



Lõpparuanne

Eesti mesilaste alamliikide RNA-viiruste uuring 2024

Uuringu teostaja: Kairi Raime, PhD
(Celia CC AS)

2024

Sisukord

Uuringu eesmärk.....	3
Metoodika	3
Mesilaste proovid.....	3
Mesilaste RNA-viiruste ja kahjurite analüüsid	4
Tulemused	5
Mesilaste RNA-viirused ja kahjurid erineva alamliigi mesilastel.....	5
Mesilaste RNA-viiruste ning kahjurite Varroa ja Nosema esinemise vaheline seos	8
Kasutatud kahjuritõrjevahendite kasutuse mõju mesilaste RNA-viiruste esinemisele	9
Kokkuvõte	13

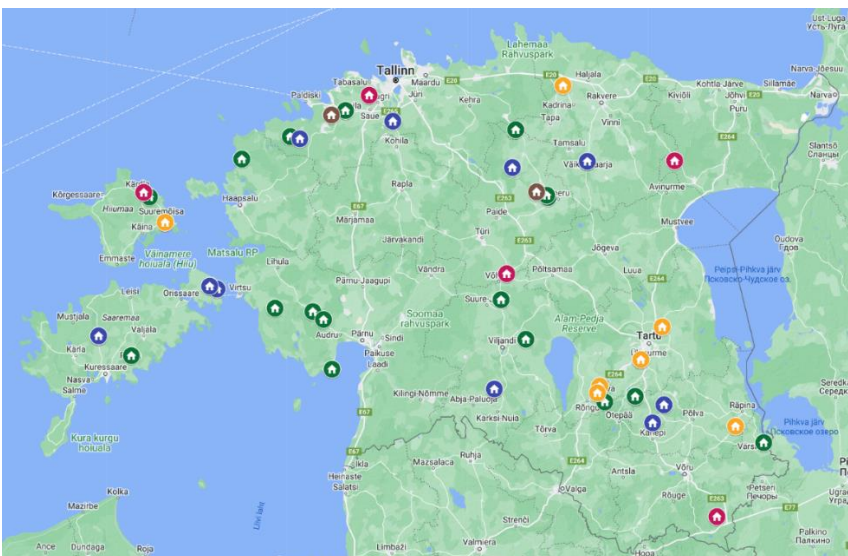
Uuringu eesmärk

Pilootuuringu eesmärk oli kirjeldada nelja-viie kõige olulisema mesilaste RNA-viiruse (DWV A+B, CBPV, ABPV, SBV) esinemist erinevatel Eestis levinud mesilaste alamliikide (kraini, itaalia, euroopa tumemesilane, buckfast) või teadmata põlvnemisega mesilastel, Lisaks uuritakse viiruste kandjatena tuntud varroalesta (*Varroa destructor*) ja *Nosema* liikide esinemist ja hulka uuritavatel proovidel ning analüüsitakse kas viiruste esinemisel on seos nende mesilaste kahjurite esinemisega. Uuringuks vajalikud proovid kogutakse 40-50 viiruskahtlusega tarust. Uuringut teostab Celvia CC AS (Tervisetehnoloogiate Arenduskeskus AS) Eesti Mesinduskogu tellimusel ja PRIA poolt vahendatud rahastuse toel (lihthange LH-24-6 "Eesti mesilaste alamliikide RNA-viiruste uuring 2024").

Metoodika

Mesilaste proovid

Uuringu käigus koguti mesilaste proovid kokku 46 tarust üle Eesti. Proovide hulgas oli nii itaalia mesilasi (*A. m. ligustica*), kraini mesilasi (*A. m. carnica*), euroopa tumemesilasi (*A. m. mellifera*), Buckfast mesilasi kui ka täpselt teadmata päritoluga mesilasi (proovide asukohakaart Joonisel 1). Mesilaste alamliigi info põhineb mesinike enda määrangul. Kogutud proovid pärinevad Eesti erinevatest piirkondadest. Erinevat alamliiki/tõugu mesilaste proovide hulkade täpsem jaotus on näha Joonisel 2.

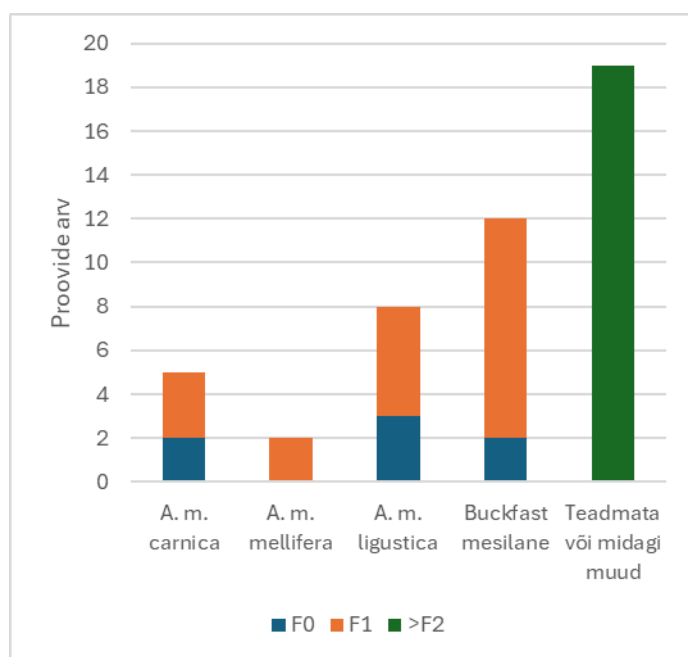


Joonis 1. Proovide kogumiseks kasutatud tarude asukoht. Erinevad värvid tähistavad mesilaste alamliiki proovi andnud tarus (pruun - euroopa tumemesilane *A. m. mellifera*, punane – kraini mesilane *A. m. carnica*, kollane –

itaalia mesilane *A. m. ligustica*, sinine – Buckfasti mesilane, roheline – täpselt teadmata päritoluga mesilased ja hübriidid)

Igast uuringus osalevast mesitarust koguti 2024. aasta suve alguses (mai, juuni) proovikogumise anumasse vähemalt 50 grammi elusaid mesilasi. Mesilased koguti juhendi järgi meekärgedelt (vältides haudme lähedust). Mesilaste proovid pandi esimesel võimalusel sügavkülma ja säilitati seal kuni Celvia CC AS laborisse saatmiseni ja analüüside teostamiseni.

Mesinikelt küsiti koos proovidega infot mesilas esinevate teadaolevate nakkuste või kahjurite kohta ning mesilas kasutatud mesilaste kahjurite vastaste tõrjevahendite kohta. Muuhulgas paluti täpsustada ka lisaks alamliigi määrangule, kas proovi puhtatõuliste mesilaste puhul on tegemist F0 või F1 põlvkonna mesilastega (proovide vastav jaotus on näha Joonisel 2). Euroopa tumemesilase (*A. m. mellifera*) proovide hulgas ühtegi F0 põlvkonna mesilaste proovi ei olnud.



Joonis 2. Mesilaste põlvkondade jaotus erinevate mesilaste alamliikide proovide hulgas. Euroopa tumemesilase (*A. m. mellifera*) proovide hulgas F0 põlvkonna mesilasi mesinike antud andmete põhjal ei olnud. Kõik teadmata päritoluga mesilaste või hübriide proovid on F2 või kaugema põlvkonna mesilased.

Mesilaste RNA-viiruste ja kahjurite analüüsid

Kogutud proovidel analüüsiti nelja, või kui proovimaterjali oli piisavalt, siis viit erinevat mesilastega seotud viirust: mesilaste deformeerinud tiiva viiruseid DWV-A ja DWV-B, mesilaste kroonilise paralüüsi viirust CBPV, mesilase akuutse paralüüsi viirust ABPV ning kotthaudme viirust SBV.

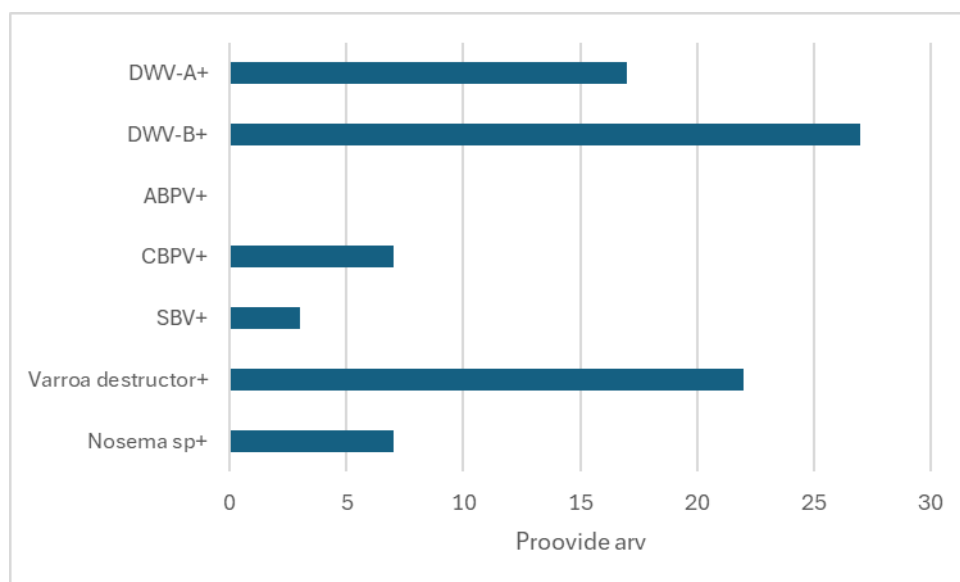
Viiruseid DWV-A, DWV-B, CBPV ja ABPV analüüsiti kokku 46 proovil. SBV-d, mille analüüs vajab suuremat kogust mesilasi, analüüsiti kokku 40 proovil (6 proovil ei olnud analüüsiks piisavalt materjali). Varroalesta analüüs teostati 46 proovile ja *Nosema* liikide tuvastus 45 proovile.

RNA-viiruste ja *Nosema* liikide DNA tuvastamiseks kasutati PCR-põhist meetodikat. Proovid valmistati analüüsiks ette Celvia CC AS laboris, analüüse viidi läbi vastavaid analüüse teostavates partnerlaborites Eestis või Saksamaal (LABOKLIN, LABRIS, EMÜ)

Tulemused

Mesilaste RNA-viirused ja kahjurid erineva alamliigi mesilastel

Kõige laiemalt levinud viirused analüüsitud proovides olid DWV-B viirus, mida tuvastati 27 proovist, ja DWV-A viirus, mida tuvastati kokku 17 proovist (Joonis 3). Lisaks tuvastati kroonilise paralüüsi viirust CBPV kokku seitsmest proovist ja kotthauet tekitavat viirust SBV kokku kolmest proovist. Akuutse paralüüsi viirust üheskiki analüüsitud proovist ei tuvastatud. Ühes ja samas proovis võis esineda ka korraga mitu erinevat viirust. Viiruste kandjatena kirjeldatud mesilaste kahjureid varroalesta ja *Nosema* liike tuvastati vastavalt 22-st ja 7-st proovist. *Nosema*-positiivsetest proovidest 6 puhul tuvastati *N. ceranae* ja 1 puhul liik *N. apis*,



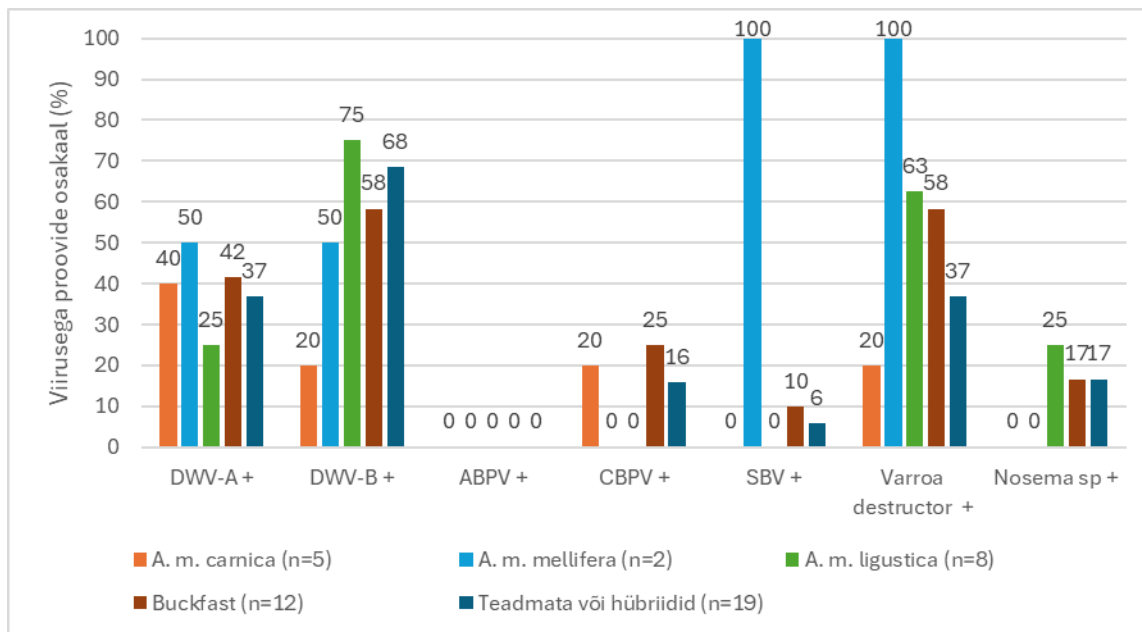
Joonis 3. Tuvastatud mesilaste viiruste ja kahjuritega proovide hulgad. Erinevatest proovidest tuvastati RNA-viiruseid DWV-A, DWV-B, CBPV ja SBV, varroalesta ning *Nosema* liikide DNA-d. ABPV-d ühestki proovist ei tuvastatud.

Erinevate viirustega proovide osakaalu varieerus erinevate mesilaste alamliikide proovide vahel. Joonis 4 kirjeldab, kui suurel osal vastava mesilaste alamliigi proovidest tuvastati konkreetset viirust.

Mesilaste tiivaviirused olid levinud kõikide erinevate alamliikide mesilaste hulgas. Näiteks mesilaste deformeerunud tiivaviirust DWV-A tuvastati 40% *A. m. carnica*, 50% *A. m. mellifera*, 25% *A. m. ligustica*, 42% Buckfasti ja 37% teadmata päritoluga mesilaste proovidest (Joonis 4). Mesilaste akuutset paralüüsi viirust ühestki analüüsitud proovist ei tuvastatud. Euroopa tumemesilase *A. m. mellifera* proove oli analüüsis kokku vaid kaks, mis tähendab, et DWV-A ja DWV-B esinesid neist vaid ühes proovis ning kotthaudme virus SBV esines mõlemas proovis.

Nosema liike *A.m. mellifera* ja *A. m. carnica* proovidest ei tuvastatud. *Varroa destructor* kui laialtlevinud mesilaste kahjur oli levinud kõikide erinevate alamliikide proovides.

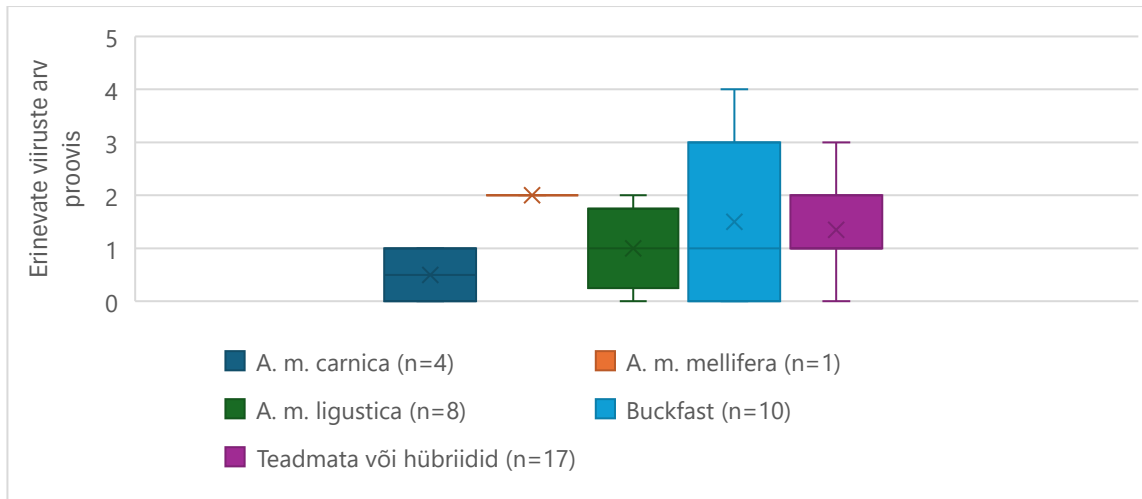
Kuna proovid olid kogutud eelistatud viiruskahtlusega tarudest ning erineva alamliigi proovide hulgad olid väga erinevad, siis ei saa laiapõhjalisemaid järeldusi erinevate alamliikide viiruskindluse kohta antud analüüsist veel kindlasti teha.



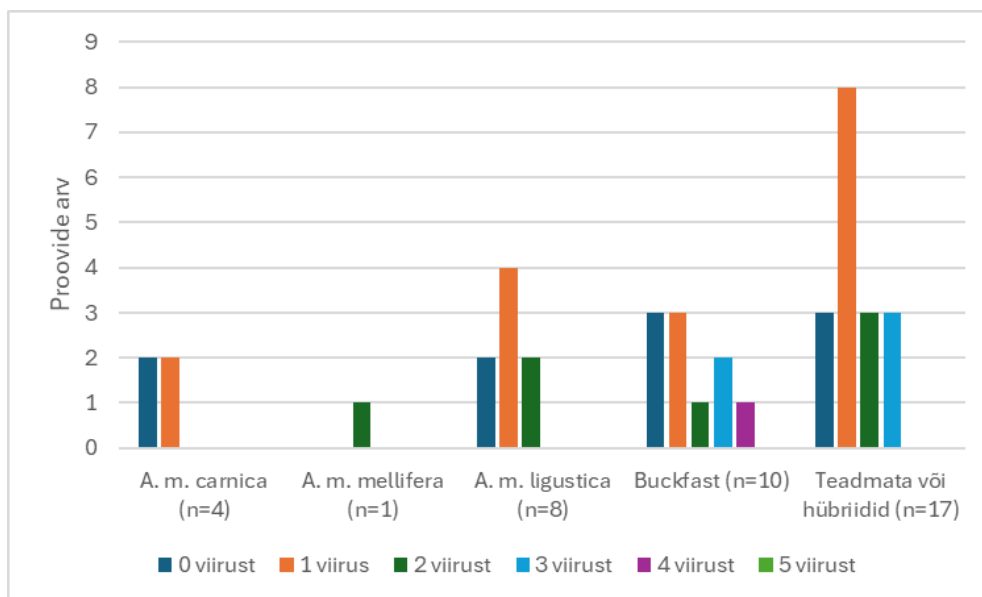
Joonis 4. Viiruse või kahjuriga proovide osakaal erinevate mesilaste alamliikide proovide hulgas. ABPV viirust ei tuvastatud ühestki analüüsitud proovist. Mesilaste deformeerunud tiivaviirust DWV-A tuvastati 40% *A. m. carnica*, 50% *A. m. mellifera*, 25% *A. m. ligustica*, 42% Buckfasti ja 37% teadmata päritoluga mesilaste proovidest. Erinevate alamliikide proovide koguhulgad on toodud joonise all vastava alamliigi nimetuse järel sulgudes.

Erinevaid viiruseid võis ühes ja samas proovis esineda korraga rohkem kui üks. Kõiki viite viirust (DWV-A, DWV-B, ABPV, CBPV, SBV) analüüsiti kokku 40 proovil. Keskmine proovi kohta tuvastatud erinevate viiruste arv oli sõltuvalt alamliigist vahemikus 0.5 – 2 (Joonis 5). Kõige suurem tuvastatud erinevate viiruste arv proovi kohta oli 4 (Buckfasti mesilastega proov). Proove, millest ei tuvastatud ühtegi analüüsitud viiest viirusest oli kõikide alamliikide proovide hulgas (va euroopa tumemesilase proov). Mõnevõrra väiksem oli tuvastatud viiruste arv kraini mesilaste (*A. m. carnica*) proovides

võrreldes teiste alamliikide proovidega, aga proovide liiga väikese arvu tõttu ja viiruste-fookusega kogutud proovide alusel ei saa laiapõhjalisemaid järeldusi teha. On näha, et mida suurem on kogutud proovide hulk, seda varieeruvam on ka proovi kohta tuvastatud viiruste arv. Erinevate tuvastatud viiruste arvuga proovide hulkade jaotused erinevate mesilaste alamliikide puhul näitab, et enamasti on erinevate alamliikide proovides kuni 1-2 erinevat viirust proovi kohta ning kolme ja nelja erineva viirusega proovide hulk sõltuvalt alamliigist pigem väike või olematu (Joonis 6).



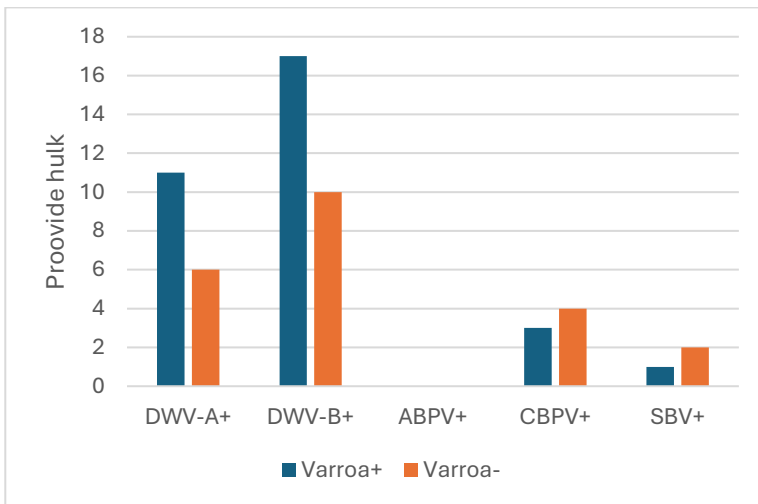
Joonis 5. Erinevate tuvastatud viiruste arv proovi kohta erinevate mesilaste alamliikidega proovides. Keskmine viiruste arv proovi kohta oli sõltuvalt mesilaste alamliigist 0.5 – 2. Kõiki viite mesilaste viirust tuvastati kokku 40 proovil. Alamliigi nime taga sulgudes on toodud iga alamliigi proovide hulk.



Joonis 6. Erinevate tuvastatud viiruste arvuga proovide hulkade jaotus erinevate mesilaste alamliikide puhul. Analüüsiti kokku 5 erinevat mesilastega seotud RNA-viirust. Tuvastati maksimaalselt 4 erinevat viirust proovi kohta.

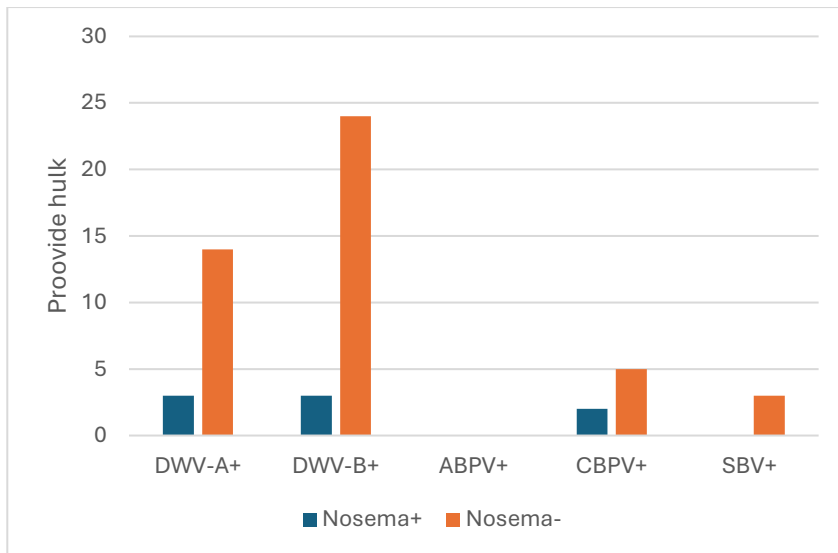
Mesilaste RNA-viiruste ning kahjurite Varroa ja Nosema esinemise vaheline seos

Varroalesta ja Nosema liike on kirjeldatud kui mesilaste viiruste kandjaid ja vektoreid või kahjureid, mille esinemine mesilas loob soodsa pinnase erinevate viiruste levikuks tarus. Mesilaste deformeerunud tiiva viiruseid DWV-A ja DWV-B tuvastati antud uuringus analüüsitud proovide puhul oluliselt rohkem varroalesta leiuga mesilaste proovidest. Mesilaste kroonilise paralüüsi viirust CBPV-d ja kotthaudme tekitajat SBV-d tuvastati aga mõnevõrra rohkem pigem varroalesta leiuta proovidest (Joonis 7). Mesilaste akuutse paralüüsi viirust ei tuvastatud ühestki analüüsitud proovist.



Joonis 7. Erinevate mesilaste viirustega proovide hulk varroalesta leiuga ja leiuta proovide hulgas. DWV-A ja DWV-B viirusega proovide hulk oli suurem varroalesta leiuga (Varroa+) proovide puhul, samas kui CBPV ja SBV-ga proovide hulk oli suurem pigem varroalesta leiuta (Varroa-) proovide puhul. ABPV viirust analüüsitud proovidest ei tuvastatud.

Nosema leiuga proovides olid aga kõikide erinevate viirustega DWV-A, DWV-B, CBPV ja SBV proovide hulk oluliselt madalam võrreldes Nosema leiuta proovidega (Joonis 8).

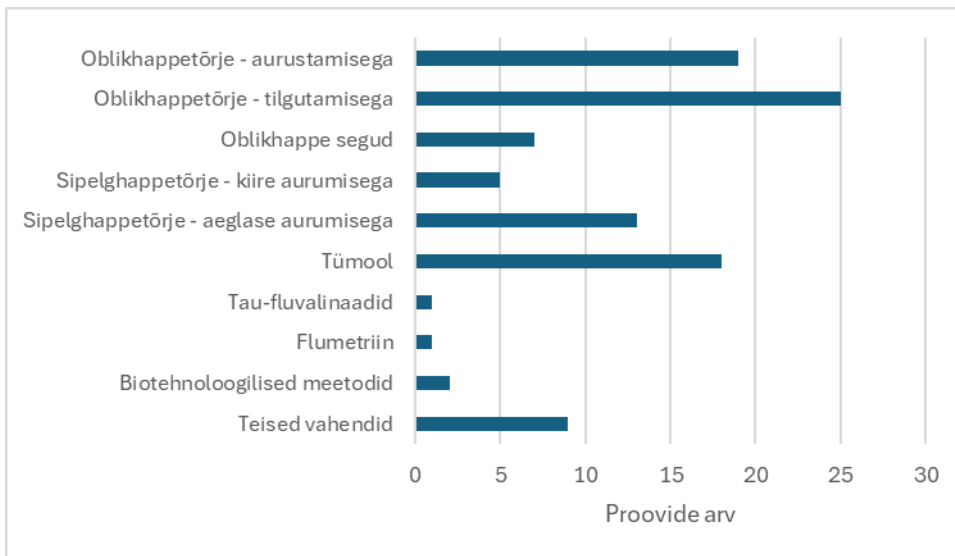


Joonis 8. Erinevate mesilaste viirustega proovide hulk *Nosema* liikide leiuga ja leiuta proovide hulgas. Nii DWV-A, DWV-B, CBPV kui ka SBV-ga proovide hulk oli suurem pigem *Nosema* leiuta (*Nosema*-) proovide puhul.

Mesilaste deformeerunud tiiva viiruste DWV-A ja DWV-B puhul võib näha seost varroalesta esinemise ja viiruste esinemise vahel, kuid teiste viiruste puhul ning samuti *Nosema* liikide ja viiruste koosinemise vahel antud uuringu tulemused seost ei näita. Tõenäolisemalt sõltub viiruse esinemine olulisel määral ka teistest faktoritest, näiteks mesilaste hügieenikäitumisest ja mesiniku tegevusest mesilas.

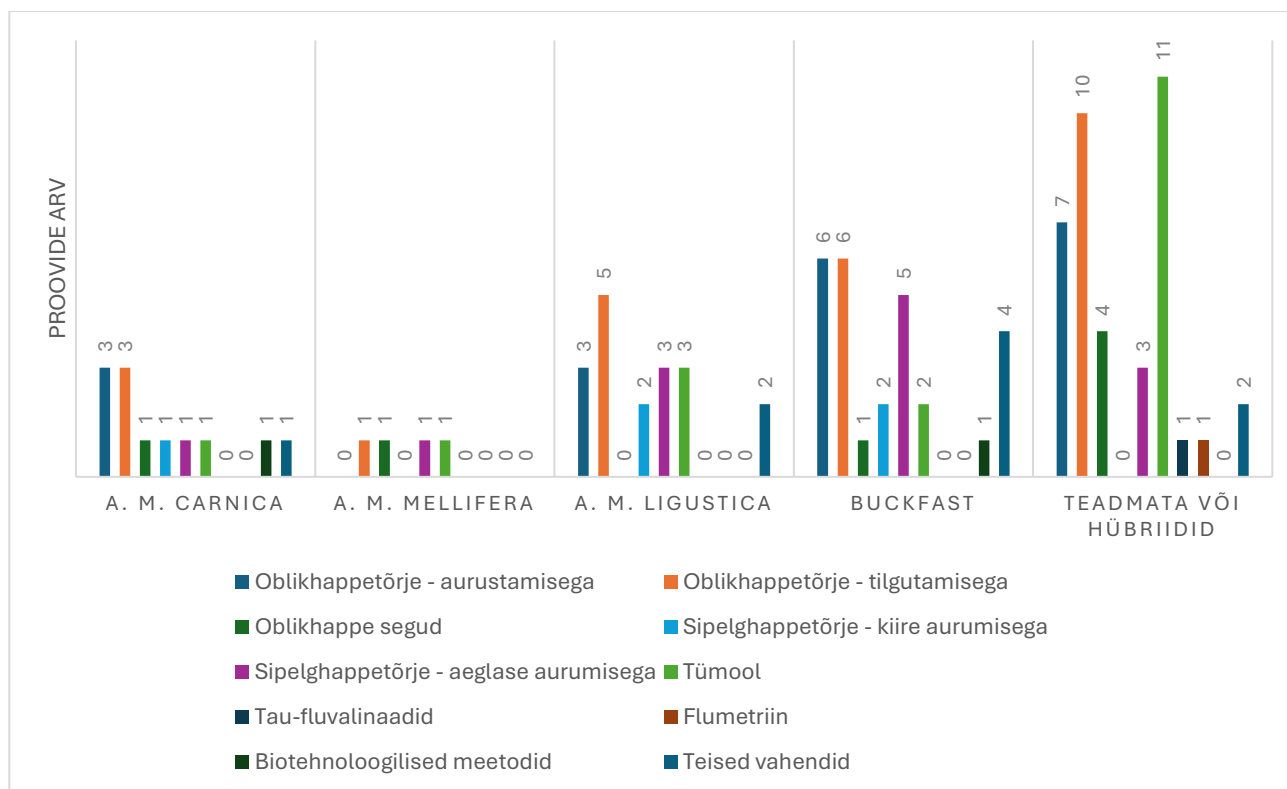
Kasutatud kahjuritõrjevahendite kasutuse mõju mesilaste RNA-viiruste esinemisele

Viirusega nakatumine sõltub paljudest erinevatest faktoritest. Lisaks haiguskindlusele, hügieenikäitumisele, geneetikale (alamliigile, liinile), kahjurite olemasolule ja paljudele muudele faktoritele võib viiruste esinemine mesilastel sõltuda ka kasutatud tõrjevahenditest. Uuringus osalenud ja proovi andnud tarudes olid kasutusel erinevad mesilaste kahjurite tõrjevahendid: erinevaid oblikhappetõrje meetodeid, sipelghappetõrje meetodeid, tümool, tau-fluvalinaadid, flumetriin, biotehnoloogilised, keemilised või muud meetodid (Joonis 9). Kõige populaarsemad vahendid olid oblikhappetõrjevahendid, tümool ja aeglase aurumisega sipelghappe meetod.



Joonis 9. Erinevate tõrjevahenditega seotud mesilaste proovide hulk uuringus. Enim kasutatud tõrjevahendid proovide kogumiseks kasutatud tarudes olid oblikhappetõrje aurustamise või tilgutamisega, tümmool ja aeglase aurumisega sipelghappetõrje.

Kõige enam kasutatud tõrjevahendid *A. m. carnica*, *A. m. ligustica* ja Buckfasti mesilastega tarudes olid oblikhappetõrje tilgutamisega või aurustamisega (Joonis 10). Teadmata päritoluga mesilastega mesilates puhul kasutati enim tümmooli. Populaarne oli *A. m. ligustica* ja Buckfast mesilastega tarudes aeglase aurumisega sipelghappetõrje.



Joonis 10. Tarus kasutatud tõrjevahendite valik erinevate mesilaste alamliikide proovide puhul. Kõige enam kasutatud tõrjevahendid *A. m. carnica*, *A. m. ligustica* ja Buckfasti mesilastega tarudes olid oblikhappetõrje tilgutamisega või aurustamisega. Teadmata päritoluga mesilastega mesilates puhul kasutati enim tümooli.

Tabelis 1 on toodud erinevate viiruste ja kahjurite leiuga proovide arvud erineva kasutatud tõrjemeetodiga seotud proovide puhul. Antud arvud ei näita siiski otseselt erinevate tõrjevahendite efektiivsust, sest erinevate tõrjevahenditega seotud proovide hulk võib olla väga erinev.

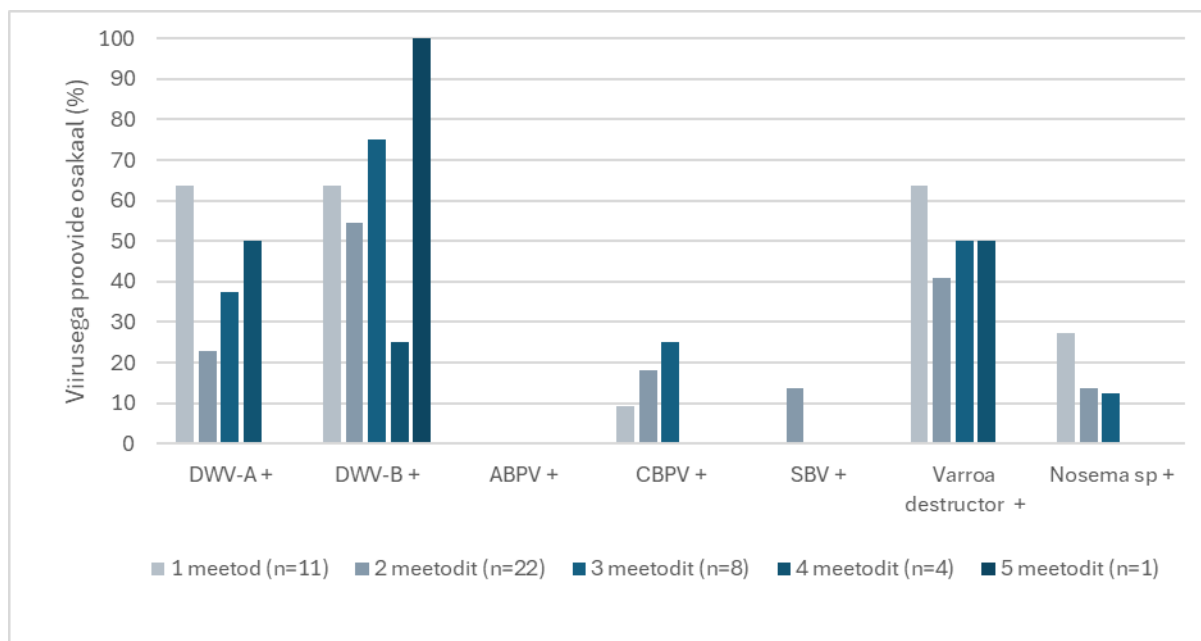
Tabel 1. Viiruspositiivsete proovide hulk erinevate kasutatud tõrjevahendite puhul. Sulgudes toodud vastava meetodiga seotud või vastava viiruse leiuga proovide koguarv.

Tarus kasutatud tõrjemeetodid	DWV-A+ (n=17)	DWV-B+ (n=27)	ABPV+ (n=0)	CBPV+ (n=7)	SBV+ (n=3)	<i>Varroa destructor</i> + (n=22)	<i>Nosema sp+</i> (n=7)
Oblikhappetõrje - aurustamisega (n=19)	8	11	0	5	0	7	2
Oblikhappetõrje - tilgutamisega (n=25)	11	14	0	3	3	11	4
Oblikhappe segud (n=7)	1	5	0	1	0	3	0
Sipelghappetõrje - kiire aurumisega (n=5)	1	2	0	1	0	3	1
Sipelghappetõrje - aeglase aurumisega (n=13)	5	8	0	2	2	6	3
Tümool (n=17)	5	12	0	3	1	7	1
Tau-fluvalinaadid (n=1)	0	1	0	0	0	1	0
Flumetriin (n=1)	0	0	0	0	-	0	-
Biotehnoloogilised meetodid (n=2)	1	1	0	0	0	1	0
Muud vahendid (n=9)	2	4	0	0	0	6	1

Et efektiivselt ohjata mesilastega seotud kahjureid, kes potentsiaalselt võivad kanda mesilastega seotud viirusi, on ühes ja samas mesilas tihti kasutusel rohkem kui üks kahjuritõrje meetod. DWV-A viirusega proovide osakaal oli kõige madalam kahte erinevat meetodit kombineerinud taru proovides. DWV-B viirusega proovide osakaal oli madalaim 4 erinevat meetodit kombineerinud taru proovides (Joonis 11), CBPV viirusega proovid andnud tarudes oli kasutatud tõrjeks vaid kuni 3 erinevat meetodit ning SBV viirusega proovide puhul vaid kahte meetodit. Ühtegi proovi, mis pärineks tarust/mesilast, kus mitte ühtegi kahjuritõrjevahendit ei kasutatud, ei olnud. Varroalesta leiuga proovide osakaal ei erinenud oluliselt 1,2,3 või 4 erineva tõrjevahendi kombineeritud kasutamisel.

Analüüsitud proovide puhul selget seost erinevate paralleelselt kasutatavate meetodite hulga ja väiksema viiruste või varroalestaga proovide hulga vahel ei tuvastatud. Viiruste ja varroalesta esinemisele proovis avaldab tõenäoliselt suuremat mõju kasutatava meetodi efektiivsus ja muud mesilaste ning mesiniku käitumisega soetud faktorid kui samaaegselt kasutatavate meetodite hulk.

Nosema leiuga proovide osakaalu ja kasutatud meetodite arvu vahel võib märgata teatavat pöördvõrdelist seost, aga kuna *Nosema* leiuga proovide hulk on suhteliselt väike (7), siis vajaks antud seose kinnitamine täiendavaid uuringuid.



Joonis 11. Viirusega proovide osakaal ühe või mitme kahjuritõrje vahendi kombineerimisel. DWV-A viirusega proovide osakaal oli kõige madalam kahte erinevat meetodit kombineerinud taru proovides. DWV-B viirusega proovide osakaal oli madalaim 4 erinevat meetodit kombineerinud taru proovides,

Kokkuvõte

Mesilaste RNA-viiruste esinemine sõltub väga paljudest erinevatest faktoritest, muuhulgas mesilastega seotud faktoritest (näiteks hügieenikäitumine, haiguskindlus, alamliik, mesilaste kahjurid tarus), mesiniku poolt kasutatud hügieeni või kahjuritõrje meetmetest, taru keskkonnast ja paljust muust. Iga faktor mõjutab mõningal määral viiruste esinemist, aga iga üksiku faktori mõju ei ole paljude faktorite koosmõju olukorras selgelt tuvastatav ja vajaks suurema hulga proovide analüüsi.

Antud uuringus analüüsiti 46 üle Eesti erinevatest tarudest kogutud mesilaste proove. Eelistatult koguti proovid erinevate mesilaste alamliikidega ja viiruskahtlusega tarudest. Enamik mesilasproovidest oli kas Buckfasti, itaalia või kindlalt teadmata alamliigi mesilastega tarudest (viimaste hulka kuulusid ka erinevate alamliikide F2 või kaugema põlvkonna mesilased). Kraini ja euroopa mesilaste proovide hulk oli antud uuringus väiksem, vastavalt vaid 5 ja 2 proovi.

Kõige levinud viirus uuritud proovides oli DWV-B viirus, mida tuvastati kokku 27 proovist, ja DWV-A viirus, mida tuvastati kokku 17 proovist. Lisaks tuvastati kroonilise paralüüsi viirust CBPV kokku seitsmest proovist ja kotthauet tekitavat viirust SBV kokku kolmest proovist. Akuutse paralüüsi viirust ühesktki analüüsitud proovist ei tuvastatud. Ühes ja samas proovis esines keskmiselt 1.3 erinevat viirust korraga ja maksimaalselt kuni 4 erinevat viirust analüüsitud 5 viirusest.

Viiruste kandjatena kirjeldatud mesilaste kahjureid varroalesta ja *Nosema* liike tuvastati vastavalt 22-st ja 7-st proovist. *Nosema*-positiivsetest proovidest enamiku puhul oli tegemist *N. ceranae* liigiga, vaid ühe proovi puhul tuvastati *N. apis*, mis näitab *N. ceranae* üha laiemat levikut ka Eesti regioonis, kus varasemalt oli levinud pigem *N. apis*. Mesilaste deformeunud tiivaviirusega proovide hulk oli küll suurem varroalesta leiuga proovides (võrreldes varroalesta negatiivsete proovide grupiga), kuid oodatud seost varroalest ja teiste viiruste või *Nosema* liikide esinemise ja viiruste esinemise vahel antud uuringus ei tuvastatud.

Uuriti ka seost erinevate tarus kasutatud mesilaste kahjurite tõrjevahendite ja RNA-viiruste esinemise vahel. Üksikute tõrjevahendite mõju ja seost RNA-viiruste esinemisele tulemustest ei selgunud, sest paljudel juhtudel kasutati paralleelselt rohkem kui ühte tõrjevahendit kombineeritult. Mõningast seost tuvastati kasutatud tõrjevahendite hulga ja *Nosema* esinemise vahel (mida rohkem erinevaid vahendeid oli kombineeritult kasutatud, seda väiksem oli *Nosema* positiivete proovide hulk. Varroalesta ja RNA-viiruste puhul samasugust seost aga ei tuvastatud.

Erinevate viirustega proovide arv varieerus sõltuvalt mesilaste alamliigist, kuid kuna proovide arv erinevate alamliikidega proovide gruppides ei olnud väga suur (eriti euroopa tumemesilase ja kraini mesilase puhul) siis RNA-viiruste esinemise ja mesilaste alamliigi vahel antud uuringu põhjal veel laiapõhjalisemaid järeldusi teha ei saa. Erinevate alamliikide viiruskindluse analüüsimiseks oleks vaja

analüüsida suuremat hulka erineva alamliigi mesilaste proove, proovid koguda juhusliku valimina, eelistamata viiruskahtlusega tarusid, ja võtta arvesse teiste viiruste esinemist mõjutavate faktorite samaaegset mõju.

Kontakt

Kairi Raime, PhD

Celvia CC AS

Teaduspargi 13, Tartu, Eesti

+372 5581489

kairi.raime@ccht.ee