



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Detekce virů včely medonosné z prostředí:
Metodický postup pro stanovení přítomnosti
RNA viru deformovaných křídel získané
z voskové měli metodou RT-(q)PCR**

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

Detekce virů včely medonosné z prostředí:

Metodický postup pro stanovení přítomnosti RNA viru deformovaných křídel získané z voskové měli metodou RT-(q)PCR.

Autoři:

RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.

(Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.)

Mgr. Romana Moutelíková, Ph.D.

(Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.)

Mgr. Eliška Čukanová

(Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.)

Uvedení autoři se podíleli na vzniku metodiky se shodným podílem práce.

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. QK1910286 „Efektivní postupy a strategie pro zvládání včelích chorob a udržitelný chov včelstev“

Osvědčení o uplatnění certifikované metodiky č. SVS/2022/040662-G

Vydala: Státní veterinární správa

ISBN 978-80-7672-022-0

2022

Oponenti certifikované metodiky:

Mgr. Bronislav Šimek

Státní veterinární ústav Jihlava

MVDr. Leoš Čeleda, CSc.

Státní veterinární správa

Ústřední veterinární správa Státní veterinární správy ČR, Slezská 100/7, 120 56 Praha 2

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

č. SVS/2022/040662-G

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: **Detekce virů včely medonosné z prostředí: Metodický postup pro stanovení přítomnosti RNA viru deformovaných křídel získané z voskové měli metodou RT-(q)PCR**

Autor / autoři: **Jana Prodělalová, Romana Moutelíková, Eliška Čukanová**

Název organizace/cí: **Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.**

Místo vydání: **Brno**

Rok vydání: **2022**

Metodika byla vypracována v rámci výzkumného projektu/podpory na rozvoj výzkumné organizace č. **QK1910286**

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy:

Funkce zástupce odborného útvaru státní správy:

V Praze dne 22. 3. 2022

MVDr. Zbyněk Semerád

ústřední ředitel



Podpis/elektronický podpis zástupce
odborného útvaru státní správy

Souhlas ředitele Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:

V dne

.....
Podpis/elektronický podpis
ředitele/ředitelky Odboru vědy, výzkumu
a vzdělávání

Seznam použitých zkratk

RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce
PCR	polymerázová řetězová reakce
RT-qPCR	reverzně transkripční kvantifikační polymerázová řetězová reakce v reálném čase
DWV	virus deformovaných křídel (angl. Deformed wing virus)
<i>arp</i>	protein příbuzný aktinu (angl. Actin-related protein)
RdRp	RNA dependentní RNA polymeráza

Předmluva

Diagnostika původců viróz včely medonosné (*Apis mellifera*) je založena převážně na molekulárně-biologických metodách, z nichž převažují postupy založené na polymerázové řetězové reakci. Vstupním materiálem pro diagnostiku jsou obvykle živé dospělé včely jedné věkové kategorie, v případě úhynu lze použít i mrtvé včely. Kompletní a nepoškozené virové částice včelích virů, kdy virová nukleová kyselina je chráněna proteinovým obalem, jsou relativně odolné vůči vlivům prostředí a zejména v chladnějším období roku nedochází k rychlé degradaci virového genomu. Této vlastnosti lze využít při stanovení přítomnosti virů v měli. Vhodná je zejména zimní měl, která zůstává delší dobu v úlu a není vynesena ven. Výsledek virologické diagnostiky z měli vypovídá o kondici včelstva, kdy zejména v případě vysokých titrů viru deformovaných křídel lze předpokládat, že včelstvo je významně oslabeno.

I. Cíl metodiky

Cílem metodiky je předložit ověřený postup pro izolaci ribonukleové kyseliny (RNA) z voskové měli a následnou detekci virového genomu ve vzorcích. Metodika je zaměřena na postup zpracování vzorků voskové měli, extrakce a purifikace RNA. Získaná RNA dosahuje kvality, která je vhodná pro následné využití v diagnostické reverzně transkripční polymerázové řetězové reakce (RT-PCR). Součástí metodiky je také popis jejího ověření na souboru terénních vzorků, kde jsou uvedena doporučení pro provedení diagnostické polymerázové řetězové reakce (PCR) ve dvou různých modifikacích v závislosti na možnostech a vybavení uživatelských laboratoří. Získanou RNA je možné použít i pro detekci dalších virových patogenů, tento postup však není součástí certifikované metodiky.

II. Popis metodiky

1. Úvod

Včelí virózy představují pro včelstva jednoznačnou hrozbu. Sledování jejich výskytu by proto mělo představovat základní opatření pro maximalizaci omezení jejich škodlivého působení na

chovy včel. Vzhledem k tomu, že ne všechny viry způsobují klinické symptomy, je pro stanovení jejich přítomnosti ve včelstvu nutná analýza vzorku v laboratoři.

Pro sledování výskytu patogena v populaci, v tomto případě virů včely medonosné ve včelstvu, je možné zvolit dva zcela odlišné přístupy, pasivní a aktivní surveillance. Oba tyto přístupy jsou založené na vyšetřování včel, liší se však velmi významně ve standardizaci odebíraných vzorků. Aktivní surveillance v důsledku toho poskytuje přesnější údaje o výskytu a případně množství patogena (de Miranda et al., 2013). Pro vyšetřování přítomnosti původců včelích viróz se nejčastěji odebírají vzorky dospělých včel, které představují nejvhodnější materiál pro detekci virů díky své mobilitě a šíří i četnosti kontaktů (de Miranda et al., 2013). Z hlediska výskytu virů v orgánech včely je největší koncentrace virů detekována ve střevě. Jelikož se výskyt virů může odlišovat i vlivem stáří vzorkovaných jedinců, je vhodné v rámci jednoho experimentu shromáždit včely z jedné věkové kategorie (Van der Steen et al., 2012). Ve specifických případech je možné vzorkovat také všechna ostatní vývojová stadia včel včetně vajíček a spermatu, orgány včel, výkaly i mrtvé včely. V těchto případech je ovšem odběr často technicky komplikovaný a také transport vyžaduje specifické podmínky, jako je chlazení. Pro diagnostické účely je doporučováno odebrat v ideálním případě 200 ks jedinců, minimální množství je 50 jedinců (de Miranda et al., 2013). Vzorek včel je nutné řádně homogenizovat. Všechny výše uvedené kroky při využití voskové měli jako vstupního materiálu pro diagnostiku viróz odpadají.

2. Izolace a purifikace RNA z měli a její využití pro diagnostiku včelích viróz

2.1 Předmět působnosti a podstata metodiky

Metodický postup slouží k izolaci a purifikaci celkové RNA z voskové měli. Získaná RNA je určena pro následné zjišťování přítomnosti virového genomu metodami založenými na RT-PCR. Podstatou metody je oplach nepřečištěné voskové měli (tj. měli obsahující mimo voskových částíček také veškeré zbytky hmyzu, roztoče a další nečistoty s výjimkou všech vývojových stadií zavíječe voskového včetně pavučinek) v TRI Reagent® (Molecular Research Center, Inc., USA), což je reagentie určená k izolaci celkové RNA a v případě potřeby umožňuje též souběžnou izolaci RNA, DNA a proteinů. Vzhledem k tomu, že součástí voskové měli je také propolis, jehož pryskyřičná povaha z něj vytváří významný inhibitor enzymů používaných při RT-PCR, je potřeba RNA získanou v prvním kroku izolace dále purifikovat. V některých

případech je po prvním extrakčním kroku RNA nažloutlá až nahnědlá. Teprve po provedení druhého – purifikačního – kroku je RNA dostatečně kvalitní a vhodná k použití pro diagnostiku virů.

2.2 Potřeby a pomůcky k provedení izolace a purifikace RNA z měli

- Chladnička s rozsahem teplot +2 až +8 °C
- Hlubokomrazící box dosahující teploty alespoň -70 °C
- Laboratorní váhy s přesností minimálně 100 mg
- Třepačka s nástavcem pro zkumavky 1,5/2 ml
- Pipeta automatická s nastavitelným objemem 100 – 1000 µl
- Pipeta automatická s nastavitelným objemem 20 – 200 µl
- Centrifuga s rotorem pro mikrozukavky 1,5/2 ml (alespoň 5000 x g)
- Mikrozukavky sterilní, DNase a RNase free 2 ml (v kvalitě pro PCR)
- Stojan pro magnetickou separaci k soupravě Chemagic (Perkin-Elmer, Německo)
- UV spektrofotometr pro měření v mikroobjemech vhodný pro stanovení koncentrace a kvality DNA a RNA
- Potřebné chemikálie a soupravy včetně specifických podmínek při jejich použití k izolaci RNA z měli jsou uvedeny dále v textu.

2.3 Postup

2.3.1 Sběr a skladování vzorků měli

K vyšetření je potřeba zhruba polévková lžíce měli. Pro zaslání do laboratoře je nejvhodnější vzorek zabalit do papírového obalu. Ideální je využít metodu sběru pomocí podložky, kdy se do laboratoře odešle celá podložka zabalená v obálce. Základní podmínkou je ovšem to, aby ve vzorku měli nedošlo k odstranění částí včel nebo roztočů. Za dodržení této podmínky se u zimní měli jedná o standardizovaný vzorek s vysokou informační hodnotou. Odebírá se jeden vzorek z jednoho včelstva, směsné vzorky se nevyšetřují. 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.

2.3.2 Extrakce a purifikace ribonukleové kyseliny

- Postup využívá k extrakci RNA TRI Reagent® (Molecular Research Center, Inc., USA). Tato velmi efektivní metoda je založená na použití roztoku s obsahem fenolu a guanidinium thiokyanátu a je vhodná pro zpracování všech typů vzorků. Následuje přečištění RNA pomocí Chemagic Viral RNA/DNA Kit (Perkin-Elmer, Německo). Použité chemikálie a soupravy popsané v tomto postupu jsou doporučené a lze je v nutném případě nahradit obdobnými produkty jiných výrobců. Je ovšem nutné provést srovnání s původním postupem uvedeným v této metodice.
- K 0,1 g voskové měli navážené ve sterilní 2 ml mikrozkušavce přidat 1,2 ml TRI Reagent®. Středně intenzivně protřepávat na třepačce s nástavcem na 1,5/2 ml mikrozkušavky po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Je vhodné použít 2 ml mikrozkušavku se šroubovacím uzávěrem nebo mikrozkušavku z bezpečnostním uzávěrem, který znemožní její otevření v průběhu třepání a kontaminaci laboratoře.
- Odstředit při 5000 x g po dobu 15 minut. Supernatant získaný v tomto kroku lze krátkodobě (maximálně měsíc) skladovat v hlubokomrazicím boxu.
- Extrakce RNA se provede z 1 ml supernatantu získaného v předchozím kroku dle návodu výrobce extrakčního činidla TRI Reagent® (Molecular Research Center, Inc., USA). V posledním kroku se vysrážená RNA rozpustí ve 100 µl vody pro PCR.
- Přečištění RNA získané v předchozím kroku se provede pomocí Chemagic Viral RNA/DNA Kit dle návodu výrobce. RNA získaná v předchozím kroku se naředí PCR vodou do celkového objemu 200 µl a použije se do purifikační reakce. Finální eluce purifikované RNA se provede do objemu 60 µl. Alternativně lze využít další vhodné a na trhu dostupné soupravy založené na technologii magnetických kuliček, případně jiné technologii. Pro využití soupravy vyráběné firmou Perkin-Elmer je nutný stojan pro magnetickou separaci od téhož výrobce.
- Získanou přečištěnou RNA je nutné do dalšího použití skladovat při -80 °C.
- Kontrola koncentrace a kvality získané RNA se provede pomocí UV spektrofotometru, který umožňuje měření v mikrolitrových objemech a zároveň provede výpočty běžně udávaných hodnot. Obecně platí, že purifikovaná RNA by měla splňovat kritéria daná měřením absorbance při 230 nm (látky fenolické povahy), 260 nm (nukleové kyseliny) a 280 (proteiny) nm, resp. poměr $A^{260}/A^{280} < 2,0$ naznačuje kontaminaci proteiny a

poměr $A^{260}/A^{230} < 2,0$ naznačuje kontaminaci fenolickými metabolity. (Green and Sambrook, 2012).

- Získaná RNA vykazuje dostatečnou kvalitu pro provedení reverzně transkripční PCR ve formátu end-point i v reálném čase včetně kvantifikace. Konkrétní postup závisí na přístrojovém vybavení dané laboratoře.

III. Ověření funkčnosti certifikované metodiky stanovením přítomnosti virové RNA pomocí RT-(q)PCR a postup tohoto stanovení

1. Vzorkování včelstev

Certifikovaná metodika vychází z funkčního vzorku Technické řešení: Postup pro detekci virů včely medonosné v měli (Prodělalová a kol., 2020). Postup byl využit také v publikaci Čukanová a kol., 2020. Experimentální ověření metodiky bylo provedeno v laboratoři Molekulární epidemiologie virových nákaz VÚVeL na souboru vzorků včelstev odebraných na jaře 2021 na území celé ČR tak, aby zahrnovaly všechny okresy. Vzorkování bylo provedeno ve spolupráci s projektem COLOSS. Vzorky byly odebírány přímo včelaři, kteří byli detailně instruováni o postupu odběru včetně specifikace včelstva, balení a zaslání vzorků. Z každého včelstva byly odebrány vzorky včel a měli. Vzorky byly následně ve spolupracující laboratoři anonymizovány. Po doručení do laboratoře VÚVeL byly vzorky skladovány v hlubokomrazicím boxu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do dalšího zpracování.

2. Extrakce RNA z odebraných vzorků včel a měli

RNA ze vzorků měli byla izolována postupem uvedeným výše (viz kapitola II. Popis metodiky, 2.3 Postup). Obdobný postup byl využit také k izolaci RNA ze včel. Tento postup se odlišuje zejména zpracováním včel a není součástí certifikované metodiky. Podrobnosti o extrakci nukleových kyselin ze včel lze najít v de Miranda et al., 2013. Přítomnost a kvalita získané RNA byla ověřena spektrofotometricky.

3. Stanovení přítomnosti virové RNA metodou dvoukrokové reverzně transkripční end-point PCR

- Dvoukroková reverzně transkripční end-point PCR (dále jen RT-PCR) umožňuje provést PCR detekci více genomových cílů (tj. více druhů včelích virů) na základě jedné reverzně-transkripční reakce, což významně sníží cenu vyšetření. Na druhou stranu je tento postup méně citlivý a neumožňuje kvantifikaci viru. Reverzní transkripce je provedena pomocí ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit (New England BioLabs, Inc., USA). Pro provedení PCR je využit One *Tag*[®] Hot Start Quick-Load[®] 2X Master Mix with Standard Buffer (New England BioLabs, Inc., USA). Použité chemikálie a soupravy popsané v tomto postupu jsou doporučené a lze je v nutném případě nahradit obdobnými produkty jiných výrobců. Je ovšem nutné provést srovnání s původním postupem uvedeným v této metodice. Pro zjištění výsledku PCR se provádí agarózová gelová elektroforéza.
- **Provedení reverzní transkripce:** Pro reverzní transkripci se použije ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit dle návodu výrobce podle standardního protokolu. Do reakce se použijí oba typy oligonukleotidových primerů, tj. d(T)₂₃ i Random Primer Mix. Vzhledem k použití Random Primer Mix doporučujeme zařadit jako první krok inkubaci při teplotě 25 °C po dobu 5 minut, po které následuje inkubace při 42 °C po dobu jedné hodiny a inaktivace enzymu. Výslednou cDNA lze ředit až 10x ve vodě pro PCR, nicméně jako nejvhodnější bylo ověřeno ředění 3x (tj. k 20 μl cDNA přidat 40 μl vody pro PCR). Naředěnou cDNA je nutné skladovat v mrazničce při teplotě -20 °C. Je možné ji opakovaně rozmrazit a zamrazit.
- **Provedení PCR:** Sekvence a další informace o doporučených oligonukleotidových primerech pro detekci jsou uvedeny v Tabulce 1. Vzhledem k plasticitě genomu RNA virů je nutné sledovat případné změny v cílových sekvencích, které by mohly vést k nefunkčnosti oligonukleotidových primerů. Pro PCR se použije One *Tag*[®] Hot Start Quick-Load[®] 2X Master Mix with Standard Buffer dle návodu výrobce. Do reakce se použije 1,5 μl cDNA. Množství jednotlivých komponent (tj. cDNA a oligonukleotidové primery) PCR reakce lze optimalizovat, množství cDNA však nesmí překročit 1/10 celkového reakčního objemu.

Tabulka 1: Oligonukleotidové primery pro detekci vybraných původců včelích viróz metodou dvoukrokové reverzně transkripční end-point PCR při ověřování certifikované metodiky.

Označení	Sekvence	t_a	Cílová sekvence	Literatura
DWV A - f	GCGTGTGCAACTCGCTTC	58°C	Oblast VP2 (kapsid)	Bradford et al. (2017)
DWV A - r	TGCCTGCACCGGATTCGATAAT			
DWV B - f	GCAAGTTGGAGATAATTGTA	58°C	Oblast IRES	Moore et al. (2011)
DWV B - r	CGATACTTACATTCTCAAGAT			

t_a ... teplota annealingu

- **Provedení agarózové gelové elektroforézy:** Agarózová gelová elektroforéza se provede dle standardních postupů dané laboratoře.

4. Stanovení přítomnosti virové RNA metodou jednokrokové kvantifikační reverzně transkripční PCR v reálném čase

Jednokroková kvantifikační reverzně transkripční PCR v reálném čase PCR (dále jen RT-qPCR) je metoda umožňující kvantifikaci cílového viru. Zejména v případě viru deformovaných křídel jsou zjištěné vysoké koncentrace významným indikátorem poškození včelstva. Vzhledem k tomu, že postup PCR v reálném čase využívá mimo sekvenčně specifických primerů ještě specifickou sondu, která se váže opět na specifickou cílovou sekvenci, je tento způsob detekce mimořádně přesný. V rámci reakce probíhá v navazujícím těsném sledu reverzní transkripce a následná PCR reakce. V jedné reakci je možné detekovat několik cílů zároveň, tento postup však vyžaduje pečlivý design primerů a sond a pečlivou optimalizaci. Součástí každé amplifikační reakce je také amplifikační kontrola, která umožní zjistit případný problém s inhibicí reakce. Vzhledem k citlivosti RT-qPCR je naprosto nezbytné fyzicky oddělit prostory pro vlastní přípravu reakční směsi a následné přidávání vyšetřované RNA. Také je nutné důsledně používat negativní kontroly bez přidané RNA. Podrobnosti ohledně využití PCR metod ve výzkumu a diagnostice včelích viróz jsou dostupné v prvním dílu publikace *The COLOSS BEEBOOK: standard methods for Apis mellifera research* (Evans et al., 2013). RT-qPCR je provedena pomocí Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR Kit (New England BioLabs, Inc., USA) dle návodu výrobce, kdy kroky připojení primerů (annealing) a syntézy řetězce (elongation) jsou spojeny do jednoho kroku probíhajícího standardně při teplotě 60 °C. Amplifikační reakce byla provedena na přístroji LightCycler 2.0 (Roche) ve formátu 96-jamkových desek. Kvantifikace vytvořeného produktu pro zjištění vstupní virové nálože ve

vzorku byla realizována pomocí RNA transkriptu cílové sekvence o známé koncentraci. K přípravě RNA transkriptu byla použita souprava MEGAscript® Kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific) dle dodaného návodu výrobce. Připravená RNA se známou koncentrací byla po nařazení desítkovou řadou použita k sestavení standardní křivky a kvantifikaci cílové virové RNA ve vzorku v analýze „2nd derivative maximum“. Jako interní amplifikační kontrola byl použit včelí housekeepingový gen *arp*. Detekce genu *arp* probíhá současně s detekcí cíle na DWV genu pro RdRp ve formátu duplex. Použití housekeepingového genu je nezbytné z důvodu odhalení případné inhibice, kdy pokud je vzorek negativní ve vyšetřovaných virech i v genu *arp*, nelze jej hodnotit jako negativní a je nutné jej považovat za **nehodnotitelný**. Naopak pokud je vzorek pozitivní ve vyšetřovaných virech a negativní v genu *arp*, je považován za pozitivní pro daný cíl (**genom cílového viru přítomen**). Stejný závěr je platný pro situaci, kdy je vzorek pozitivní ve vyšetřovaných virech i v genu *arp*. Pokud je vzorek pozitivní pouze v genu *arp*, je výsledek pro daný cíl jednoznačně negativní (**genom cílového viru nepřítomen**).

Tabulka 2: Oligonukleotidové primery pro detekci vybraných původců včelích viróz metodou jednokrokové kvantifikační reverzně transkripční PCR v reálném čase při ověřování certifikované metodiky.

Označení	Sekvence	t_m	Cílová sekvence	Literatura
qDWV-F1	TTCATTAAAGCCACCTGGAACATC	56°C	RdRp	Forsgren (2017)
qDWV-R1	TTTCCTCATTAAGTGTGTCGTTGA	55°C	RdRp	
qDWV-P1	FAM-TCAAGT(Dabcyl-dT)CGGGACGCATTCCACGC	60°C	RdRp	
qDWV-F	ACGCAACCCAGGAATCC	53°C	helikáza	Bradford (2017) upraveno
qDWV-R	GTAGCTAATTTACCCAATCTTTAAA	50°C	helikáza	Bradford (2017)
qDWV-PR	FAM-CATATTACACACACCATTATAAATAATGGATACCCA	59°C	helikáza	vlastní design
Arp1-f	ATGAAGATCCTTACAGAAAGAGGA	55°C	actin-related protein 1	vlastní design
Arp1-r	CCATTTCTGTTCAAAGTCA	56°C	actin-related protein 1	
Arp1-p	Cy5-TCTTTAATGTCACGAACAATTCACG	63°C	actin-related protein 1	

t_m ... teplota tání primeru

5. Vyhodnocení funkčnosti postupu

Celkem bylo doručeno 137 vzorků včelstev, tj. 137 vzorků dospělých včel a 137 vzorků měli ve formě podložek. Z tohoto počtu bylo celkem šest vzorků vyřazeno, jednalo se vzorky, které nebylo možné analyzovat z důvodu chybného označení. Analyzováno tedy bylo 131 vzorků včelstev, tj. 131 vzorků dospělých včel a 131 vzorků voskové měli. V rámci hodnocení funkčnosti metodiky jsme k analýze vzorků využili systém pro detekci viru deformovaných křídel (DWV) metodou jedнокrokové RT-qPCR. Tento systém byl využit ze dvou důvodů. Prvním důvodem byl častý výskyt DWV ve včelstvech, kdy z celkového počtu 137 dodaných vzorků včel jich bylo 90 % pozitivních (123; n=137). Druhým důvodem je to, že metoda jedнокrokové RT-qPCR umožňuje kvantifikaci virové nálože v původním vzorku. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Testování účinnosti detekce viru deformovaných křídel z voskové měli ve srovnání s detekcí viru ve včelstvu.

Cílový gen	včely +/měl +	včely -/měl -	včely +/měl -	včely -/měl +
helikáza	91 % (119; n=131)	0,8 % (1; n=131)	3 % (4; n=131)	29 % (38; n=131)
RdRp*	37 % (49; n=131)	27 % (35; n=131)	7 % (9; n=131)	30 % (39; n=131)
oba cíle	92 % (121; n=131)	0 % (0; n=131)	3 % (4; n=131)	5 % (6; n=131)

*RdRp ... RNA dependentní RNA polymeráza

Z výsledků vyplývá, že pouze u 3 % (4; n=131) vzorků nedošlo k detekci DWV v měli, ačkoliv vlastní včelstvo vykazovalo alespoň v jednom páru primerů pozitivitu. U 5 % vzorků (6; n=131) potom byla zjištěna přítomnost DWV pouze v měli, což lze ovšem považovat za potvrzení přítomnosti DWV ve včelstvu. Voskovou měl lze proto využít k posouzení přítomnosti DWV ve včelstvu.

Dále se jednoznačně ukazuje nutnost použít při PCR diagnostice RNA virů alespoň dva různé cíle v genomu daného viru, aby se předešlo vzniku falešně negativních výsledků, což ilustruje využití systému zacíleného na RdRp.

IV. Srovnání novosti postupů

Dle našich informací nebyl tento postup doposud k detekci virů včely medonosné použit. Vzhledem k možnosti využití voskové měli na vyšetření přítomnosti kleštíka včelího a původce moru včelího plodu se toto řešení logicky nabízí. Vosková měl se odebírá v období, kdy ji včelstvo produkuje. Lze také výhodně využít zimní měl, která se také používá pro testování přítomnosti *Paenibacillus larvae*. Měl 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 částech vosku obsahuje i části těl včel, případně roztoče, kde se dá očekávat přítomnost virových patogenů. Na druhou stranu je měl 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). Tato komplikace je ovšem odstranitelná volbou vhodného postupu extrakce RNA, případně další purifikace získané RNA.

IV. Popis uplatnění metodiky a ekonomické aspekty

Popsaná metoda je určena pro využití primárně ve veterinárních diagnostických laboratořích, které se zabývají diagnostikou včelích viróz. Ekonomické aspekty metodiky nelze v dané chvíli hodnotit. Vzhledem k častému výskytu klinických onemocnění včelími viry a následným úhynům včelstev mohou informace o výskytu původce virózy ve včelstvu významně pomoci při hodnocení zdravotního stavu a kondice včelstva. Pokud by navíc byl popsán postup využít souběžně se screeningem *P. larvae* jako původce moru včelího plodu ze vzorků zimní měli, získali by včelaři doplňující údaje minimálně o přítomnosti daného viru ve včelstvu. Při použití kvantifikační PCR je potom možné zjistit i koncentrace viru v odebraném vzorku. Lze proto konstatovat, že metodika ve svém konečném důsledku může přispět k udržení dobrého zdravotního stavu včelstev, což je přínosné pro samotné včelaře díky vyšší produkci medu. Vzhledem k tomu, že hodnota jednoho včelstva se pohybuje kolem 5 000 Kč, představuje pouhé snížení míry ztráty včelstev o 0,1 % úsporu v řádech milionů korun. Zlepšení zdravotního stavu včelstev představuje prospěch také pro společnost vzhledem k významu včel jako opylovačů

V. Seznam použité literatury

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.

Prodělalová, J., Moutelíková, R., Čukanová, E. (2020). Technické řešení: Postup pro detekci virů včely medonosné z měli. Funkční vzorek. VÚVeL Brno.

Čukanová, E., Moutelíková, R., Titěra, D., Prodělalová, J. (2020). Virové paralýzy včely medonosné (*Apis mellifera*). *Veterinářství* 70(6), 376-382.

de Miranda, J.R., Bailey, L., Ball, B.V., Blanchard, P., Budge, G., Chejanovsky, N., Chen, Y.-P., Gauthier, L., Genersch, E., de Graaf, D., Ribière, M., Ryabov, E., de Smet, L., van der Steen, J.J.M. (2013) Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. In: V Dietemann, V., Ellis, J., D., Neumann, P. (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume II. *Journal of Apicultural Research* 52(4): 1-56. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.22>

Van der Steen, J.J.M., Cornelissen, B., Donders, J., Blacquiére, T., van Dooremalen, C. (2012). How honey bees of successive age classes are distributed over a one storey, ten frames hive. *Journal of Apicultural Research* 51(2): 174-178. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.51.2.05>

Evans, J.D., Schwarz, R.S., Chen, Y.P., Budge, G., Cornman, R.S., de la Rua, P., de Miranda, J.R., Foret, S., Foster, L., Gauthier, L., Genersch, E., Gisder, S., Jarosch, A., Kucharski, R., Lopez, D., Lun, C.M., Moritz, R.F.A., Maleszka, R., Muñoz, I., Pinto, M.A. (2013) Standard methods for molecular research in *Apis mellifera*. In: Dietemann, D., Ellis, J.D., Neumann, P. (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume II. *Journal of Apicultural Research* 52(4): 1-54. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.11>

Bradford, E.L., Christie, C.R., Campbell, E.M., Bowman, A.S. (2017) A real-time PCR method for quantification of the total and major variant strains of the deformed wing virus. *PLoS ONE* 12(12): e0190017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190017>

Moore, J., Jironkin, A., Chandler, D., Burroughs, N., Evans, D.J., Ryabov, E.V. (2011) Recombinants between *Deformed wing virus* and *Varroa destructor virus-1* may prevail in *Varroa destructor*-infested honeybee colonies. *Journal of General Virology* 92(1): 156-161. <https://doi.org/10.1099/vir.0.025965-0>

Forsgren, E., de Miranda, J.R., Isaksson, M., Wei, S., Fries, I. (2009). Deformed wing virus associated with *Tropilaelaps mercedesae* infesting European honey bees (*Apis mellifera*). *Experimental and Applied Acarology* 47:87-97. doi: 10.1007/s10493-008-9204-4

VI. Seznam publikací předcházejících metodice

Prodělalová, J., Moutelíková, R., Čukanová, E. (2020). Technické řešení: Postup pro detekci virů včely medonosné z měli. Funkční vzorek. VÚVeL Brno.

Čukanová, E., Moutelíková, R., Titěra, D., Prodělalová, J. (2020). Virové paralýzy včely medonosné (*Apis mellifera*). *Veterinářství* 70(6), 376-382.

VU^{Ve}L 

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