



## **FUNKČNÍ VZOREK**

---

**Technické řešení: Postup pro detekci virů  
včely medonosné z měli**

**RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.**

4714  
2020

## **Funkční vzorek**

4714/2020

**Technické řešení: Postup pro detekci virů včely medonosné z měli.**

RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.  
Mgr. Romana Moutelíková, Ph.D.  
Mgr. Eliška Čukanová

2020

ISBN 978-80-7672-004-6

## **Funkční vzorek**

**Technické řešení: Postup pro detekci RNA virů včely medonosné z měli.**

RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.  
Mgr. Romana Moutelíková, Ph.D.  
Mgr. Eliška Čukanová

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum, číslo projektu QK1910286, název projektu Efektivní postupy a strategie pro zvládnutí včelích chorob a udržitelný chov včelstev.

## OBSAH

1. Úvod	3
2. Cíl metodiky funkčního vzorku	3
3. Vlastní popis funkčního vzorku	3
a. sběr a skladování vzorků měli	3
b. extrakce ribonukleové kyseliny	3
c. stanovení přítomnosti virové nukleové kyseliny	4
4. Seznam použité literatury	4
5. Srovnání novosti postupů	4
6. Popis uplatnění funkčního vzorku	4
7. Ekonomické aspekty	4
8. Dedikace	4

## 1. Úvod

Vosková mčel ze dna úlu je běžně využívána jako diagnostický vzorek pro stanovení přítomnosti a kvantifikaci původce moru včelího plodu ve včelstvu kultivační metodou (<https://www.beedol.cz/zkusebni-laborator/vysetreni-moru-vceliho-plodu-z-meli>).

Obdobně je v literatuře popsán postup pro detekci a kvantifikaci *Paenibacillus larvae* ve vzorcích mčeli metodou qPCR (např. Rossi et al. 2018, Ryba et al. 2009). Proto se nabízí také možnost využít vzorky mčeli také k detekci RNA významných virových patogenů včel. Takovýto postup nebyl doposud dle našich informací publikován v odborné literatuře.

## 2. Cíl metodiky funkčního vzorku

Cílem metodiky funkčního vzorku je technické řešení izolace virové RNA z mčeli. Měl se odebrat v období, kdy ji včelstvo produkuje. Lze využít zimní mčel, která se také využívá pro testování přítomnosti *P. larvae*. Mčel představuje velmi vhodný vzorek z hlediska transportu, nevyžaduje totiž speciální podmínky (chlazení) při transportu do laboratoře (Ryba et al. 2009). Zároveň se jedná o velmi dobrý indikátor zdravotního stavu včelstev, protože kromě částec vosku obsahuje i části těl včel, případně roztoče, kde se dá očekávat přítomnost virových patogenů. Na druhou stranu je mčel z hlediska extrakce nukleových kyselin poměrně komplikovaný materiál díky obsahu organických látek (např. propolis), které mohou inhibovat enzymy potřebné k průběhu reverzní transkripce (tj. reverzní transkriptáza) a polymerázové řetězové reakce (tj. DNA polymeráza). To je ovšem odstranitelné volbou vhodného postupu extrakce RNA, případně další purifikace získané RNA.

## 3. Vlastní popis funkčního vzorku

### a. sběr a skladování vzorků mčeli

K vyšetření je potřeba zhruba polévková lžice mčeli. Je možné využít také podložky (dostupné na [www.beedol.cz](http://www.beedol.cz)). Odebírá se jeden vzorek z jednoho včelstva, směsné vzorky se nevyšetřují. Vzorek je nutné zabalit do prodyšného papírového obalu, aby nedošlo k jeho zplesnivění. Vzorky není nutné chladit. Zasílají se běžnou poštou. Od odběru vzorku do jeho dodání do laboratoře nesmí uplynout více než 7 dnů. V laboratoři je možné vzorky před zpracováním skladovat v hlubokomrazicím boxu při -80 °C.

### b. extrakce ribonukleové kyseliny

- K 0,1 g mčeli přidat 1 ml TRI Reagent® (Molecular Research center, Inc., USA) nebo obdobný produkt jiného výrobce. Středně intenzivně protřepávat na třepačce s nástavcem na 1,5/2 ml mikrozkušavky po dobu 15 minut při pokojové teplotě. Je vhodné použít 2 ml mikrozkušavku se šroubovacím uzávěrem.
- Odstředit při 5000 g po dobu 15 minut.
- Extrakce RNA ze supernatantu dle návodu výrobce extrakčního činidla (TRI Reagent®; Molecular Research Center, Inc., USA nebo obdobný produkt jiného výrobce).
- Přečištění RNA získané v předchozím kroku pomocí Chemagic Viral RNA/DNA Kit (Perkin-Elmer, Německo) dle návodu výrobce. Alternativně lze využít další vhodné a na

trhu dostupné soupravy založené na technologii magnetických kuliček, případně jiné technologii.

- Získanou přečištěnou RNA je nutné skladovat při -80 °C do dalšího použití.

#### c. stanovení přítomnosti virové RNA

Získaná RNA je v dostatečné kvalitě umožňující provedení reverzně transkripční PCR ve formátu end-point i v reálném čase včetně kvantifikace. Konkrétní postup včetně použití primerů a sond k PCR diagnostice je v gesci dané laboratoře. Konkrétní detekční systémy nelze doporučit ani z důvodu značné genomové plasticity virů včely medonosné.

#### 4. Seznam použité literatury

**Rossi, F.**, Amadoro, C., Addolorato, R., Ricchiuti, L. (2018). Evaluation of Quantitative PCR (qPCR) *Paenibacillus larvae* Targeted Assay and Definition of Optimal Conditions for its Detection/Quantification in Honey and Hive Debris. *Insect*, 9(165), doi:10.2290/insects9040165.

**Ryba, S.**, Titera, D., Haklova, M., Stopka, P. (2009). A PCR method of detecting American Foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in winter beehive wax debris. *Veterinary Microbiology* 139,193-196.

#### 5. Srovnání novosti postupů

Dle našich informací nebyl tento postup doposud k detekci virů včely medonosné použit. Měl však může být využita pro PCR diagnostiku původce moru včelího plodu, což z tohoto technického řešení činí vhodnou nástavbu z hlediska rozšíření diagnostických možností.

#### 6. Popis uplatnění funkčního vzorku

Technické řešení popsané ve funkčním vzorku může nalézt uplatnění v laboratořích zaměřených na detekci původců včelích viróz.

#### 7. Ekonomické aspekty

Ekonomické aspekty funkčního vzorku nelze v danou chvíli hodnotit. Pokud by však bylo popsané technické řešení využito souběžně s detekcí *P. larvae* při screeningu ze zimní měli, získali by chovatelé doplňující informace o výskytu ( a v případě použití kvantifikačních PCR metod také o množství) významných virových patogenů včely medonosné z jednoho odebraného vzorku.

#### 8. Dedikace

Funkční vzorek je dedikován projektu QK1910286 (Efektivní postupy a strategie pro zvládání včelích chorob a udržitelný chov včelstev) v rámci Programu aplikovaného výzkumu MZe na období 2017 – 2025 ZEMĚ.

VÚVeL 

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.  
Hudcova 296/70  
621 00 Brno  
Czech Republic

Tel.: +420 5 3333 1111; [www.vri.cz](http://www.vri.cz); e-mail: [vri@vri.cz](mailto:vri@vri.cz)