

OVĚŘENÁ TECHNOLOGIE

**Produkce matek prostých specifických patogenů:
Postup odběru a zpracování vzorků určených
k detekci vybraných virových patogenů včely
medonosné (*Apis mellifera* L.)
v matkách před jejich distribucí**

**RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.
Ing. Dalibor Titěra, CSc.
Mgr. Veronika Krčmářová
Bc. Eliška Čukanová**

**4940
2018**

Ověřená technologie 4940/2018

Produkce matek prostých specifických patogenů: Postup odběru a zpracování vzorků určených k detekci vybraných virových patogenů včely medonosné (*Apis mellifera* L.) v matkách před jejich distribucí

Autoři:

RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 296/70, Brno

Ing. Dalibor Titěra, CSc., Výzkumný ústav včelařský, s.r.o., Dol 94, Máslovice

Mgr. Veronika Krčmářová, Výzkumný ústav včelařský, s.r.o., Dol 94, Máslovice

Bc. Eliška Čukanová, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Kotlářská 267/2, Brno

Ověřená technologie byla vyvinuta v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu (QJ1510113), Národního programu udržitelnosti NPU-I (LO1218) a projektu Ministerstva zemědělství ČR RO0518.

ISBN 978-80-88233-35-0

Seznam použitých zkratk

SPF	Specific Pathogen Free; prostý specifických patogenů
RT-PCR	reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
BQCV	Black queen cell virus; virus černání matečnicků
ABPV	Acute bee paralysis virus; virus akutní obrny včel
CBPV	Chronic bee paralysis virus; virus chronické obrny včel
SBV	Sacbrood viru; virus pytlíčkovitosti plodu
ČSV	Český svaz včelařů, z.s.
DNA	deoxyribonukleová kyselina

Technická dokumentace

Účel použití:

Chovatelský postup určený chovatelům včelích matek (*Apis mellifera* L.) zejména v rámci rozmnožovacích a šlechtitelských chovů, který slouží prokázání přítomnosti či nepřítomnosti významných včelích virových patogenů v plemenné včelí matce nedestruktivní metodou vyšetření vzorku výkalů a vajíček včelí matky.

Popis produktu:

Matka prostá specifických virových patogenů (SPF matka) představuje zcela nový produkt, kdy chovy matek budou distribuovat matky, u kterých je deklarována **nepřítomnost vybraných virových patogenů**. Matky budou před zařazením do chovu otestovány metodou reverzně transkripční polymerázové řetězové reakce (RT-PCR) na přítomnost genomové ribonukleové kyseliny (RNA) viru černání matečnicků (BQCV), viru akutní paralýzy (ABPV), viru chronické paralýzy (CBPV) a viru pytlíčkovitosti plodu (SBV).

Pro získání vzorků biologického materiálu z matek budou využity nedestruktivní postupy, spočívající v odběru výkalů a vajíček. Postup odběru vzorků umožní otestovat jednotlivé matky na přítomnost virové ribonukleové kyseliny (RNA) v období před jejich odesláním odběratelům. Kombinace dvou odlišných vzorků odebraných od jedné matky umožní popsat

virologický status jednotlivých matek (výkaly) a současně vyloučit vertikální přenos virů z matky na potomstvo (vajíčka).

Vývoj nového postupu pro produkci SPF matek reaguje na celosvětové rozšíření patogenních virů ve včelstvech a jejich negativní vliv na kondici a zdravotní stav včelstev. Většina virů infikuje dělnice a infekce probíhá skrytou formou, nicméně občas může dojít ke vzniku otevřené infekce, kdy jsou pozorovány klinické symptomy daného onemocnění. Matka je oproti relativně krátkověkým dělnicím nejdéle žijící členkou včelstva a zároveň má nezastupitelnou reprodukční funkci. Udržitelný život včelstva, jakožto superorganismu, je zcela závislý na kladoucí matce, která zajišťuje obnovu dělnic ve včelstvu. Proto je chov kvalitních včelích matek a následně včelstev v dobré zdravotní kondici zásadní pro včelařství v české republice.

Podmínky produkce:

Chov probíhá v souladu s podmínkami stanovenými Chovatelským řádem ČSV a navazující Příručkou plemenářské práce. Důraz je kladen na vedení plemenářské evidence a další předepsané dokumentace.

Vlastní chovatelské zařízení je udržováno v souladu se zootechnickými zásadami správné chovatelské praxe, veškeré plochy a pomůcky jsou pravidelně čištěny a desinfikovány vhodnými přípravky s virucidním účinkem (např. 4 % roztok Bee-Safe).

Postup odběru vzorků:

Odběr výkalů.

Odběr probíhá v místnosti při teplotě min. 15 °C. Matky jsou v klícce přeneseny na čistý pracovní stůl a následně umístěny na dno plastové Petriho misky o průměru 50 - 80 mm, určené k jednorázovému použití a popsané číslem vzorku. Alternativně lze použít čisté, doposud nepoužité, mikroskopické podložní sklíčko. Matka na zvoleném podkladu je poklopena čistou kádinkou menšího průměru než podložka a ponechá se po dobu přibližně 5 až 30 minut. Poté co se vykálí, se matka umístí zpět do své klícky. Průběh vyšetření je zdokumentován na Obrázku 1. Výkaly se s pomocí automatické mikropipety s novou sterilní špičkou smyjí 100 µl sterilního fyziologického roztoku. Suspenze se umístí do nové sterilní

mikrozkumavky o objemu 200 μ l a neprodleně se transportuje do laboratoře. Vzorky je nutné transportovat při teplotě +2 °C až +8 °C. V případě nutnosti krátkodobého skladování (do 24 hodin) lze využít chladničku.

Obrázek 1: Průběh koprologického vyšetření matek (provedeno s využitím mikroskopických podložních sklíček).



Odběr vajíček.

Odběr probíhá v místnosti při teplotě min. 22 °C. Matky pro odběr vajíček musí být rozkladené, tedy alespoň 4 dny po počátku kladení. To se pozná podle přítomnosti prvních larviček v plástu. Matky se po vyjmutí ze společenstva umístí na odběrovou podložku podle předchozího odstavce, ale bezodkladně (nejlépe do 5 minut). Matka zpravidla naklade 2 až 8 vajíček do 10 minut (Obrázek 2). Poté je vrácena do svého společenství. Vajíčka se pomocí nové pipetovací špičky přemístí do nové sterilní mikrozkumavky o objemu 200 μ l a neprodleně se transportují do laboratoře. Vzorky je nutné transportovat při teplotě +2 °C až +8 °C. V případě nutnosti krátkodobého skladování (do 24 hodin) lze využít chladničku.

Obrázek 2: Matka v ovipozici a tři vejce nakladená v průběhu testu.



Ověření funkčnosti

Funkčnost postupu odběru výkalů a vajíček byla ověřena experimentálně. Vzorky byly odebrány na pracovišti Výzkumného ústavu včelařského, s.r.o. a neprodleně transportovány do laboratoře Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. Virová RNA byla extrahována s využitím Chemagic Viral RNA/DNA Kit (Perkin-Elmer) dle návodu výrobce. V případě extrakce nukleových kyselin z vajíček byl materiál homogenizován přímo v lyzačním pufru soupravy Chemagic Viral RNA/DNA Kit (Perkin-Elmer) pomocí skleněných rozbíjecích částic NucleoSpin® Bead Tubes Type A (Macherey-Nagel). Extrahované nukleové kyseliny byly uchovány při -80 °C do dalšího použití. Reverzní transkripce byla provedena pomocí ProtoScript® II First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs) a naředěna 3x v UltraPCR H₂O (Top-Bio). cDNA byla skladována při -20 °C. PCR byla provedena s Quick-Load® 2xTaq Master Mix (New England Biolabs). K detekci virové nukleové RNA byly využity primery specificky cílené na genom ABPV, SBV, BQCV a CBPV (Prodělalová a kol. 2017). Použitá metoda je v laboratoři VÚVeL běžně využívána k detekci virových nukleových kyselin ve vzorcích včel a dalšího biologického

materiálu včelího původu (Prodělalová a kol. 2017). Jako negativní kontroly byla využita nepoužita podložní mikroskopická skla, jejichž povrch byl opláchnut 100 µl sterilního fyziologického roztoku a podložní mikroskopické skla, jejichž povrch byl kontaminován povrchem těla a končetinami matky (matka byla ponechána po dobu 5 minut na sklíčku) a následně opláchnut 100 µl sterilního fyziologického roztoku.

Výsledky ověřovacího experimentu koprologického vyšetření souboru vzorků výkalů odebraných od 19 matek včetně popisu vzorků jsou uvedeny v Tabulce 1. Z výsledků je zřejmé, že mimo BQCV, který představuje jediný virus klinicky postihující matky, byl ve vzorcích výkalů detekován také ABPV. Ve dvou případech (10,5 %) byla ve výkalech detekována současná infekce BQCV a ABPV. Přítomnost viru v kontrolních vzorcích nebyla potvrzena.

Tabulka 1: Koprologické vyšetření matek

Vyšetřovaný virus	Vyšetřovaný materiál		
	Výkaly	Podložní sklo kontaminované povrchem těla matky	Čisté podložní sklo
ABPV	21 % (4; n=19)	nedetekováno	nedetekováno
SBV	nedetekováno	nedetekováno	nedetekováno
BQCV	31,6 % (6; n=19)	nedetekováno	nedetekováno
CBPV	nedetekováno	nedetekováno	nedetekováno
Celkem	40 % (8; n=19)	0 % (0; n=7)	0 % (0; n=2)

Dále bylo vyšetřeno 8 vzorků vajíček (2-5 vajíček pocházejících od 1 matky tvořilo 1 vzorek). U 50 %vzorků (n=4/8) byla zjištěna virová infekce, z toho u 2 matek (25 %; n=2/8) se jednalo o infekci BQCV a u 2 matek (25 %; n=2/8) se jednalo o infekci ABPV. Směsná infekce v případě vzorků vajíček nebyla detekována.

V Tabulce 2 jsou přehledně uvedeny výsledky testování vzorků výkalů, vajíček a negativní kontroly. Celkem byly otestovány tři matky. Získané výsledky poukazují na vhodnost testovat přítomnost virové RNA ve výkalech i vajíčkách současně. U vzorku 38 by v případě, kdy by byly testovány pouze výkaly, došlo k získání falešně negativního výsledku u ABPV.

Tabulka 2: Celkový virologický status matek

Matka	Vyšetřovaný materiál	Testovaný virus			
		ABPV	SBV	BQCV	CBPV
38	výkaly	-	-	+	-
	vajíčka	+	-	-	-
	kontrola*	-	-	-	-
426	výkaly	+	-	-	-
	vajíčka	+	-	-	-
	kontrola*	-	-	-	-
P1-416	výkaly	-	-	-	-
	vajíčka	-	-	-	-
	kontrola*	-	-	-	-

*oplach povrchu sklíčka kontaminovaného povrchem těla a končetinami matky
+ virová RNA ve vzorku detekována; - virová RNA ve vzorku nedetekována

Reference

Prodělalová J., Čukanová E., Moutelíková R., Titěra D. Riziko šíření včelích viróz spermatem trubců při přístrojové inseminaci matek ve včelařství. Veterinářství 2017;67(7):554-558.



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz