belül

### Az igazolt spiroplasmosis esetek időbeli eloszlása

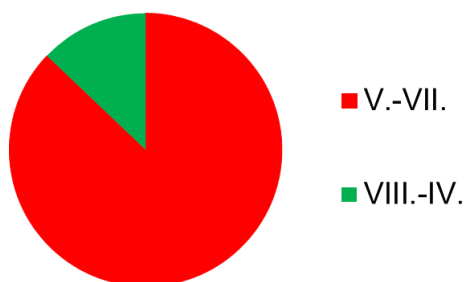
A vizsgálat másfél éve során talált pozitív minták megoszlását havi bontásban a 2. táblázat mutatja be.

2. táblázat: Az igazolt spiroplasmosis esetek időbeli eloszlása

	Összes minta (2019-2020)	Pozitív	Negatív
Január	0		
Február	28	1	27
Március	0		
Április	8		8
Május	17	5+6	1+5
Június	15	4+3	7+1
Július	20	2+7	4+5
Augusztus	2		2
Szeptember	26	2+1	5+18
Október	20		20
November	11	1	10
December	2		2
<b>Összesen</b>	<b>149</b>	<b>32</b>	<b>115</b>

Mint az a fenti adatsorból látszik, a pozitív minták zöme, 32 pozitív mintából 27 (84,4%) három hónap (május-június-július) alatt gyűlt össze (11. ábra).

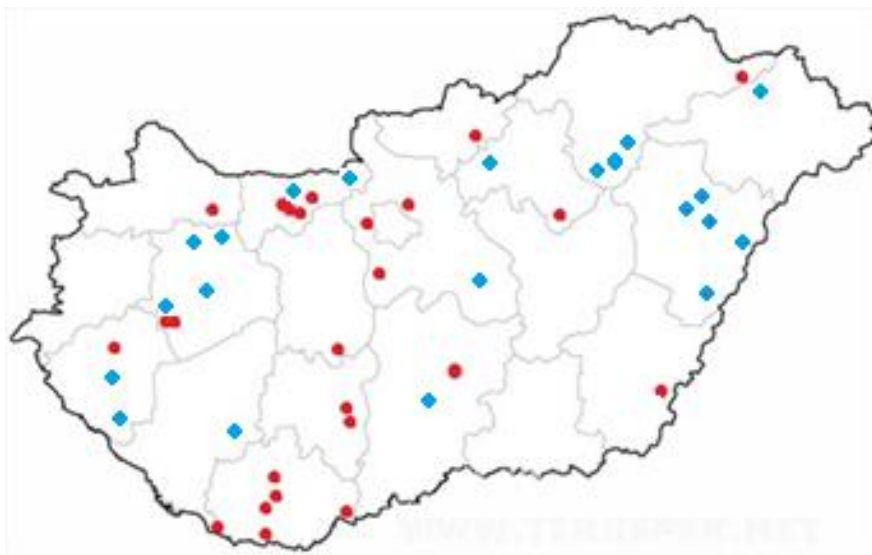
### Fertőzöttség havi bontásban



11. ábra: Az ábrán jól látható, hogy a pozitív minták zöme (84,4%-a) három hónapra (május, június, július) koncentrálódik.

### Az igazolt spiroplasmosis esetek földrajzi eloszlása

A pozitív mintákat küldő méhészetek többé-kevésbé egyenletesen oszlottak meg Magyarország területén, bár a déli-délnyugati régiókon jellemzőbb volt, mint az északkeleti területeken. (10. ábra)



10. ábra: A vaktérképen piros pontok jelölik azokat a méhészeteket, ahol a vizsgálat másfél éve alatt legalább egy mintából kimutattunk spiroplasma fertőzöttséget; a kék pontok a negatív méhészetek földrajzi helyeződését mutatják.

## 6. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE, KÖVETKEZTETÉSEK

A beküldött minták PCR eredményei alapján kimondható, hogy a magyar méhcsaládokban széleskörűen előfordul a spiroplasmosis. Mivel a vizsgált mintaszám még meglehetősen alacsony, messzemenő statisztikai következtetéseket nem lehet levonni, és feltételezhető, hogy a kapott eredmény nem tükrözi a valós képet. A jövőben több mintát kell vizsgálni ahhoz, hogy teljesebb képet kapjunk a spiroplasmosis előfordulásáról, elterjedtségéről és méhegészségügyi jelentőségéről.

Az általunk használt PCR eljárás alkalmasnak bizonyult arra, hogy nagyobb számú mintát viszonylag rövid idő alatt és kevés munkaerő-ráfordítással vizsgálatnak vessünk alá. Bár a vizsgált méhminták amplifikációja során mindig képződött egy a specifikus (976 bp hosszúságú) terméknel lényegesen rövidebb aspecifikus termék is (mérete kb. 650 bp), ez minden esetben lényegesen halványabb volt a specifikus terméknel. Elkülönítését az is megkönnyítette, hogy a pozitív kontroll minden esetben csak a specifikus termék méretének megfelelő csíkot adta. Az aspecifikus csík nagy valószínűséggel azért alakul ki, mert az általunk alkalmazott primerpár a spiroplasmáknál jóval kisebb mértékben ugyan, de a mézelő méh genomjának valamelyik régióját is felerősíti.

Ezt az is bizonyítja, hogy minden méhmintában jelen volt, vagyis a spiroplasma-specifikus csíkot nem adó, spiroplasma negatív méhek homogenizátumából is kimutatható volt. Mivel a PCR vizsgálatok során alkalmazott pozitív kontroll baktériumtenyészetből származott, így méh-genomelemeket nem tartalmazott, nem is adhatta ezt az aspecifikus reakciót. Egyértelműen csak az aspecifikus termék nukleotidsorrendjének meghatározása segítené eldönteni ezt a kérdést, de egy esetben sem kaptunk olyan erős aspecifikus csíkot, hogy ezt a viszonylag nagyobb mennyiségű DNSt igénylő vizsgálatot elvégeztethetjük volna.

A mintát küldő méhészetek földrajzi helyeződése változatos, az ország területén szétszórva található, ezért a vizsgálat a spiroplasmosis hazai elterjedtségét illetően nagyjából reprezentatívnak tekinthető, annak ellenére, hogy három megyéből (Jász-Nagykun-Szolnok, Csongrád és Vas megye) nem kaptunk vizsgálatra méhmintákat. A vizsgálatok egyértelműen bizonyítják, hogy a spiroplasmosis esetleges jelenlétével bármelyik méhészetben számolni lehet Magyarországon.

A mintavételezés időpontja viszont meghatározó volt a pozitív minták esetében. A mintagyűjtési időszakban (2019.05-2020.09.) voltak hónapok, melyek kétszer szerepeltek (május, június, július, augusztus, szeptember), míg a maradék hónapok csak egyszer. Az azonban látszik, hogy a tavaszi-nyári időszakban nagyobb arányban voltak pozitív minták, mint a többi évszakban. Ez összhangban van külföldi tanulmányokkal (Schwarz és mtsai 2014), melyek szerint tavasz végén, nyár elején dúsul fel a kórokozó leginkább a virágokon és a méhekben, majd a nyár befejeztével a prevalencia meredeken zuhan. Ugyanakkor a csúcsidőszakon (május-június) kívül is kimutattunk pozitivitást, ami azt bizonyítja, hogy a baktériumfertőzés a méhállományokban a csúcsidőszakon kívül (ősszel és télen) is fennmarad, és a következő év tavaszán újra a klinikai tünetek halmozódásához vezethet.

A vizsgálataink alapjául szolgáló méhminták egy jelentős része a Nébih ÁDI Méh-és Halegészségügyi Laboratóriumából, az ott lezajlott varroa- és nosema-vizsgálatok után, két-háromhetes késéssel került át hozzánk vizsgálatra. Mivel mi a mintákat a laboratóriumunkba érkezés dátuma szerint tartjuk nyilván, azok zömének gyűjtése vélhetőleg korábbi időpontra tehető, ezért a spiroplasmosis „csúcsidőszaka” vélhetőleg május-június, noha mi a laboratóriumunkba júliusban érkező minták között is nagyarányú pozitivitást észleltünk. Ezeket a mintákat a méhészek vélhetőleg május végén, június elején gyűjtötték és küldték vizsgálatra a Nébih ÁDI Méh-és Halegészségügyi Laboratóriumába.

Tesztrendszerünkkel a méhekben előforduló két fajt (*Spiroplasma apis* és *Spiroplasma melliferum*) egyaránt ki tudtuk mutatni, de ezek elkülönítése az általunk használt módszerrel nem lehetséges. Amennyiben erre a későbbiekben igény merül fel, akkor a fajszerű azonosítás is megoldható. A spiroplasmosis tünetei ugyanakkor mindkét faj esetében hasonlóak: a méhek a kaptárak előtt csomóba gyűlnek, repülni nem tudnak, körbe-körbe mászkálnak, a potrohuk duzzadt, mozgásuk lomha, bizonytalan, olykor remegnek, majd egy héten belül elhullanak. A családok egy héten belül a kijáró méhek 1/3 részét is elveszíthetik, de a nyár közepére általában meggyógyulnak. Külön jellegzetessége ugyanis a spiroplasmosisnak, hogy jelentkezése sokszor (így Magyarországon is) vélhetőleg szezonális, a repcevirágzáshoz köthető. Az még nem ismert, hogy ez a jelenség véletlen egybeesés-e vagy a repcének fertőzőkövetítő, vagy fertőzést felerősítő hatása van-e. A nemzetközi irodalom adatai szerint a spiroplasmák elsősorban növényekben és növényeken élelmet gyűjtő rovarokban (levéltetvekben, méhekben) fordulnak elő, így nem zárható ki az sem, hogy kölcsönösen szerepet játszhatnak egymás spiroplasma-fertőzéseinek terjesztésében. Hogy a jövőben minél teljesebb képet kapjunk a spiroplasmosis terjedési dinamikájáról, számításba kell venni a mintavételezés évében az adott

régió méhlegelőin a főbb növények (mint a repce, napraforgó és akác) virágzását, esetleg a bennük keletkező károkat (fagykár) a hőmérsékleti és csapadékviszonyokat legalább érintőlegesen. Mivel a spiroplasmosis legjobb tudomásunk szerint az áttelelő fertőzött méhcsaládokban él túl és tavasszal a kitelepítések során fertőzik be a méhlegelőn található növényeket, feltevésünk szerint a megfelelő adatok birtokában akár előre is jelezhetjük a betegségből eredő méhpusztulás mértékét, de ehhez további vizsgálatokra, és nagyobb számú mintán végzett vizsgálat eredményeinek statisztikai elemzésére van szükség.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A mézelő méhek (*Apis mellifera* L.) spiroplasmosisát a *Spiroplasma apis* és *S. melliferum* baktériumfajok idézik elő. A fertőzés hatására a méhek a kaptárak előtt csomóba gyűlnek, repülni nem tudnak, körbe-körbe mászkálnak, a potrohuk duzzadt, mozgásuk lomha, bizonytalan, olykor remegnek, majd egy héten belül elhullanak.

A spiroplasmosis előfordulását Magyarországon már korábban is igazolták, de átfogó vizsgálatokat eddig nem végeztek, mivel a spiroplasmák kimutatására korábban alkalmazott módszerek idő és munkaigényesek voltak, és országos kiterjedésű mintavételezésre sem volt lehetőség.

Munkánk során rutinszerűen alkalmazható, gyorsan és viszonylag olcsón kivitelezhető, polimeráz láncreakcióra alapozott, általános, spiroplasma kimutatásra alkalmas eljárást vezettünk be a rutinszerű laboratóriumi munkába, mellyel országos kiterjedésű, a Magyar Országos Méhészeti Egyesület szervezésében zajló vizsgálatsorozat keretében egy másfél éves periódusban mértük fel a mézelő méhben előforduló két spiroplasma faj hazai elterjedtségét.

Megállapítottuk, hogy a spiroplasma fertőzés hazánk minden régiójában előfordul. A mászkáló, röpképtelen méhekből beküldött minták 21,5%-a bizonyult fertőzöttnek. A fertőzöttség kifejezett szezonálisitást mutatott, a spiroplasma pozitív minták 84,4%-át három hónap leforgása alatt, tavasszal és nyár elején gyűjtötték a méhészek, és csupán 15,6%-uk származott az év többi kilenc hónapjából. A vizsgálatra beérkezett minták (149 db) és a mintaküldő méhészetek száma (52 méhészet) meglehetősen alacsony volt, így további statisztikai értékelésre még nem elegendő, de a felmérést mindenképpen folytatni tervezzük.



## 8. ANGOL CÍM ÉS RÖVID ÖSSZEFOGLALÁS

### **Survey on the occurrence of honey bee spiroplasmas in Hungary**

The causative agents of honey bee spiroplasmosis are *Spiroplasma apis* and *Spiroplasma mellifreum*. The infected bees form clusters, they are unable to fly and tend to crawl in circles, their abdominal region swells up, their movement slows down, is uncoordinated, and they often tremble. If these symptoms appear, the bees most likely die within a week.

The occurrence of honey bee spiroplasmosis in Hungary have been confirmed previously, but comprehensive examinations have not been done, because the methods used for detecting spiroplasmas were labour and time intensive, hence these diagnostic methods could not be used for nationwide surveys

In our studies we used polymerase chain reaction because this method is relatively cheap to implement and provides quick results compared to the classical bacterium detecting methods. We introduced this procedure into our routine laboratory practice to detect honey bee spiroplasmas generally and started to work on our nationwide survey. The Hungarian National Beekeepers' Association launched a survey in a period of 18 months. Using the collected samples we investigated the occurrence of honey bee spiroplasmas in Hungarian honey bee colonies.

We found that spiroplasma infections are relatively frequent in every region of Hungary. 21,5% of the samples from bees showing the symptoms mentioned above proved to be infected with spiroplasmas. Further analysis of the data indicated that the infection occurs seasonally. 84,4% of the positive samples were collected in the spring and early summer by the beekeepers in the period of merely three months. Only 15,6% of positive samples were collected in the remaining nine months. The total number of samples (149) and apiaries (52) is not sufficient to draw any further statistical conclusions, but we plan to broaden our surveys in the future.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

- Ballinger, M. J.; Moore, L. D.; Perlman, S. J.; Stabb, E. V. (2018). Evolution and Diversity of Inherited Spiroplasma Symbionts in Myrmica Ants. Applied and Environmental Microbiology. 84 (4)
- Bastian, F.O., Sanders, D. E., Forbes, W. A., Hagijs, S. D., Walker, J V., Henk, W. G., Enright, F. M. and Elzer, Ph. H. (2007): Spiroplasma spp. from transmissible spongiform encephalopathy brains or ticks induce spongiform encephalopathy in ruminants. Journal of Medical Microbiology, 56. 1235–1242.
- Csaba György (2008): A méhek spiroplasmosisa. Méhészet c. folyóirat
- Clark, H. F. (1964): Suckling Mouse Cataract Agent. The Journal of Infectious Diseases, 114. 476-487.
- Clark, T.B.: Spiroplasma sp. a new pathogen in honeybees, J. Invertebrate Pathology, (1977) 29. 112- 113.
- Clark, T.B.: Honey bee spiroplasmosis, a new problem for beekeepers. Amer. Bee J., (1978) 118. 18-19 et 23.
- Clark, T.B., Whitcomb, R.F., Tully, J.G., Mouches, C., Saillard, C., Bové, J.M., Wróblewski, H., Carle, P., Rose, D.L., Henegar, R.B., and Williamson, D.L. (1985): Spiroplasma melliferum, a new species from the honeybee (Apis mellifera). Int. J. Syst. Bacteriol., 35. 296-308.
- Davis, R.E., Worley, J.F. (1972): Spiroplasma: motile, helical microorganism associated with corn stunt disease. Phytopathology, 63. 403-408
- Jaenike, J.; Stahlhut, J. K.; Boelio, L. M.; Uncless, R. L. (2010). "Association between Wolbachia and Spiroplasma within Drosophila neotestacea: an emerging symbiotic mutualism?". Molecular Ecology. 19 (2): 414–425.
- Kluser, S., Peduzzi, P. (2007): Global Pollinator Decline: A Literature Review.

- Koch, H.; Schmid-Hempel, P. (2011). "Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 108 (48): 19288–19292.
- Liao, C. H., Chen, T. A. (1982): Media and Methods for Culture of Spiroplasmas. In Daniels M. J. and P.G. Markham (eds.), Plant and Insect Mycoplasma Techniques, pp 174-200.
- Meeus, I., Vercruyse, V., Smaghe, G. (2012): Molecular detection of *Spiroplasma apis* and *Spiroplasma melliferum* in bees. Journal of Invertebrate Pathology, 109. 172-174
- Mouches, C., Bové, J.M., Tully, G., Rose, L., McCoy, E., Carle-Junca, P., Garnier, M., Saillard, C. (1984): *Spiroplasma apis*, a new species from the honey-bee *Apis mellifera*. Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie, 134. 383-397
- OMME-monitoring-jelentés 2019: <http://www.omme.hu/wp-content/uploads/2018/12/Monitoring-2018-n.pdf>
- OMME-monitoring-jelentés 2020: <http://www.omme.hu/kornyezetterhelesi-monitoring-vizsgalat-2018-2019/>
- Poulson, D. F., Sakaguchi, B. (1961): Nature of "Sex-ratio" Agent in *Drosophila*. Science, 133. 1489-1490.
- Saglio, P., Lhospital, M., Laflèche, D., Dupont, G., Bové, J. M., Tully, J. G. and Freundt, E. A. (1973): *Spiroplasma citri* gen. and sp. n.: A Mycoplasma-Like Organism Associated with "Stubborn" Disease of Citrus. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 23. 191-204.
- Schwarz, R.S., Weinstein Teixeira, É. Tauber, J.P., Fonseca Martins, M. (2014): Honey bee colonies act as reservoirs for two *Spiroplasma* facultative symbionts and incur complex, multiyear infection dynamics. Microbiology Open, 3. 341-355.
- Tully, J.G., Whitcomb, R.F., Rose, D.L., and Bové, J.M. (1982): *Spiroplasma mirum* sp. n.: *Spiroplasma mirum*, a New Species from the Rabbit Tick (*Haemaphysalis leporispalustris*). International Journal of Systematic Bacteriology, 32. 92-100.
- Tsushima, Y.; Nakamura, K.; Tagami, Y.; Miura, K. (2015). Mating rates and the prevalence of male-killing *Spiroplasma* in *Harmonia axyridis* (Coleoptera: *Coccinellidae*). Entomological Science. 18 (2): 217–220

- Whitcomb, R. F.; Chen, T. A., Williamson, D. L., Liao, C., Tully, J. G., Bové, J. M., Mouches, C., Rose, D. L., Coan, M. E. and Clark, T. B. (1986): *Spiroplasma kunkelii* sp. nov.: Characterization of the Etiological Agent of Corn Stunt Disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36. 170-178.
- Yang, D., Zha, G., Li, X., Gao, H., Yu, H. (2017): Immune responses in the haemolymph and antimicrobial peptide expression in the abdomen of *Apis mellifera* challenged with *Spiroplasma melliferum* CH-1. *Microbial Pathogenesis*, 112. 279-287
- Yokomi, R. K.; Mello, A. F. S.; Saponari, M.; Fletcher, J. (2008). "Polymerase Chain Reaction-Based Detection of *Spiroplasma citri* Associated with Citrus Stubborn Disease". *Plant Disease*. 92 (2): 253–260.

## 10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton is köszönöm az Országos Magyar Méhészeti Egyesület támogatását a mintaküldés megszervezésében és a vizsgálatok finanszírozásában.

Köszönöm továbbá Bakonyi Győzőnek a laboratóriumi vizsgálatok elvégzésében nyújtott segítségét.