

Eesti Maaülikool

Lõpparuanne: Tarulangetise uuring 2022

Projektijuht: Risto Raimets, PhD

Projekti täitjad: Sigmar Naudi, MSc

Margret Jürison, MSc

Tartu 2022

PROJEKTI LÖPPARUANNE

1. PROJEKTI NIMETUS: Tarulangetise uuring

2. PROJEKTI NIMETUS INGLISE KEELES: The study of hive debris

3. PROJEKTI KESTUS

Algus: 28.03.2022

Lõpp: 31.07.2022

4. PROJEKTI EELARVE

Kululiigid	Uuringu erinevate etappide maksumus koos km-ga
Tarulangetise kogumise kulu km-ga	1986,31
Tarulangetisest AHM-i eoste määramine km-ga	19353,60
Tarulangetisest noseemoosi (<i>Nosema ceranae</i> ja <i>Nosema apis</i>) määramine km-ga	21973,82
Kogutud andmete põhjal analüüsi koostamine km-ga	3859,20
Uuringu lõpparuande koostamine km-ga	3859,20
Lõpparuande koostamine km-ga	3859,20
Kogusumma (koos km-ga)	54 891,33

5. PROJEKTI LÖPPARUANDE KOKKUVÕTE:

Käesoleva projekti üldiseks eesmärgiks oli koguda Eesti erinevate maakondade mesilatest tarulangetise proove ja nendest määrata Ameerika haudmemädaniku (*Paenibacillus larvae*) esinemine. Teiseks eesmärgiks oli määrata kogutud proovidest noseemoosi haigustekitajate (*Nosema apis* ja *Nosema ceranae*) esinemine.

Metoodika

Projekti käigus koguti 2022. aasta kevadel Eesti erinevate maakondade (Jõgevamaa, Lääne-Virumaa, Ida-Virumaa, Saaremaa, Läänemaa, Võrumaa, Raplamaa, Viljandi maakond, Harjumaa, Järvamaa, Tartumaa, Valgamaa, Põlvamaa) mesilatest tarulangetise proove. Tarulangetise all peetakse käesolevas tekstis silmas talve (2021/2022) jooksul taru põhjale langenud surnud mesilasi, vahapuru jm. Proovi kogumise metoodika nägi endas ette, et kuni 10 (**elus**) mesilasperega mesilagrupid võetakse koondproov, mis kraabitakse tarupõhjadelt ~1500 ml topsidesse. Proovide kogumiseks tehti koostööd maakondlike usaldusmesinikega, kes aitasid proove mesinikelt kokku koguda ja Maaülikooli toimetada. Proovide kogumiseks koostati projekti täitjateks olnud Maaülikooli töötajate poolt mesinike jaoks ka proovivõtmise protokoll ja selgitav metoodika. Kui mesilagrupp oli suurem kui 10 mesilasperet, siis tuli võtta juba 2 eraldi proovi (ka siin võis olla paindlik, sest 11 mesilaspere puhul on siiski mõttekas võtta 1 koondproov aga näiteks 15 mesilaspere puhul on otstarbekas juba võtta 2 proovi). Mesinike ülesandeks oli markeerida proov nõuetekohaselt ning nii, et hiljem oleks võimalik võetud proovi kokku viia konkreetsete tarudega. Nõuetekohase proovi markeerimise all peeti silmas PRIA mesilagrupi koodi või kui see puudus, siis võimalikult täpsed *Google maps* koordinaadid. Kui mesilagrupis oli mõni mesilaspere hukkunud mõnel seletamatul põhjusel, siis ka sellest tarust (või tarudest) võis mesinik võtta tarulangetise proovi (antud juhul tuli siis see ka vastavalt markeerida). Kogutud proove hoiustati sügavkülmas kuniks nad Maaülikooli transporditi.

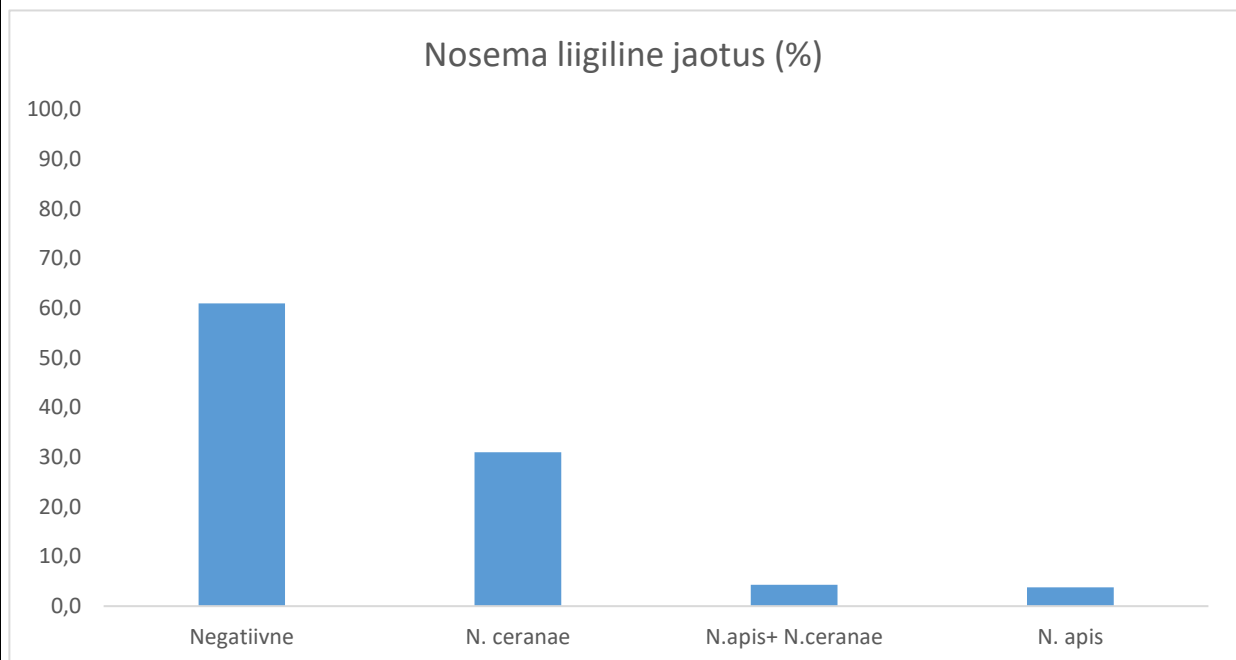
Maaülikooli laboratooriumis eraldati kogutud tarulangetise proovidest vahapuru ja mesilased, mis pakendati eraldi ja pandi sügavkülma. Vahapuru sisaldavad tarulangetise proovid saadeti Ameerika Haudmemädaniku eoste

määramiseks (Quantitative PCR) Eesti Maaülikooli partnerlaborisse Itaalias (Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale). Tarulangetisest eraldatud meemesilastest määrati *Nosema* liigiline ja kvantitatiivne koosseis Eesti Maaülikooli laboratooriumis DNA (multiplex PCR (M-PCR) assay) ja voolutsütomeetri (BD Accuri C6) abil.

Tulemused

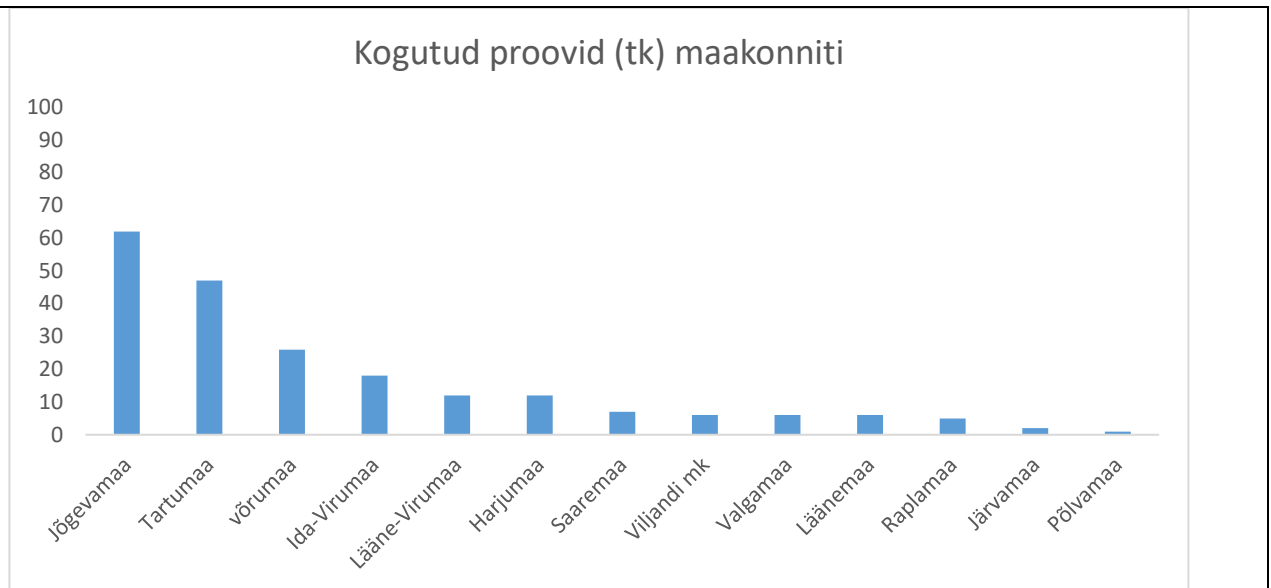
Nosemoos

Nosemoosi tekitajate (*N.apis* ja *N.ceranae*) analüüsitulemustest kajastub küllaltki huvitav pilt. Kogutud proovidest (n=210) leiti nosema eoseid (*N.apis* ja *N.ceranae* või mõlema segu) vaid 39% (82 proovi). Käesoleva projekti tulemustest selgub ka, et varasemalt Eestis domineerinud *N. apis* on taandumas ning oluliselt dominantsemaks on osutunud hoopis *N. ceranae*. Tulemustest selgub, et *N. apis* positiivseid proove oli vaid 8 (3,8% kogutud proovidest). *N. ceranae* suhtes positiivseid proove oli seevastu 65 tükki (31% kogutud proovidest). Kahe haigustekitaja segu (*N. apis* + *N. ceranae*) esines vaid üheksal juhul (4,2% kogutud proovidest). Sarnast trendi on kirjeldatud ka Läti näitel (Naudi *et al.* 2021). Säärane trend on ohtlik, sest *N. ceranae* on mesilasele agressiivsem vorm ning tal puudub kergesti äratuntav kliiniline pilt. Projekti tulemustest selgub ka positiivne tõsiasi, et tervelt 128 proovi (61% kogutud proovidest olid nosema suhtes negatiivsed). Nosema liigilise jaotuse tulemused kajastuvad joonisel 1.



Joonis 1. Nosema liigiline jaotus (%).

N. apis suhtes positiivsetest proovidest (9 proovi) pärinesid 5 proovi Jõgevamaalt. *N. ceranae* suhtes positiivseid proove võis leida pea kõikidest maakondadest, kust proove koguti. Huvitava tulemusena kajastus ka see, et 9 proovi, mis olid positiivsed mõlema nosema liigi suhtes, tervelt 6 proovi pärinesid Jõgevamaalt. Siiski on siinkohal oluline ka mainida, et proovide jaotus maakonniti oli vägagi erinev (joonis 2).



Joonis 2. Kogutud proovide osakaal maakonniti.

Käesoleva projekti tulemused näitavad selgelt seda, et *N. ceranae* on Eestis jõudsasti levimas ning mesinikud peaksid olema eriti tähelepanelikud ja laskma kahtluse korral proove analüüsida.

Ameerika Haudmemädanik

Ameerika haudmemädaniku (AHM) eoseid analüüsiti tarulangeisest (kuiv vahapuru, mis oli eelnevalt laboris proovidest eraldatud) kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) abil. Käesoleva analüüsi mõõtühikuks on CFU/g (kolooniaid moodustavate spooride arv grammi kohta). qPCR meetodi eeliseks on ka tema kvantitatiivne täpsus. Väidetavalt nõ „taldriku peal kasvatatud“ AHM-i eosed ei pruugi kõik kasvama minna ja see annab ebaselge pildi tegelikust nakatumise määrast.

Kogutud 210-st proovist osutusid analüüsikõlblikuks 183 proovi. Välja jäänud 27 proovi puhul oli proovis liiga vähe vahapuru või puudus see sootuks. Ameerika haudmemädaniku suhtes osutusid negatiivseteks 86 proovi. Viiekümne kolme proovi puhul esines nõrk positiivne tulemus AHM-i eoste suhtes, mis jäi alla määramispiiri (<100 CFU/g). 25 proovi puhul esines samuti positiivne tulemus AHM-i eoste suhtes (vahemik 10-100 CFU/g), kuid see jäi samuti alla määramispiiri. 19 proovi puhul leiti pisut tugevam (üle määramispiiri) või väga tugev nakatumine AHM-i eostega, mis moodustab 10,4% kõikidest kogutud proovidest. Tabelis 1 on välja toodud AHM-i spooride arv ühes grammis (kõnealused 19 proovi) ja hinnang nakkuse määra tugevusele. Kuue proovi puhul oli tegemist väga tugeva nakkusega, ülejäänud 13 proovi nakatumise määr oli pigem tugev, pigem madal või madal. Antud hinnangutes on kasutatud sõna „pigem“, sest erinevate mesilasperede puhul võib kliiniline pilt sõltuvalt mitmetest faktoritest erinevalt avalduda.

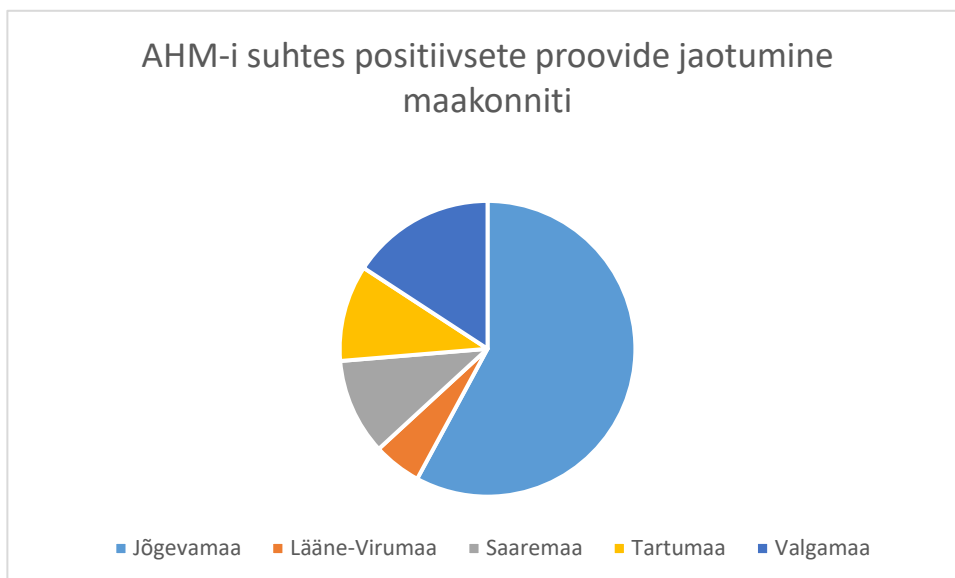
Tabel 1. AHM-i spooride arv positiivsetes proovides.

AHM-i spooride arv 1 grammis	Kas tegu on tugeva nakkuse määraga?
1460000	Väga tugev
942000	Väga tugev
391000	Väga tugev
362000	Väga tugev
256000	Väga tugev
183000	Väga tugev
932	Pigem tugev

625	Pigem tugev
623	Pigem tugev
445	Pigem madal
329	Pigem madal
313	Pigem madal
311	Pigem madal
303	Pigem madal
204	Madal
204	Madal
176	Madal
169	Madal
152	Madal

Erinevates teadustöodes on ka uuritud, millise nakatumise määra juures AHM-i kliiniline pilt avaldub. On välja ka toodud, et see võib sõltuda suuresti mesilaste ja haudme hulgast mesilasperes ning nakatumisest möödunud aja pikkusest (Stephan *et al.* 2020). Ühe tulemusena on ka välja toodud, et 3000 AHM-i spoori mesilase kohta on nii-öelda piir, kus võib leida juba nii sümptomaatilisi kui asümptomaatilisi mesilasperesid (Gende *et al* 2011).

AHMI suhtes positiivsete proovide jaotumus maakonniti on näidatud joonisel 3. Nagu nosemoosi kajastavas tulemuste peatükis mainitud, siis proovide arv oli maakonniti väga erinev ja otsesid tugevaid korrelatsioone maakondade ja nakatumiste vahel luua ei saa.



Joonis 3. Ameerika haudmemädaniku positiivsete proovide jaotumine maakonniti.

6. JÄRELDUSED

1) Projekti tulemustest selgub, et *Nosema ceranae* on Eestimaal jõuliselt levimas ja see on Eesti mesindussektorile arvestatav oht. *N. ceranae* ohtlikkus peitub tema agressiivsuses ja konkreetne kliiniline nakatumise pilt puudub. *N. ceranae* mõjul võib mesilaspere näiteks jääda nõrgaks ja aja jooksul hääduda, ilma et mesinik oskaks sellele nähtusele laborianalüüse teostamata konkreetset põhjust anda. Täna ses situatsioonis on eriti oluline, et mesinikud hoiaksid oma mesilas kõrget hügieeni ja vahetaksid regulaarselt mesilasemasid.

2) Ameerika haudmemädaniku puhul on antud projekti valguses tõsiasjaks, et 10,4% proovidest osutusid positiivseteks (üle määramispiiri) ning enim positiivseid tulemusi leiti Jõgevamaalt ja Tartumaalt. Kuna Ameerika haudmemädanik on väga ohtlik haudmehaigus, siis peaksid mesinikud koostöös veterinaaridega oma mesilatel eriti valvsalt silma peal hoidma.

7. TULEMUSTE LEVITAMINE

1) Käesoleva projekti tulemustest on kavas kirjutada koos Itaalia kolleegidega rahvusvaheliselt eelretsenseeritav teadusartikkel. Antud artiklis saab kindlasti erilist rõhku just AHM-i eoste määramine **qPCR** meetodika abil.

2) Projektis osalenud mesinikele saadetakse personaalselt nende kogutud proovide tulemused e-maili peale.

3) Projekti tulemusi tutvustatakse täpsemalt Eesti Mesinike Talvistel Teabepäevadel ja vajadusel veel teistel mesinikele mõeldud teabepäevadel.

8. Kasutatud allikad

Naudi S, Šteiselis J, Jürison M, Raimets R, Tummeleht L, Praakle K, et al. Variation in the Distribution of *Nosema* Species in Honeybees (*Apis mellifera* Linnaeus) between the Neighboring Countries Estonia and Latvia. *Veterinary Sciences*. 2021 Apr;8(4):58.

Stephan JG, de Miranda JR, Forsgren E. American foulbrood in a honeybee colony: spore-symptom relationship and feedbacks between disease and colony development. *BMC Ecology*. 2020 Mar 6;20(1):15.

Gende L, Satta A, Ligios V, Ruiu L, Buffa F, Fernández N, et al. Searching for an American foulbrood early detection threshold by the determination of *Paenibacillus* larvae spore load in worker honey bees. *Bulletin of Insectology*. 2011 Dec 1;64:229–33.