

## Kutatási zárójelentés

Az OTKA F043155 számú, „A mézelő méh (*Apis mellifera* L.) vírusfertőzéseinek és a méhpatogén vírusok molekuláris szerkezetének tanulmányozása” című ifjúsági OTKA pályázat keretében, 2003-2006 időszakban végzett kutatómunkáról.

Az OTKA által támogatott kutatás egy korábbi program (OTKA T030335) keretében megkezdett vizsgálatok kiterjesztését, illetve egyes kérdések részletesebb vizsgálatát tűzte ki céljául. Az előző pályázat során végzett kutatásaink kimutatták a heveny méhbénulás vírus (acute bee paralysis virus, ABPV) előfordulását magyarországi méhészetekben. Igazoltuk a vírus széles körű elterjedtségét egy reverz-traszkrípciós polimeráz láncreakcióra (RT-PCR) alapozott felmérő vizsgálat segítségével. Közép-európai vírustörzsek részleges nukleotid szekvenciáinak összehasonlításával feltártuk a vírustörzsek közti feltételezett rokonsági viszonyokat, valamint egy új, az ABPV-vel és a Kashmir méhvírussal (Kashmir bee virus, KBV) rokon vírus jelenlétét mutattuk ki egy hazai mintából. Az általunk kidolgozott RT-PCR módszer segítségével végzett vizsgálatok eredményei alapján nyújtottuk be pályázatunkat a méhvírusok előfordulásának és genetikai jellemzőinek további vizsgálata, valamint a méhek vírusfertőzéseinek kimutatására alkalmas diagnosztikai módszerek fejlesztése céljából. Mindegyik, a kutatási szerződésben nevesített részterületen végeztünk vizsgálatokat, és azok a témák nagyobbik részében tudományosan jelentős (publikált vagy publikációra előkészített) eredményekre vezettek. Egyes témákban viszont olyan eredményeket kaptunk, amelyek önmagukban nem elegendők közlemény megjelentetéséhez, ezért ezek esetében további vizsgálatokra lesz szükség.

A kutatás gyakorlati lebonyolítása során a hazai és külföldi partner-intézményekkel és kutatócsoportokkal korábban kialakított és hatékony együttműködést tovább folytattuk, valamint újabb, elsősorban nemzetközi kutatási kapcsolatokat építettünk ki. A kutatásba bekapcsolódtak azok a virológiai osztályon 2003-ban alkalmazásba került pályakezdő kollégák is, akik a korábbi vizsgálatokban tudományos diákköri hallgatóként már részt vettek.

## I. Vírusok kimutatása hazai és külföldi eredetű méhmintákból

A korábbi OTKA pályázat keretében végzett felmérő vizsgálatok rávilágítottak az ABPV széles körű hazai elterjedtségére, ami felvetette, hogy megvizsgáljuk a mézelő méhben fertőzést okozó további vírusok esetleges magyarországi előfordulását. Az irodalmi adatok alapján kórtani szempontból leginkább jelentős öt méhvírus, a lárvatömlősödés vírusa (sacbrood virus, SBV) a fekete anyabölcső vírus (black queen cell virus, BQCV), a méhek szárnydeformitását okozó vírus (deformed wing virus, DWV), a krónikus méhbénulás vírus (chronic bee paralysis virus, CBPV), és a korábban már említett KBV kimutatására alkalmas RT-PCR rendszereket dolgoztunk ki és/vagy alkalmaztunk a korábbi ABPV vizsgálatoknak alávetett méhmintákon. A méhészetekből beküldött, többnyire a kaptárak aljáról gyűjtött, elhullott méheket, lehullott törmelék, parazitákat stb. tartalmazó mintákat *Varroa destructor* atka jelenlétére is vizsgáltuk, és a 11 mintából az összegyűjtött atkákat is bevontuk az említett vírusok jelenlétére irányuló vizsgálatokba. (A többi minta nem tartalmazott atkát.) Az RT-PCR vizsgálatok során ausztriai és németországi pozitív kontrollok alkalmazásával győződünk meg a diagnosztikai rendszerek működőképességéről, valamint a pozitív leleteket egyes esetekben a képződött termék direkt szekvenálásával és a génbanki vírusszekvenciákhoz történő illesztésével ellenőriztük. Az eredmények összegzését az 1. táblázat mutatja.

**1. táblázat:** Vírusfertőzések előfordulási gyakorisága magyarországi méhészetekben.

| Vírusok                   | Fertőzött méhészetek |        | Társfertőzés jellege         |
|---------------------------|----------------------|--------|------------------------------|
|                           | száma                | aránya |                              |
| Mindegyik vírusra negatív | 3                    | 6 %    | 3 (6 %)                      |
| ABPV                      | 3                    | 6 %    | Egy vírus<br><br>19 (37 %)   |
| BQCV                      | 5                    | 10 %   |                              |
| CBPV                      | 0                    | 0 %    |                              |
| DWV                       | 11                   | 21 %   |                              |
| SBV                       | 0                    | 0 %    |                              |
| ABPV & BQCV               | 4                    | 8 %    | Kettő vírus<br><br>24 (46 %) |
| ABPV & DWV                | 6                    | 12 %   |                              |
| BQCV & DWV                | 13                   | 25 %   |                              |
| DWV & SBV                 | 1                    | 2 %    |                              |
| ABPV & BQCV & DWV         | 6                    | 12 %   | Három vírus 6 (12 %)         |

Együttműködésben a bécsi Állatorvos-tudományi Egyetem klinikai virológia osztályával, hasonló felmérő vizsgálatot végeztünk ausztriai méhészetekből származó mintákon is (Berényi és mtsai. 2006). Az eredmények összehasonlíthatósága céljából a két felmérésben ugyanazokat a diagnosztikai módszereket alkalmaztuk. Eredményeinket összehasonlítottuk egy franciaországi felmérés eredményeivel is (2. táblázat). Azt állapítottuk meg, hogy egyes vírusok (pl. SBV, CBPV, KBV) előfordulási aránya jelentősen alacsonyabb a hazai méhészetekben, mint az említett nyugati-európai állományokban.

**2. táblázat:** Egyes méhvírusok előfordulási gyakoriságának összehasonlítása különböző európai országokban

| Vírusok | Magyarország  | Franciaország | Ausztria       |
|---------|---------------|---------------|----------------|
|         | (52 méhminta) | (36 méhminta) | (131 méhminta) |
| DWV     | 72 %          | 97 %          | 91 %           |
| BQCV    | 54 %          | 86 %          | 30 %           |
| SBV     | 2 %           | 86 %          | 49 %           |
| ABPV    | 37 %          | 58 %          | 68 %           |
| CBPV    | 0 %           | 28 %          | 9 %            |
| KBV     | 0 %           | 17 %          | 0 %            |
| Vírusok | 11 atka minta | 22 atka minta | nem vizsgált   |
| DWV     | 81 %          | 98 %          | –              |
| SBV     | 0 %           | 14 %          | –              |
| ABPV    | 36 %          | 10 %          | –              |
| KBV     | 0 %           | 1 %           | –              |
| BQCV    | 0 %           | 0 %           | –              |
| CBPV    | 0 %           | 0 %           | –              |

Mivel a hazai mintákat 1999 és 2004 között gyűjtöttük, az eredmények az Európai Unió csatlakozás előtti helyzetet mutatják. Az EU csatlakozás miatt várhatóan felélénkülő nemzetközi méh-, és méhészeti termék kereskedelem hatással lehet egyes vírusok hazai elterjedtségére is. Néhány év múlva végzett hasonló jellegű felmérések alkalmasak lehetnek a változások nyomon követésére. A hazai vizsgálatokról készített cikk kéziratát 2007 januárjában küldtük el a „Journal of Invertebrate Pathology” nemzetközi tudományos folyóirathoz, ahol az jelenleg lektorálás alatt áll. Az eredményeket hazai és nemzetközi konferenciákon is ismertettük.

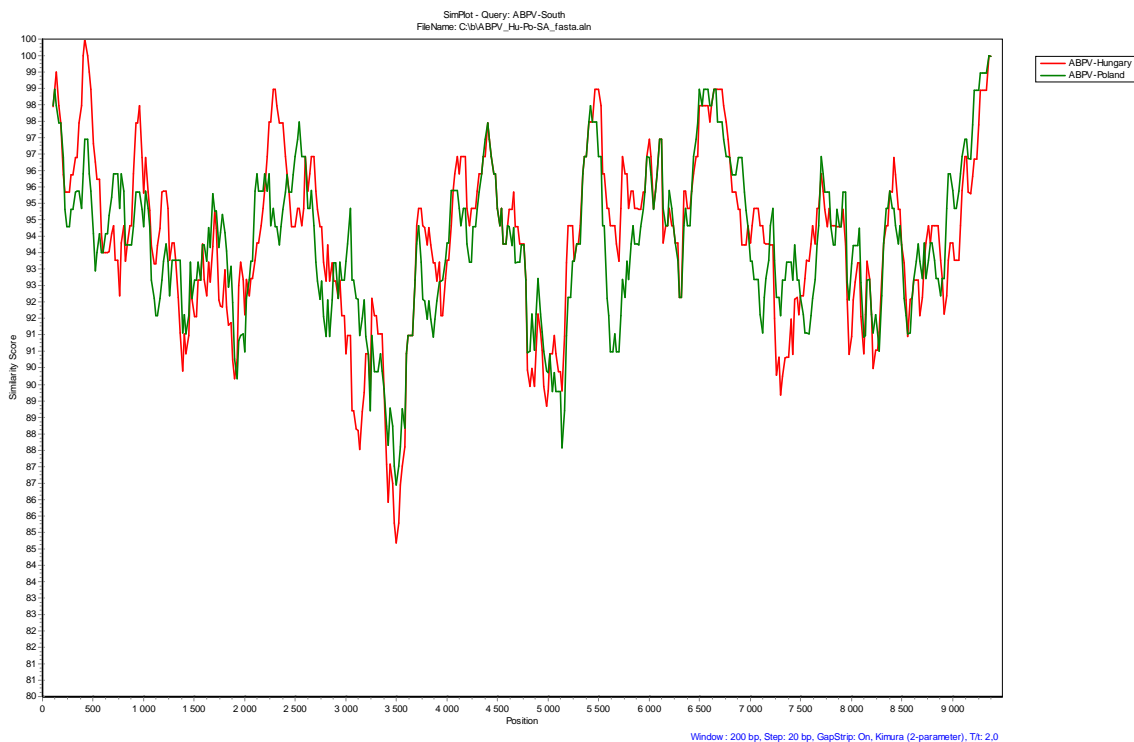
A CBPV és a KBV jelenlétét nem lehetett kimutatni az 1999 és 2004 között gyűjtött mintákból. A KBV előfordulására irányuló vizsgálatok eredményeit megosztottuk egy

németországi kutatócsoporttal, akiknek először sikerült KBV-t kimutatni Hessen tartományban. Az eredmények arra utalnak, hogy a KBV-t az utóbbi években hurcolták be Nyugat-Európába (feltételezhetően az Egyesült Államokból), és a vírus egyelőre nem jutott el a közép-európai méhészetekbe (Siede és mtsai., 2005). Egy 2005-ben gyűjtött méhminta vizsgálata során viszont a CBPV jelenlétét is sikerült igazolni hazánkban RT-PCR és elektronmikroszkópos vizsgálatok segítségével. A CBPV előfordulására irányuló vizsgálataink váratlan melléklettel is szolgáltak: A polimeráz láncreakció három hazai méhminta vizsgálata során intenzív, de a várttól eltérő méretű amplifikációs terméket képezett. A termékek direkt szekvenálásával megállapítottuk, hogy a mintákból a zablevítettű (*Rhopalosiphum padi*) vírus (RhPV) nukleinsavát sikerült kimutatni. Az RhPV genomra tervezett specifikus primerekkel végzett RT-PCR segítségével is igazoltuk a diagnózist. Ez az első leírás nem fajspecifikus vírus kimutatásáról mézelő méhből. A méhekbe vagy a levéltetű valódi gazdája, a zelnicemeggy (*Prunus padus*) kontaminált virágairól gyűjtött nektár és pollen útján, vagy pedig a tetvek által kiválasztott mézharmat gyűjtése során juthatott be a vírus. Annak az eldöntése, hogy a vírus képes-e aktívan szaporodni a méhek szöveteiben, mesterségesen fertőztünk méhbábokat, valamint a replikatív intermedier RNS képződését próbáltuk kimutatni RT-PCR vizsgálatok segítségével. Az eredmények nem bizonyították ugyan a vírusszaporodást a méhbábokban, de még további vizsgálatokat szükségesek annak egyértelmű kizárásához is. Fajidegen ízeltlábú-vírus jelenléte a méhekben ugyanakkor felveti a gazdafaj-váltás jövőbeli lehetőségét. Vizsgálatunk eredményéről nemzetközi szakmai konferencián számoltunk be.

## **II. Méhvírusok genomanalízise és filogenetikai összehasonlítása**

A megelőző kutatási program keretében filogenetikai vizsgálatokat végeztünk az ABPV közép-európai törzseinek összehasonlítása céljából. A korábbi vizsgálatok során a vírus szerkezeti fehérjéket kódoló genomterületét analizáltuk. Mivel nem állt rendelkezésre adat az ABPV genom további részeinek genetikai változékonyságáról, vizsgálatainkat kiterjesztettük egy magyarországi és egy lengyelországi törzs teljes genomszekvenciájának meghatározására. Átfedő primerpárokkal végzett RT-PCR reakciók, az ampifikációs termékek szekvencia-meghatározása és a szekvenciák összeillesztése segítségével feltártuk a két törzs teljes genomjának nukleotid sorrendjét (GenBank akcessziós szám: AF486072 és AF486073). A közép-európai ABPV törzsek 97%-ban hasonlítottak egymásra, és 94%-ban a dél-afrikai referencia törzsre. A genomok összehasonlítása során nem lehetett kiugróan magas, vagy

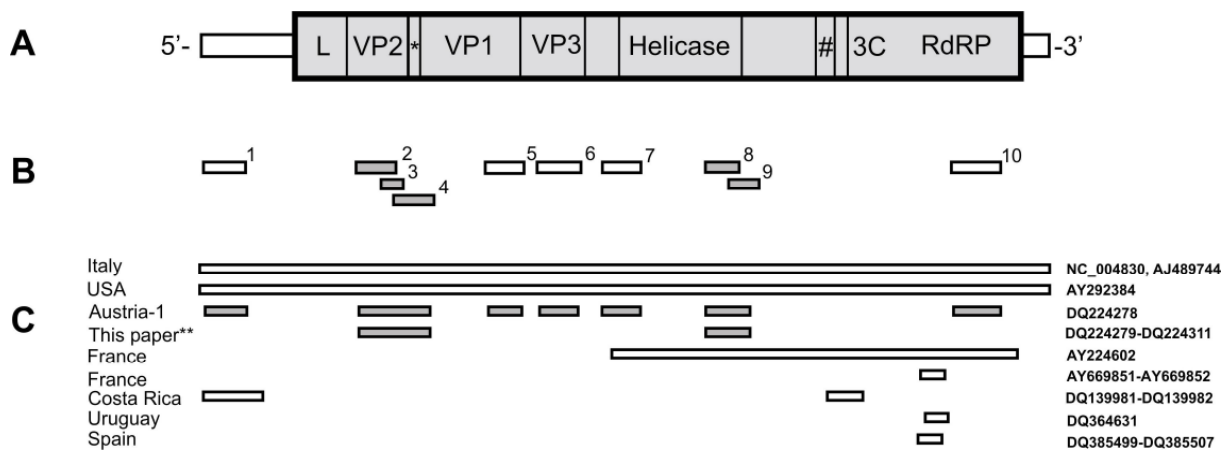
alacsony változékonyságú régiókat kimutatni (1. ábra). A szekvencia meghatározás és analízis eredményét egy külföldi méhészeti konferencián ismertettük.



**1. ábra:** A heveny méhbénulás vírus két közép-európai törzsének genomszekvencia hasonlósága a dél-afrikai referencia törzshöz viszonyítva.

A méhek szárnydeformitását okozó vírus (DWV) első hazai és ausztriai kimutatását követően, – együttműködésben osztrák, lengyel és német kutatókkal – filogenetikai vizsgálatokat végeztünk a vírus változékonyságának és a törzsek genetikai rokonságának felderítése céljából. A vizsgálatok első részében egy ausztriai DWV törzs részleges nukleotid-szekvenciáját határoztuk meg hét régióban, és összehasonlítottuk azt a génbankban található olaszországi és az Egyesült Államokból származó referencia szekvenciákkal. Mivel nem találtunk kiemelkedően magas változékonyságú területet, két régiót, a szerkezeti fehérjéket kódoló szakaszt egy részét és az RNS helikáz gén régióját választottuk a további filogenetikai vizsgálatok alapjául (2. ábra). Öt közép európai országból (Ausztria, Lengyelország, Magyarország, Németország, Szlovénia) és öt Európán kívüli országból (Egyesült Arab Emírátsok, Kanada, Nepál, Sri-Lanka, Új-Zéland) gyűjtött méhmintákat vizsgáltunk a DWV jelenlétére. Az új-zélandi minták kivételével mindegyikből sikerült kimutatni a DWV nukleinsavának jelenlétét. Összességében 34 vírustörzset vontunk be a filogenetikai analízisbe. A törzsek között tapasztalt nagy fokú hasonlóság (98-100%) miatt a statisztikai analízis nem eredményezett egyértelmű, földrajzi alapon magyarázható elkülönülést a

genotípusok között. Az általunk meghatározott szekvenciákat összehasonlítottuk más kutatók, génbankban elhelyezett DWV szekvenciáival, és ezekben az esetekben is magas hasonlósági értékeket tapasztaltunk. Ez arra utal, hogy a jelenleg rendelkezésre álló adatok szerint a DWV világszerte előforduló törzsei nagyon szoros genetikai rokonságban állnak egymással. Mivel arra semmi sem utal, hogy a DWV mutációs rátája alacsonyabb lenne, mint más RNS vírusoké, a jelenség legvalószínűbb magyarázatának azt találtuk, hogy a vírus evolúciós szempontból a közeli múltban terjedt el a föld mézelő méh populációiban. Ennek az elterjedésnek a hátterében valószínűleg a *Varroa destructor* atka utóbbi negyven évben tapasztalt gyors „világhódítása” állhat, mivel ez az atka hordozója és hatékony vektora a vírusnak. Az atkák nagy arányú fertőzöttségét saját vizsgálataink is alátámasztják.



**2. ábra:** A DWV törzsek filogenetikai összehasonlításához használt genomterületek.

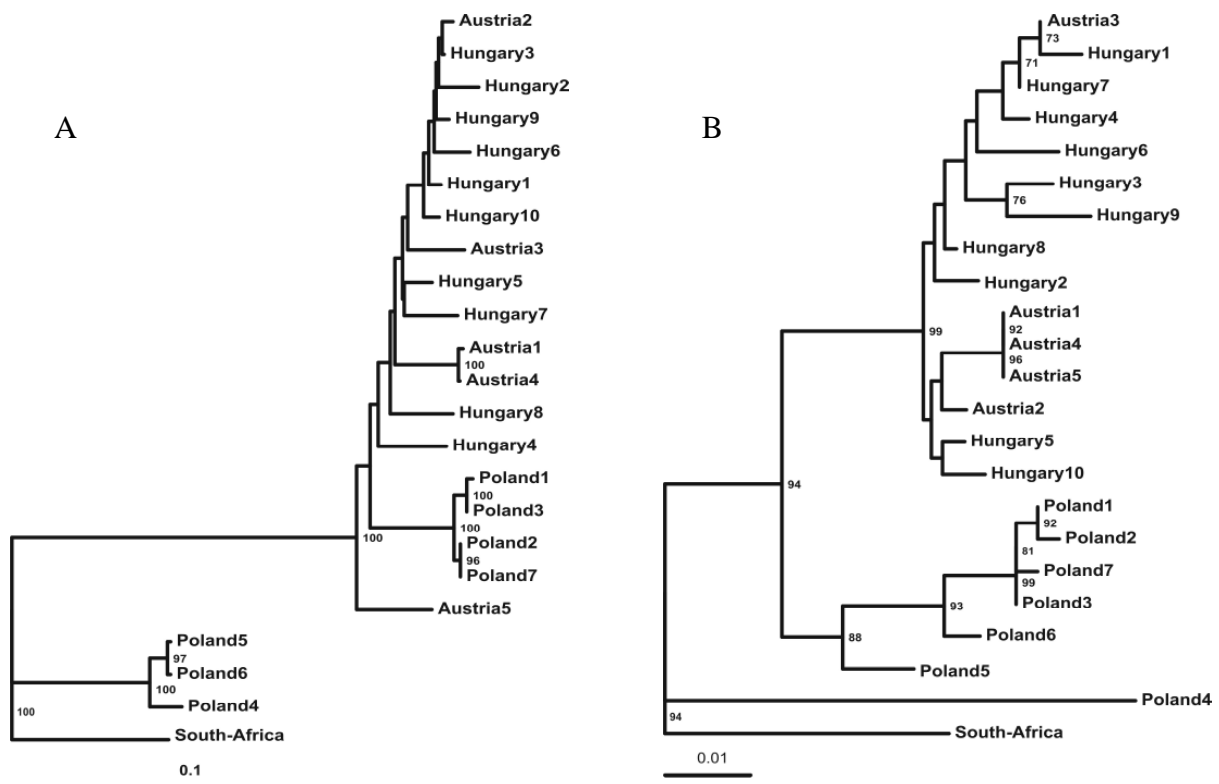
(A: a DWV genom sematikus rajza. B: Az RT-PCR-ek során képződött termékek helyeződései.

C: A filogenetikai összehasonlításokba bevont vírustörzsek)

A vizsgálatok eredményeit összegző és értékelő kéziratot benyújtottuk az „Applied and Environmental Microbiology” című tudományos folyóirathoz. A kéziratot véleményező lektorok módosításokat és további vizsgálatokat javasoltak. A vizsgálatok elvégzését és a kézirat átdolgozását követően azt ismételt benyújtottuk az újsághoz, ahol az jelenleg a lektori elbírálás stádiumában van.

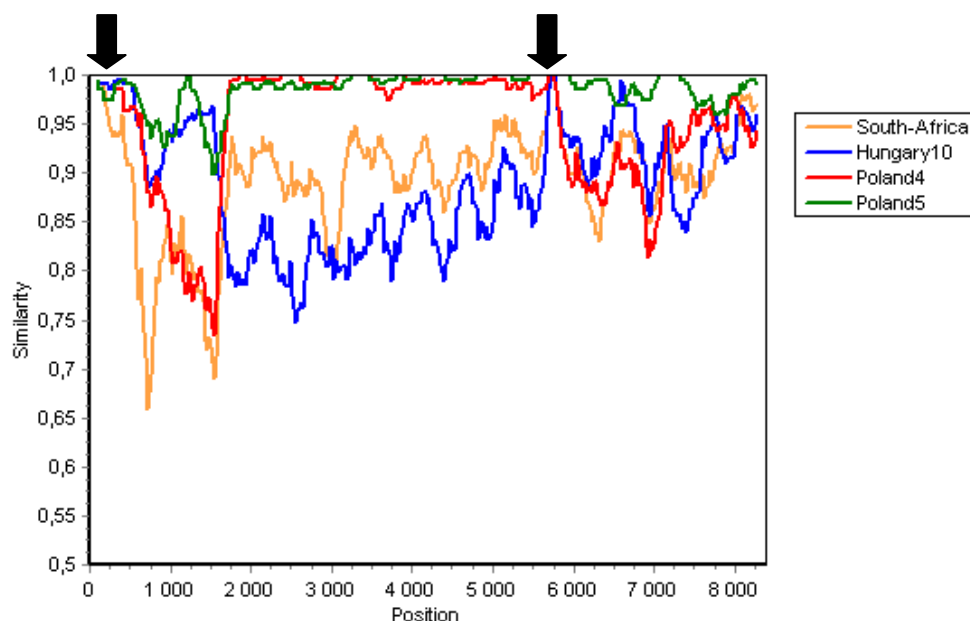
A fekete anyabölcső vírus (BQCV) első hazai és ausztriai kimutatását követően az ABPV és DWV esetében ismertett filogenetikai összehasonlítást végeztünk a közép-európai genotípusok közötti rokonsági viszonyok és a vírustörzsek változékonyságának jellemzése céljából. Ebben az esetben is két genomrégiót, a helikáz enzimet és a szerkezeti fehérjét

kódoló területeket választottuk a filogenetikai analízis alapjául. A vizsgálatokba 10 magyarországi, 7 lengyelországi és 5 ausztriai törzset vontunk be, amelyek részleges nukleotid szekvencia meghatározását követően összehasonlítottunk a dél-afrikai referencia szekvenciával. A helikáz régió alapján végzett törzsfá-rekonstrukciós vizsgálatok során a közép-európai törzsek egyértelműen elkülönültek a dél-afrikai referencia törzstől, viszont a csoporton belül nem lehetett megfigyelni statisztikailag megalapozott további elkülönülést. Meglepő módon három lengyelországi törzs különálló csoportot képezett (3a. ábra). A szerkezeti fehérjék régiója alapján konstruált törzsfában a közép-európai vírusokon belül a magyarországi és ausztriai genotípusok képeztek egy ágat, a lengyelországi vírusok pedig egy másik ágba rendeződtek. A korábban elkülönülő három lengyelországi törzs közül kettő betagozódott a többi lengyelországi törzs közé (Poland 5, 6), egy viszont változatlanul elkülönülő ágat alkotott (Poland 4). A közép-európai törzsek ezen a törzsfán is egyértelműen elkülönültek a dél-afrikai referencia törzstől (3b. ábra).



**3. ábra:** A BQCV vizsgált genotípusai közötti feltételezett rokonságot illusztráló filogram, A: a részleges helikáz gén szekvenciái alapján; B: a részleges szerkezeti fehérjéket kódoló genomterület alapján. A 70% feletti bootstrap értékek feltüntetésre kerültek.

A két törzsfá topológiájában talált eltérések, illetve lengyelországi törzsek szokatlan helyeződése okainak vizsgálata céljából további vizsgálatokat végeztünk kiválasztott vírustörzsek bevonásával. A három lengyelországi genotípus (a 3. ábrán Poland 4, Poland 5 és Poland 6), valamint egy magyarországi vírus (Hungary 10) genomszekvenciáját határoztuk meg a genom 54. és 8431. nukleotid pozíciója között. Ez a terület magába foglalja az 5' nem kódoló régió nagyobbik részét, a két nyitott leolvasási keretet (open reading frame, ORF) és a köztük levő nem kódoló intergenikus régiót, valamint a 3' nem kódoló régió nagy részét. A szekvenciákat összehasonlítottuk egymással és a dél-afrikai referencia szekvenciával. Azt állapítottuk meg, hogy az 5' nem kódoló régió és az intergenikus régió területén a vírusgenom nagy fokban konzervált. Itt találhatóak olyan, 150-200 nukleotid hosszúságú szakaszok, ahol 100%-os homológiát találtunk a vizsgált vírusok között. Ezzel szemben a nem-strukturális fehérjéket kódoló ORF1 5' oldali harmada nagyon változékonynak bizonyult. Itt több, hosszabb-rövidebb szakaszra kiterjedő deléció/inzerciót figyeltünk meg, illetve a törzsek jelentősen eltértek egymástól. Ezzel szemben az ORF1 3' oldali részén a vizsgált lengyelországi törzsek nagy fokban hasonlítottak egymáshoz, és jelentősebben eltértek a magyarországi törzstől, mint a dél-afrikai referencia törzstől. Az ORF2 területén a törzsek változékonyságának átlaga elmaradt az ORF1-en megfigyelt értéktől, viszont a lengyelországi törzsek közül itt kettő mutatott közelebbi rokonságot egymással, a harmadik pedig hasonló mértékben tért el tőlük, mint a magyarországi és dél-afrikai genotípusok. A BQCV egyes genomterületeinek változékonyságát a 4. ábra szemlélteti.



**4. ábra:** BQCV törzsek egyes genomterületeinek hasonlósága a referenciaként választott Poland 6 genotípushoz viszonyítva. A nyilak a nagyfokban konzervált nem kódoló régiók helyeződését mutatják.



A lengyelországi BQCV törzsek különböző genomterületei között megfigyelt hirtelen eltérések a hasonlósági értékekben a genomok közötti rekombinációra utalnak, amelyet méhvírusok esetében eddig még nem írtak le. Az eredményeket egy kézirat formájában foglaltuk össze, amelyet jelenleg a külföldi társszerzők javítanak, illetve kiegészítik saját gondolataikkal. Terveink szerint néhány napon belül sikerül kialakítani a publikációra kész, végleges változatot.

Folytattuk a korábbi vizsgálataink során kimutatott, az ABPV-vel és a KBV-vel rokon vírus nukleinsav szekvenciájának meghatározását. Méhbábokban mesterségesen elszaporítottuk és CsCl<sub>2</sub> gradiens ultracentrifugálással tisztítottuk a mintában található vírust. Az ABPV és a KBV konszenzus szekvenciái alapján tervezett primerek segítségével specifikus nukleinsavszakaszokat amplifikáltunk, és azok szekvenálásával két genomterület részleges nukleotid sorrendjét határoztuk meg, összesen 3094 nt hosszúságban. Sajnos a mintában szennyező vírusként jelen levő ABPV komponens megnehezítette a munka folytatását. A továbbiakban a vírusgenom molekuláris klónozására alapozott technikával szeretnénk folytatni az eddig még ismeretlen genomterületek szekvenciájának meghatározását.

Az hazánkban eddig kimutatott egyetlen CBPV törzs filogenetikai vizsgálatai céljából egy francia kutatócsoporttal kezdtünk együttműködésbe. A hazai SBV törzsek filogenetikai vizsgálatainak megkezdése előtt további pozitív mintákat szeretnénk találni, hogy a vizsgálatok pontosabb képet adjanak a hazai törzsek változatosságáról.

### **III. Méhvírusok kimutatására alkalmas diagnosztikai módszerek fejlesztése**

A méhvírusok kimutatása klasszikus virológiai módszerekkel időigényes, nehézkes és speciális feltételeket (méhbábok, típusavók) igényel. A molekuláris biológiai (pl. PCR) alapú diagnosztikai módszerek alkalmazásával kiküszöbölhetők az említett problémák. Saját vizsgálataink is alátámasztják, hogy a méhekben gyakori a szimultán vírushatások előfordulása. Ezért általában indokolt ugyanannak a mintának több vírus jelenlétére irányuló vizsgálata. A vizsgálatok egyszerűsítése, és különösen a költségek csökkentése szempontjából előnyös, ha több vírus egyidejű kimutatására alkalmas diagnosztikai módszer áll rendelkezésünkre. Együttműködésben a bécsi állatorvos-tudományi egyetem munkatársaival, olyan multiplex RT-PCR módszert fejlesztettünk ki, amely megbízható módon képes kimutatni az ABPV, a BQCV és az SBV jelenlétét méhmintákban. A rendszer optimalizálását és érzékenységének meghatározását követően annak gyakorlati alkalmazhatóságát is vizsgáltuk méhészetekből gyűjtött minták felhasználásával (Grabensteiner és mtsai., 2007).

A molekuláris biológiai és szerológiai alapú diagnosztikai módszerek talán legnagyobb hátránya a vírusizolálással szemben, hogy csak már legalább részben ismert nukleotid-sorrendű vírusok jelenlétének kimutatására, illetve ezek azonosításukra alkalmazhatók. Ezzel szemben vírusizolálás során esély van korábban még nem azonosított vírusok *in vitro* elszaporítására is. A méhvírusok szaporításának klasszikus módszere a méhbábok oltása vírus tartalmú inokulummal, amely számos technikai nehézséggel jár (a méhbábok szezonális hozzáférhetősége, magas oltási veszteség, inapparens vírusfertőzés jelenléte a bábokban stb.). Ezért merült fel az igény méhsejt eredetű szövettenyészet kialakítására. Hasonlóan a gerincesek sejtjeinek *in vitro* szaporításához (pl. csirke embrionális fibroblast szövettenyészet készítése), az egyedfejlődés korai stádiumában lévő méhek (lárvák és bábok) sejtjeit próbáltuk mesterséges körülmények között életben tartani és osztódásra bírni. A kezdeti problémák a sejttenyészet baktériumos, gombás és egysejtű élőlényekkel tapasztalt kontaminációjában nyilvánultak meg, de ezeket a fiasítás feldolgozása előtti fertőtlenítési módszerek fejlesztésével, illetve antimikotikumok és antibiotikumok alkalmazásával sikerült kiküszöbölni. A sejteket speciális, rovarok számára kifejlesztett tápfolyadékban tartottuk életben, és foetális borjúsavó mellett méhlárvák homogenizátumából nyert és sterilre szűrt kivonatot adtunk a sejtekhez az osztódás elősegítése céljából. Próbálkozásaink eredményeképpen sikerült a méhfiasítás sejtjeit mesterséges körülmények között életben tartani. A szövettenyészet két fő sejtípusból állt. Egyrészt nagy méretű, a gerincesek zsírsejtjeihez hasonló morfológiájú, úgynevezett trophicus sejtek alkották, másrészt a méh különböző szerveinek kezdeményeit képviselő, pre-immaginális korongokat láttunk a szövettenyészetben. A sejtek inkubálása során néhány nap múlva a korongokból különböző szervek (Malpighi-edények, légcsővecskék, bél stb.) kezdtek kifejlődni, amelyek az eredetileg egyrétegű sejttenyészet szintje fölé burjánzottak és mozogtak. Készítettünk olyan sejttenyészeteket is, ahol a pre-immaginális korongokat a trophicus sejtektől elkülönítettük. Ebben az esetben a korongok sejtjeinek túlélési aránya jelentősen csökkent. A korongok hosszabb tripszines emésztésével azokat különálló sejtekre választottuk szét, viszont a szövettenyészet inkubációja során újra összeálltak a korongok. A csak trophicus sejteket tartalmazó tenyészetek viszont egybefüggő, egyrétegű sejtsorból álltak. Az előállított sejttenyészeteket mesterségesen fertőztük tisztított ABPV és DWV tartalmú inokulumokkal. Sajnos nem tapasztaltunk a vírusfertőzés után látható elváltozásokat a sejteken, és a szövettenyészet felülúszójának illetve sejtjeinek RT-PCR-es vizsgálatával sem sikerült igazolni a vírusszaporodást. A közelmúltban méhpeték sejtjeiből előállított sejtvonalról jelent meg publikáció a szakirodalomban, ugyanakkor a sejtek vírusok iránti fogékonyságát a

publikáló kutatók nem vizsgálták. Amennyiben sikerül beszerezni és fenntartani a publikációban ismertetett sejtvonalat, további kutatásokat tervezünk a sejtek különböző vírusok iránti fogékonyságának meghatározása céljából.

A méhek gyakori inapparens fertőzése miatt még kevésbé tisztázott, hogy mely esetekben lehet egyértelműen kapcsolatba hozni egyes vírusfertőzések jelenlétét a méhcsaládok gyűjtési aktivitásával, népességével, betegségeivel vagy kipusztulásával. A PCR alapú technikák csak a vírusok jelenlétének kimutatására, és bizonyos esetekben a mennyiségi viszonyok jellemzésére alkalmasak, viszont nem nyújtanak információt a vírusok szöveti lokalizációjával és károsító hatásaival kapcsolatban. Erre a célra szövettani technikákra alapozott módszerek (pl. *in situ* hibridizáció, immunhisztokémia, elektronmikroszkópos vizsgálatok) lennének alkalmasak. Ezért szerepelt kutatási tervünkben az *in situ* hibridizációs eljárás kidolgozása a vírusok kimutatására a méhek és *V. destructor* atkák szöveteiben. Első lépésként szövettani metszeteket próbáltunk előállítani méhekből. Mivel a formaldehid nem volt képes áthatolni a méhek kitinkutikuláján, az állatok testüregeibe injektáltuk a fixáló folyadékot. A szövettani beágyazást követően, a mikrotomos metszéskor a kitin annyira ridegnek bizonyult, hogy repedt, tört és roncsolta a szöveteket. Így csak olyan metszeteket sikerült előállítani, ahol a méhek egyes szerveinek szöveti struktúrája és sejtjei csak korlátozottan voltak tanulmányozhatók. Sikerült együttműködést kialakítani egy ljubljani méhészeti kutatócsoporttal, akiknek van tapasztalatuk a méhek boncolásában és szervek szövettani vizsgálatában. Egy 2007-2008 évre elnyert szlovén-magyar TÉT pályázat keretében kívánjuk folytatni az *in situ* hibridizációs módszer kifejlesztésére irányuló kutatásainkat.

#### **IV. A kutatás közvetlen tudományos és gyakorlati haszna**

Az OTKA által támogatott, F043155 számú kutatási program keretében végzett vizsgálataink hozzájárultak három, referált nemzetközi szakfolyóiratban megjelent publikáció (Siede és mtsai., 2005; Berényi és mtsai., 2006; Grabensteiner és mtsai., 2007), valamint két elbírálás alatt álló (magyarországi felmérő vizsgálatok és DWV filogenetika) és egy publikációra előkészített (BQCV genom analízis) kézirat létrejöttéhez. A vizsgálatok eredményeit emellett öt külföldi és tíz hazai konferencián ismertettük. A méhvírusok genetikai vizsgálatairól terén elért eredményeink alapján a program témavezetője meghívást kapott a „Bee Research and Virology in Europe” tudományos konferenciára (Franciaország, 2005), hogy a méhek vírusai közötti filogenetikai kapcsolatról tartson előadást. Az előadást követően a témavezetőt felkérték a Nemzetközi Vírustaxonomiai Bizottság (International Committee on Taxonomy of Viruses,

ICTV), ízeltlábúak vírusai albizottság (Invertebrate Subcommittee) *Dicistroviridae* és *Iflavirus* munkacsoport (Studygroup) tagságára, amely további elismerése eddigi kutatásainknak.

Az egyes kutatási résztémákba bevontunk graduális és posztgraduális egyetemi képzésben résztvevő hallgatókat is. A program keretében végzett kutatásai eredményeiről két állatorvostan-hallgató (Roza Eszter és Doron Harel) a kari Tudományos Diákköri (TDK) konferencián számolt be, hárman (Talli Balaban, Fiona Monks és Csukás Domokos) pedig szakdolgozatot állítottak össze és azt sikeresen megvédték. Az ausztriai kutatócsoportokkal együttműködésben végzett kutatások eredményei alapján egy magyar állampolgárságú, de a bécsi állatorvos-tudományi egyetemen végzett hallgató (Berényi Olga) doktori fokozatot szerzett. Tapaszi Zsuzsanna a SZIE Doktori Iskola állami ösztöndíjas doktorandusz hallgatója, aki eddigi munkáját elsősorban ennek az OTKA programnak a keretében tervezett kutatások területén végezte.

A tudományos fórumokon túl számos, a méhészeknek és méhegészségügyi felelősöknek szervezett továbbképző előadások keretében ismertettük kutatásaink eredményeit, és felhívtuk a gyakorlatban méhekkel foglalkozók figyelmét a vírusfertőzések jelentőségére.

A kutatási program támogatásával olyan diagnosztikai módszereket dolgoztunk ki, amelyekkel gyorsan és megbízhatóan kimutathatók a méhek legfontosabb vírusfertőzései. A program időtartama alatt gyakorlati méhegészségügyi problémákkal kutatócsoportunkhoz forduló több mint 50 méhésznek nyújtottunk ingyenes virológiai diagnosztikai szolgáltatást és szaktanácsadást. A kidolgozott vírusdetekciós módszereket hozzáférhetővé tettük további méhegészségügyi diagnosztikai laboratóriumok számára is.