

JAK VČELAŘIT S VIRY

Přehled informací o virech včely medonosné

Jana Prodělalová

Dalibor Titěra



Jana Prodělalová

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

Dalibor Titěra

(Výzkumný ústav včelařský, s.r.o.)

JAK VČELAŘIT S VIRY

Přehled informací o virech včely medonosné

S podporou Ministerstva zemědělství ČR na
základě výsledků výzkumného projektu NAZV

QJ1510113

ISBN 978-80-88233-50-3

Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

Obsah

Úvod	3
1. Co si lze představit pod pojmem virus?	4
2. Jak se včelí viry přenáší?	5
3. Přehled nejčastěji se vyskytujících virů včely medonosné a příznaků onemocnění, které mohou vyvolávat	6
4. Jak lze výskyt viróz ve včelstvu potvrdit – laboratorní diagnostika včelích viróz	10
5. Jaká je situace v České republice	11
6. A lze vůbec něco dělat?	12
7. Přehled použité a doporučené literatury	14

Viry představují, ať už chceme nebo nechceme, neoddělitelnou součást našeho životního prostředí. Viry napadají všechny živé organismy, od jednoduchých bakteriálních buněk, řas a rostlin, přes hmyz včetně včel, až po člověka. Viry jsou původci mnoha významných onemocnění člověka i hospodářských zvířat. Virózy jsou však jen obtížně léčitelné, léčba člověka s využitím tzv. antivirotik je obvykle velmi nákladná a většinou doprovázená mnoha nepříjemnými vedlejšími účinky. U zvířat, zejména potom potravinových, potom léčba nepřichází v úvahu.

Včelí viry jsou nyní celosvětově považovány za jednu z hlavních příčin špatné kondice včelstev. Nelze ovšem v žádném případě říct, že se jedná o příčinu jedinou. Včelstva a jejich zdravotní stav jsou ovlivňována celou řadou faktorů, které se navíc obvykle vyskytují v nejrůznějších kombinacích. Mezi příčiny poklesu kondice včelstev jsou nyní řazeny parazité (zejména hemolymfu sající roztoč *Varroa destructor* a mikrosporidie rodu *Nosema*), řada patogenních mikroorganismů (viry, bakterie, plísně), kvalita matky, vliv pesticidů, výkyvy počasí, nesprávná výživa, dostupnost pastvy a v neposlední řadě nedodržování zásad správné chovatelské praxe. Některé výzkumy dokonce řadí zkušenost a vzdělání včelaře na místo nejvýznamnějšího faktoru, který zásadně ovlivňuje kondici včelstva. Některé včelí viry, konkrétně virus izraelské akutní paralýzy (IAPV), byly považovány za podezřelé v kauze syndromu kolapsu kolonií (CCD), zejména na území USA. Jedná se o jev, kdy dojde k náhlému zmizení většiny dělnic bez předchozích příznaků onemocnění. V úle nejsou přítomny mrtvé včely, naopak zásoby jsou často nedotčeny. Analýzy však neukázaly, že by zrovna tento virus byl hlavní příčinou mizení včel. Podobných virů je více a jejich určování je obtížné.

Daleko pravděpodobněji se jeví vliv poškození včelstev roztočem *V. destructor*, pravděpodobně ovšem v kombinaci s virovými infekcemi.

1. CO SI LZE PŘEDSTAVIT POD POJMEM VIRUS.

Viry jsou nebuněčné živé organizmy, které jsou ovšem schopny vlastní reprodukce pouze s využitím biochemického aparátu živé buňky. Samotný virus, přesněji řečeno virová částice, je ve srovnání s buněčnými organizmy relativně jednoduchá. Každá virová částice se skládá z nukleové kyseliny, která nese dědičnou (genetickou) informaci viru a bílkovinného obalu. Doposud bylo identifikováno přibližně 24 včelích virů. Vzhledem k rozšířenému využívání moderních diagnostických metod jsou však neustále popisovány viry nové, například včelí rhabdoviry. Proto je téměř nemožné uvést kompletní přehled včelích virů, protože jejich počet se neustále mění a lze očekávat, že se bude v blízké budoucnosti neustále navyšovat. Základní rozdělení virů včely medonosné je založené na druhu nukleové kyseliny, kterou virová částice obsahuje. Až na výjimky, které představují viry s dvouřetězcovou DNA (dsDNA), se jedná převážně o viry s jednořetězcovou RNA s pozitivní polaritou (+ssRNA). Většina klinicky významných virů patří do dvou blízce příbuzných čeledí, *Dicistroviridae* a *Iflaviridae*, náležících do řádu *Picornavirales*. Tyto viry jsou velmi často sdíleny také s jinými druhy opylujícího blanokřídlého hmyzu a některé ze včelích virů byly nalezeny například u mravenců. Je velmi pravděpodobné, že viry, které byly původně považovány za výhradně včelí, jsou daleko více rozšířeny. Přenos virů mezi různými druhy blanokřídlých je běžný, jednou z velmi pravděpodobných možností je v tomto případě sdílení navštěvovaných květů. V některých případech mohou včelí viry způsobovat

onemocnění u jiných opylovačů, v poslední době je diskutován například negativní vliv včelích virů na komerčně chované čmeláky.

2. JAK SE VČELÍ VIRY PŘENÁŠÍ.

Včelstvo, typický představitel eusociálního hmyzu, představuje těsné nahloučení mnoha včel, které jsou v neustálém těsném kontaktu, komunikují spolu a také sdílejí potravu. To je ideální prostředí pro šíření chorob, včetně viróz. U včel se viry mimo to mohou šířit mezi různými včelstvy. V zásadě rozlišujeme dva základní způsoby přenosu virů, horizontální a vertikální. V případě **horizontálního přenosu** se mohou včely nakazit **přímým kontaktem** mezi sebou nebo při péči o plod, dále při manipulaci s kontaminovanou potravou nebo případně s prostředím. Viry se také mohou šířit při odstraňování uhynulých jedinců. Vzhledem k tomu, že viry byly nalezeny v trávicím traktu i výkalech včel a také ve zdrojích potravy, nelze tento způsob přenosu opomíjet. K přímému horizontálnímu přenosu je řazen také sexuální přenos spermatem trubicí a to jak během přirozeného páření, tak při využití přístrojové inseminace. Horizontální přenos **nepřímým kontaktem** je zprostředkován pomocí přenašeče. V našich podmínkách je přenašečem (tzv. vektorem) nejčastěji *V. destructor*. K přenosu viru dochází při sání hemolymfy a dalších tkání na všech vývojových stádiích včely. Přenašečem viru však může bohužel být také sám včelař, například při sdílení včelařských pomůcek a nástrojů mezi několika stanovišti. Při **vertikálním přenosu** jsou viry přenášeny mezi generacemi, tedy z matky na potomstvo. K přenosu dochází prostřednictvím vajíček. Viry se nacházejí buď pouze na povrchu vajíčka, nebo uvnitř vajíčka.

3. PŘEHLED NEJČASTĚJI SE VYSKYTUJÍCÍCH VIRŮ VČELY MEDONOSNÉ A PŘÍZNAKŮ ONEMOCNĚNÍ, KTERÉ MOHOU VYVOLÁVAT.

Virus deformovaných křídel

Název v angličtině: Deformed wing virus

Zkratka: DWV

DWV je rozšířen na celé Zemi s výjimkou Austrálie. Má významný škodlivý vliv na kondici včelstev, zejména v přítomnosti *V. destructor*, který se také zásadním způsobem podílí na přenosu tohoto viru. Charakteristickým příznakem onemocnění, způsobeném DWV, jsou deformovaná křídla (Obrázek 1). Infekci může doprovázet také malformace končetin, zkrácený a zvětšený zadeček, případně bledé zbarvení těla. Tyto příznaky jsou pozorovatelné, pokud je virus přenesen na plod v průběhu sání *V. destructor*. Včela hyne krátce po dokončení vývoje, případně již během něj.

Obrázek 1: Vylíhlá mladuška s příznaky viru deformovaných křídel (DWV) v podobě poškozených, zakrnělých a nevyvinutých křídel.



Virus akutní obrny včel

Název v angličtině: Acute bee paralysis virus

Zkratka: ABPV

Jedná se o další z běžných virových patogenů včel. Obvykle jej nalézáme ve zdravých včelstvech, nicméně pokud je včelstvo vystaveno stresové situaci, mohou se objevit příznaky onemocnění. Mezi stresory opět řadíme *V. destructor*, jehož masivní sání často vede k rozvoji onemocnění. To se u dělnic projeví jako rychle se rozvíjející obrna doprovázená třesem a neschopností létat. Díky ztrátě chloupků se včely jeví jako černé a lesklé. Následně postižené dělnice rychle hynou. Viru akutní obrny včel jsou blízce příbuzné další dva viry, Kašmírský virus včel (KBV), který se vyskytuje zejména v Austrálii a Severní Americe; a virus Izraelský virus akutní obrny (IAPV), objevený v roce 2004 v Izraeli. Běžně je detekován také v oblastech výskytu KBV.

Virus chronické obrny včel

Název v angličtině: Chronic bee paralysis virus

Zkratka: CBPV

Onemocnění způsobení CBPV se podobá infekci virem ABPV. Typická je paralýza a abnormálním třas těla a křídel infikovaných včel, což je často doprovázeno mírným roztažením křídel a zvětšeným zadečkem. Infikované včely nejsou schopny létat a hynou za několik dní po nástupu symptomů. CBPV také způsobuje ztrátu téměř veškerých chloupků na těle včel, které mají lesklá, hladká těla tmavého zbarvení (Obrázek 2). Lze je proto vizuálně dobře odlišit od nepostižených včel. Následně infikované včely ztrácí během pár dnů schopnost létat, začnou se třást a hynou. Oba popsané typy onemocnění mohou být souběžně přítomny v jednom včelstvu. Rozsáhlá infekce může vést ke kolapsu včelstva.

Obrázek 2: Černé včely na snímku ztratily chloupky pravděpodobně v důsledku infekce CBPV.



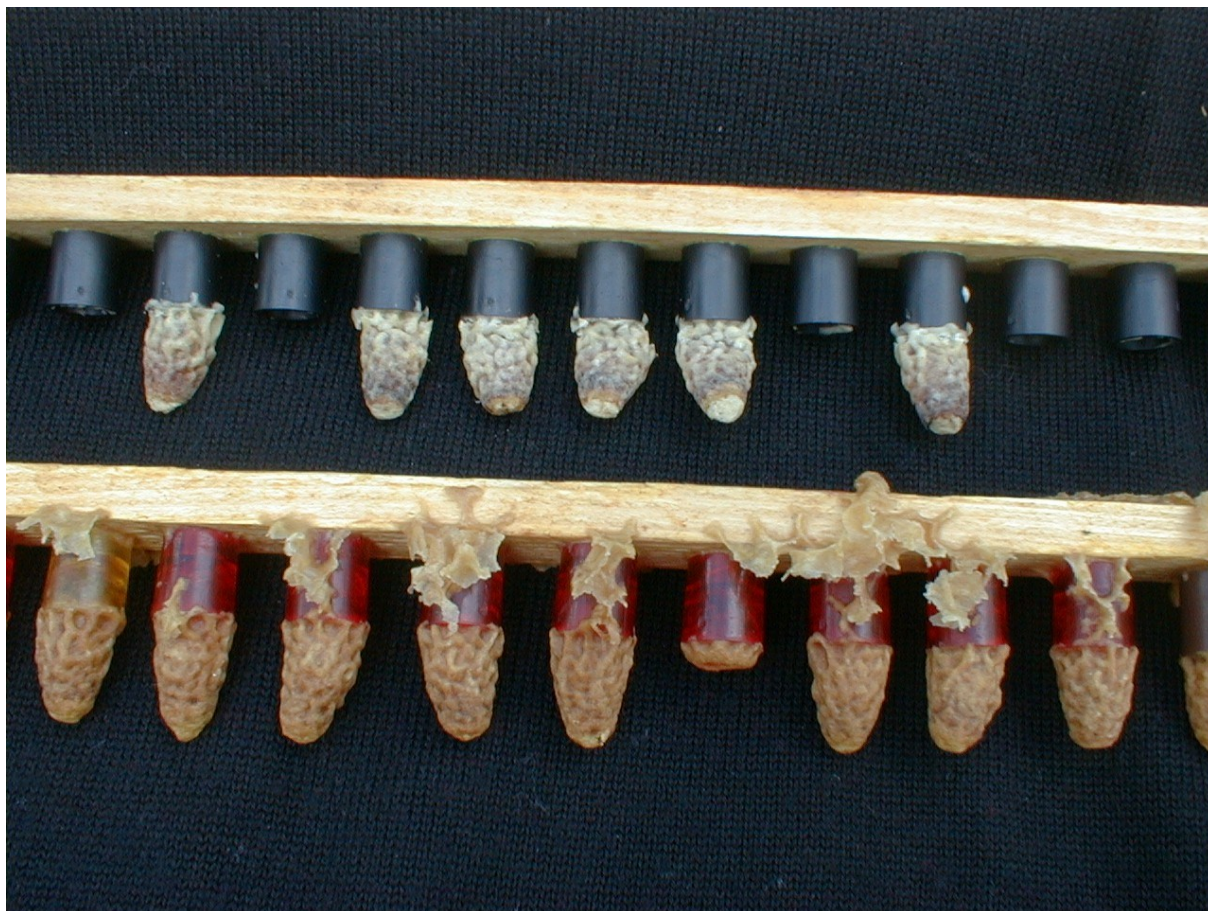
Virus černání matečnicků

Název v angličtině: Black queen cell virus

Zkratka: BQCV

Ačkoliv jej běžně nalézáme u plodu i dospělých dělnic, případně trubců, onemocnění způsobené BQCV postihuje výhradně larvy matek v matečnicích, které postupně mění barvu až na černou, u matečnicku taktéž dochází k jeho zčernání (Obrázek 3). Postižená larva se rozkládá v podobě černého příškvaru. Virus je proto hrozbou zejména pro chovatele matek. Vyskytuje se celosvětově. Velmi pravděpodobně se přenáší potravou při krmení larev.

Obrázek 3: V horní řadě jsou patrné zčernalé matečníky, které obsahují larvy matek postižené infekcí BQCV.



Virus pytlíčkovitosti plodu

Název v angličtině: Sacbrood virus

Zkratka: SBV

SBV je původcem onemocnění, známého jako viróza včelího plodu. Poněkud krkolomný název viru vznikl jako překlad z angličtiny. Zajímavostí je, že SBV byl jako původce onemocnění včel popsán již v roce 1913. Virus postihuje larvy, ve kterých se velmi rychle množí, což ve výsledku znamená jejich smrt. SBV je na larvy přenesen dělnicemi při krmení a obdobně dělnice se nakazí při odstraňování mrtvých larev a mohou virus dále přenášet. Postižená larva mění barvu z perlově bílé na hnědou a získává typický tvar gondoly nebo čínského střevíce, podle fantazie pozorovatele (Obrázek 4).

Obrázek 4: Typický vzhled larev postižených infekcí SBV.



4. JAK LZE VÝSKYT VIRÓZY VE VČELSTVU POTVRDIT - LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA VČELÍCH VIRÓZ.

V minulosti byla virologická diagnostika poměrně obtížná. Využívala velmi složitý a finančně náročný elektronový mikroskop, imunologické metody využívající protilátky, případně biologický pokus. Jako velmi výhodné se ovšem ukázalo využití nukleové kyseliny, ve které je zapsána dědičná informace každého organismu včetně virů. Přítomnost této nukleové kyseliny umíme již více než 30 let zjistit pomocí polymerázové řetězové reakce (zkracuje se jako PCR). V současné době se jedná o rychlou a relativně levnou diagnostickou metodu velmi často využívanou v mnoha oborech lidské činnosti včetně veterinární diagnostiky. PCR nám umožňuje potvrdit příčinu špatné kondice nebo dokonce úhynu včelstva. Většina včelích virů obsahuje ribonukleovou kyselinu (RNA). Jejich charakteristickou vlastností je schopnost mutovat a vytvářet společenstva virů s odlišnou genetickou informací. To může ovšem představovat problém při využití PCR, kdy takový viru nedokážeme za určitých

podmínek ve vzorku zjistit a získáme falešně negativní výsledky. Jinými slovy, ve vzorku není potvrzen ten virus, který jsme tam předpokládali, ale může tam být jiný, jen nepatrně odlišný, a výsledek vypadá stejně, jako kdyby tam nebyl žádný.

Mimo potvrzení probíhající virózy ve včelstvu nebo stanovení příčiny úhynu včelstva lze diagnostiku včelích virů využít i preventivně ke zvýšení kondice včelstev. Zejména pro šlechtitelské a rozmnožovací chovy matek je určen chovatelský postup, který slouží prokázání přítomnosti či nepřítomnosti významných včelích virových patogenů v plemenné včelí matce nedestruktivní metodou vyšetření vzorku výkalů a vajíček včelí matky.

Podrobný popis postupu, který byl vyvinut v rámci řešení projektu Ministerstva zemědělství ČR QJ1510113, je uveden v Příloze 1 (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).

5. JAKÁ JE SITUACE V ČESKÉ REPUBLICE?

Situace ohledně výskytu včelích virů je velmi proměnlivá v závislosti na čase a lokalitě. První studie analyzující výskyt virových patogenů u tuzemských včelstev ve špatné kondici proběhla v letech 2006 až 2009. Celkem bylo analyzováno 388 vzorků dělnic a plodu. U celkem 56 % vyšetřených vzorků byla prokázána přítomnost virové RNA. Nejčastěji byl detekován DWV (31 %), druhým nejvíce zastoupeným virem byl ABPV (17%), následovaly BQCV (11 %), SBV (5 %) a CBPV (3 %). Jako statisticky významný se ukázal výskyt smíšených infekcí mezi *N. apis* a BQCV, a DWV a ABPV. V roce 2014 proběhly analýzy

vzorků ze včelnic bez ztrát včelstev, včelnic s vysokými úhyny včelstev a také vzorků z již uhynulých včelstev. Nejčastěji byl opět detekován DWV (77 %), následovaly SBV, ABPV a BQCV. V uhynulých včelstvech byly detekovány smíšené infekce minimálně dvěma viry, naopak nebyl prokázán význam smíšené mezi viry a noseмами. V roce 2018 byla provedena analýza vzorků pocházejících ze čtyřiceti včelstev. DWV byl detekován u 90 % vyšetřených včelstev, což představuje nárůst oproti předchozím rokům, nicméně to mohlo být způsobenou změnou používané diagnostické metody. ABPV byl detekován u 47,5 % včelstev. V posledních dvou letech se však poměrně často objevovaly i klinické příznaky ABPV, což odráží i situaci v nárůstu včelstev, u kterých byla diagnostikována virová RNA. U 22,5 % byl potom zjištěn BQCV a u 5 % včelstev SBV. Naopak CBPV nebyl v roce 2018 nalezen ani v jednom včelstvu. To ostatně platí i pro sezóny 2015 a 2016, kdy bylo vyšetřeno odpovídající množství vzorků.

6. A LZE VŮBEC NĚCO DĚLAT?

Včelí viry jsou nepopíratelně jednou z příčin špatného zdravotního stavu včelstev, a nelze je proto opomíjet. Na současnou situaci je však potřeba nahlížet globálně a v úvahu je nutné brát všechny faktory. Ačkoliv mnohé z těchto faktorů, např. počasí, ovlivnit nelze, jedním z významných biotických faktorů je sám člověk – včelař. Ve vztahu k udržování dobré kondice včelstev je včelař faktorem naprosto zásadním. Odpovědný chovatel musí mít potřebné vědomosti i praktické zkušenosti. S tím souvisí také důsledný boj s varoázou a systematické udržování míry napadení včelstev na co nejnižší úrovni, což je pro omezení škodlivého vlivu virových infekcí zásadní. Existují postupy, pomocí

kterých může sám včelař významně koncentraci virů v prostředí snížit a omezit tak jejich šíření.

Využití účinků tepla k eliminaci virů z medných nebo cukerných zásob

K úplné likvidaci virů v plástech s cukernými nebo mednými zásobami, kde není možné aplikovat chemické dezinfekční prostředky, lze využít účinky tepla. Teplo je nejdéle známý způsob dezinfekce, který lidstvo využívá. Pro ošetření plástů se používá tzv. suché teplo, které nepoškozuje ošetřovaný materiál a zároveň má hloubkový účinek. Teplo prostupuje, pomaleji nebo rychleji, do všech druhů materiálů. Využití tepla nezatěžuje životní prostředí žádnými zbytky. Celý proces však vyžaduje řízené dávkování působení tepla.

Podrobný popis postupu využití tepla, který byl vyvinut v rámci řešení projektu Ministerstva zemědělství ČR QJ1510113, je uveden v Příloze 2 (Viry a včely: metodický postup pro dekontaminaci chovatelského zařízení a včelařských pomůcek).

Využití jodoforového dezinfekčního prostředku ke snížení virové zátěže prostředí

Dezinfekce je odstranění podstatné většiny mikroorganismů včetně virů, z prostředí, na které aplikujeme dezinfekční prostředek. Pro účely včelařství je velmi výhodné použití dezinfekčních prostředků na bázi jodoforu, které obsahují jód navázaný na vhodném nosiči. Další výhodou využití jodoforových přípravků ve včelařství je jejich silný účinek proti původci hniloby včelího plodu a schopnost snížit množství spor původce moru včelího plodu.

Podrobný popis postupu, který byl vyvinut v rámci řešení projektu Ministerstva zemědělství ČR QJ1510113, je popsán v Příloze 2 (Viry a včely: metodický postup pro dekontaminaci chovatelského zařízení a včelařských pomůcek).

Přehled použité a doporučené literatury

Tantillo, G. Bottaro, M., Di Pinto, A. et al. Virus infections of honeybees *Apis mellifera*. *Italian Journal of Food Safety* 2015,4:5364.

McMenamin, A.J., Flenniken, M.L. Recently identified bee viruses and their impact on bee polinators. *Current Opinion in Insect Science* 2018,26:120-129.

de Miranda, J.R., Gauthier, L., Ribi  re, M. et al. Honey bee viruses and their effect on bee and colony health. In: Sammataro D and Yoder JA (Eds.) Honey bee colony health: Challenges and sustainable solutions. CRC Press, London 2011:71-112.

de Miranda, J.R., Bailey, L., Ball, B. et al. Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. *Journal of Apiculture Research* 2013, 52:1-56.

Gisder, S. and Genersch, E. Viruses of commercialized insect pollinators. *Journal of Invertebrate Pathology* 2017, 147:51-59.

de Miranda, J.R. and Genersch, E. Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology* 2010, 103:48-61.

Ryba, S., Titera, D., Schodelbauerova-Traxmandlova, I. et al. Prevalence of honeybee viruses in the Czech Republic and coinfections with other honeybee disease. *Biologia* 2002, 63:590-595.

Kamler, M., Prodělalová, J., Titěra, D. Interakce patogenů včely medonosné jako příčina kolapsů včelstev. *Veterinářství* 2015, 65:453-456.

Prodělalová, J., Čukanová, E., Moutelíková, R. a kol. Riziko šíření včelích viróz spermatem trubců při přístrojové inseminaci matek ve včelařství. *Veterinářství* 2017, 67:554-558.

vanEngelsdorp, D. and Meixner M.D.A. Historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology* 2010, 103:80-95.

Roberts, J.M.K. and Anderson, D.L.A. Novel strain of sacbrood virus of interest to world apiculture. *Journal of Invertebrate Pathology* 2014, 118:71-74.

Aubert, M., Ball, B., Fries, I. et al. (Eds.). Virology and the honey bee. European Commission, Brussels 2008.

Moritz, R.F.A. and Erler, S. Lost colonies found in a data mine: Global honey trade but not pests or pesticides as a major cause of regional honeybee colony declines. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 2016, 216:44-50.

Mondet, F., de Miranda, J.R., Kretzschmar, A. et al. On the front line: Quantitative virus dynamics in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies along a new expansion front of the parasite *Varroa destructor*. *PLOS Pathogens* 2014 10:e104323.

Martin, S.J., Highfield, A.C., Brettell, L. et al. Global honeybee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science* 2012, 336: 1304-1306.

Jacques, A., Laurent. M. EPILOBEE Consortium et al. A pan-European epidemiological study reveals honey bee colony survival depends on beekeeper education and disease control. *PLOS ONE* 2017 12:e0172591.

Příloha 1

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 zkratek

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

Příloha 2



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Viry a včely metodický postup pro
dekontaminaci chovatelského zařízení
a včelařských pomůcek**

**RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.
Ing. Dalibor Titěra, CSc.**

CERTIFIKOVANÁ METODIKA č. 78

VIRY A VČELY

METODICKÝ POSTUP PRO DEKONTAMINACI CHOVATELSKÉHO ZAŘÍZENÍ A VČELAŘSKÝCH POMŮCEK

Autoři:

RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.

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

Ing. Dalibor Titěra, CSc.

(Výzkumný ústav včelařský, s.r.o.)

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. NAZV QJ1510113.

AUTOŘI

RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.

Ing. Dalibor Titěra, CSc.

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

Osvědčení o uplatnění certifikované metodiky č. j. 72084/2017-MZe-16232

Vydalo: Ministerstvo zemědělství ČR

ISBN 978-80-86895-11-6

2017

OPONENTI CERTIFIKOVANÉ METODIKY

doc. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D.

Biomedicínské centrum, Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta UK v Plzni

Ing. Petr Krejčík

Ministerstvo zemědělství ČR

Předmluva

Viry včely medonosné jsou vzhledem ke svému plošnému výskytu a negativnímu dopadu na kondici včelstev stále v centru zájmu včelařů a stále se objevují otázky týkající se možnosti snižování infekčního tlaku v prostředí. Zásadní problém je to u chovatelských pomůcek a také u plástů se zásobami, které zůstanou po úhynech včelstev. Odpověď na tyto otázky není jednoduchá zejména proto, že aktivitu dezinfekčních prostředků vůči včelím virům (tj. virucidní aktivitu) zatím nebylo možno přímo stanovit vzhledem k tomu, že se tyto viry doposud nedaří pomnožovat v laboratorních podmínkách. Tuto překážku lze ovšem vyřešit využitím vhodně zvoleného modelového viru. Velká část nejčastěji se vyskytujících včelích virů, konkrétně virus deformovaných křídel, virus pytlíčkovitosti plodu, virus černání matečnicků, viry akutní izraelské obrny, kašmírský virus) jsou zástupci rozsáhlé skupiny pikornavirů^{1,2,3}. Viry deformovaných křídel a černání matečnicků se dokonce významně podobají pikornavirům, které napadají i jiné druhy živočichů včetně člověka.^{4,5} Pikornaviry jsou obecně považovány za velmi odolné vůči vlivům prostředí včetně působení dezinfekčních prostředků. Jsou schopny dlouhodobě přetrvávat na povrchu předmětů, zejména v případě, kdy na nich jsou společně s viry navíc přítomny další organické látky (nejvýznamnější jsou v tomto ohledu bílkoviny)^{6,7}, což ve včelařské praxi zpravidla je. Pro účinné provedení zásahu proti virům je také nutné znát odpověď na otázku, jakým způsobem se včelí viry do prostředí mohou dostat. Viry jsou běžně nalézány jak ve zdrojích potravy včel, tj. v medu i pylu,^{8,9,10} tak v trávicím traktu včel a ve výkalech.^{11,12,13} Význam výkalů není z hlediska přenosu virů ještě zcela objasněn, nicméně virové částice nalezené v zásobách byly v experimentech schopné vyvolat infekci.⁸ Z výše uvedeného vyplývá, že potrava společně s aktivitami, které s ní souvisí, představuje významný způsob šíření infekce. Včelstvo samotné potom představuje společenství o vysoké hustotě jedinců, kteří jsou navíc v neustálém vzájemném sociálním kontaktu dotykovém včetně trofalaxe (předávání potravy). V prostředí úlu se tak mohou viry šířit a přetrvávat při běžných aktivitách včelstva.

I. Cíl metodiky

Cílem metodiky je předložit široké včelařské veřejnosti postup vedoucí ke snížení kontaminace pomůcek a chovatelského zařízení patogenními viry včel. Metodický postup je založen na dvou odlišných přístupech, z nichž každý je vhodný pro využití za jiných, v dalším textu specifikovaných podmínek. První přístup využívá chemický dezinfekční prostředek na bázi jodoformu (pro včelařství registrovaný přípravek Bee-Safe, původně prodáváný pod názvem Biocid 30®). Druhý přístup je založen na působení tepla.

II. Popis metodiky

1. Úvod

Dezinfekce povrchů, které byly ve styku s původcem nakažlivého onemocnění (ať už se jedná přímo o nakažená zvířata nebo povrchy znečištěné kontaktem s nimi) hraje zásadní úlohu v chovu hospodářských zvířat a je nezbytná pro zajištění jejich dobrého zdravotního stavu.¹⁴ Včelstva jsou neustále vystavována infekčnímu tlaku včelích virů, které se při vhodné kombinaci podmínek pomnoží a začnou škodit. Z různých způsobů jejich odstraňování z chovatelského zařízení, pomůcek a nástrojů přichází v úvahu chemická dezinfekce. Působení tepla se dá využít také v případě plástů s cukernými nebo mednými zásobami, kde je použití chemie omezené. Je vždy nutné myslet na to, že chemické dezinfekční prostředky mohou být, zejména při nesprávném použití, škodlivé jak pro včely samotné, tak i pro včelaře a životní prostředí. Proto je nutné brát ohled na volbu vhodné účinné látky používaného dezinfekčního prostředku.¹⁵

Jako potenciální přípravky proti mikroorganismům se nabízejí dezinfekční prostředky obsahující jodofor (tj. jód navázaný na vhodném nosiči). Jsou často využívány pro dezinfekci kůže a sliznic hospodářských zvířat i člověka a představují také vhodnou volbu v oboru včelařství. Aktivní složka těchto prostředků, tedy jód, je důležitý stopový prvek, který je nezbytný např. pro správnou funkci organismu jako součást hormonů štítné žlázy.¹⁶⁻¹⁸ Jód je navíc přirozenou součástí včelího medu.¹⁹ Další výhodou využití jodoforových přípravků ve včelařství je jejich silný účinek proti původci hniloby včelího plodu a schopnost snížit množství spor původce moru včelího plodu o dva řády.²⁰

Účinek tepla je nejdéle známý a nejlépe popsáný způsob dezinfekce v historii lidstva. Obecně lze účinek tepla rozdělit na využití suchého nebo vlhkého tepla. Pro účely tohoto metodického postupu bylo zvoleno působení suchého tepla za teploty, která nepoškodí ošetřovaný materiál. Výhodou použití suchého tepla je jeho hloubkový účinek. Teplo prostupuje, pomaleji nebo rychleji, do všech druhů materiálů. Využití tepla nezatěžuje životní prostředí žádnými zbytky. Celý proces však vyžaduje řízené dávkování působení tepla nutného pro účinnou likvidaci nežádoucích virů.²¹

Vzhledem k tomu, že doposud není dostupná laboratorní metoda umožňující testovat účinnost různých způsobů dezinfekce přímo na včelích virech, byl při testování účinků jodoforového dezinfekčního prostředku i působení tepla využit lidský enterovirus 71. Tento virus je svými vlastnostmi podobný včelím virům. Na základě laboratorních testů se navíc jedná o virus odolný vůči vlivům prostředí a působení dezinfekčních prostředků. Jedná se proto o vhodný modelový organizmus, kterým lze v laboratorních experimentech nahradit včelí viry.

Tato metodika vznikla jako jeden z plánovaných výsledků projektu MZe NAZV QJ1510113 ve spolupráci Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. a Výzkumného ústavu včelařského, s.r.o. Představuje nadstavbu k publikaci Hygiena ve včelařství (Výzkumný ústav včelařský, s.r.o., 2014) a certifikované metodice Správná praxe v chovu včel (Výzkumný ústav včelařský, s.r.o., 2015).

Vlastní metodické postupy jsou založeny na výsledcích laboratorních pokusů, přičemž experimentální podmínky byly nastaveny na základě zkušeností z včelařské praxe. Vzniku metodiky předcházelo zveřejnění výsledků pokusů v odborných časopisech (viz kapitola VI. Seznam publikací předcházejících metodice). V případě nepublikovaných výsledků jsou popis a výsledky experimentů uvedeny v příslušné kapitole (viz kapitola II.3. Ošetření medných zásob dlouhým ohřevem s účinkem proti včelím virům).

2. Dezinfekce pomůcek, nástrojů a povrchů v chovatelských zařízeních s účinkem proti včelím virům

2.1 Předmět působnosti a podstata metody

Postup slouží k provedení dezinfekce povrchů včetně nástrojů a pomůcek využívaných ve včelařské praxi za účelem odstranit z ošetřených povrchů a předmětů patogenní viry včely medonosné a zamezit tak jejich dalšímu rozšiřování. Podstatou metody je oxidační působení jódu navázaného na nosič (jodofor). Jako dezinfekční prostředek byl na základě předchozích zkušeností včelařů zvolen a testován přípravek Bee-Safe (též pod názvem Biocid 30®) výrobce Evans Vanodine International (Anglie). Před použitím dezinfekčního prostředku je vhodné, v případě silného organického znečištění nutné, provést mechanickou očistu dezinfikovaných povrchů a předmětů. Podrobné informace o nakládání s dezinfekčním prostředkem jsou uvedeny v návodu k použití. **Pokud je dezinfekční prostředek Bee-Safe využíván k zásahu proti včelím virům, je nutné jej připravit v doporučené 4% koncentraci a nechat působit 30 minut.** Na základě výsledků laboratorních testů s modelovým enterovirem 71 lze očekávat 99% účinnost dezinfekce. To je snížení množství virů přítomných na povrchu o alespoň 2 řády.

Potřeby a pomůcky

- Bee-Safe (též pod názvem Biocid 30®)
- pitná voda
- vhodné nádoby pro přípravu a použití pracovního roztoku dezinfekčního prostředku

2.2 Postup

- Podle návodu k použití připravit 4% roztok přípravku Bee-Safe (40 ml do 1 l pitné vody).

- Předměty a plochy se dezinfikují dle velikosti ponořením do dezinfekčního roztoku, postřikem (nejlépe lahví s pěnovým aplikátorem) a v případě dezinfekce velkých ploch je možné využít otření. Vždy je nutné zajistit pokrytí celého předmětu nebo plochy dezinfekčním roztokem.
- Dezinfekční prostředek se nechá působit 30 minut. Výsledek dezinfekce není ovlivněn okolní teplotou.
- Pracovní roztok je účinný, pokud je tmavě zbarvený. Po zesvětlení je třeba vyměnit ho za čerstvý.

3. Ošetření medných zásob dlouhým ohřevem s účinkem proti včelím virům

3.1 Předmět působnosti a podstata metody

Postup slouží k deaktivaci virových včelích patogenů přítomných na plástech, v medu, plástovém medu, případně v cukerných zásobách. Tím se zamezí přenosu virů z původních včelstev na další včelstva. Podstatou metody je působení teploty 50 °C na plásty se zásobami. Podmínkou úspěšnosti celého procesu je zajistit působení teploty 50 °C po dobu alespoň 24 hodin od okamžiku, kdy jsou všechny plásty na tuto teplotu prohřáty. Na základě experimentů lze očekávat, že v důsledku působení tepla po dobu dalších 24 hod dojde k poklesu množství infekčního viru o alespoň tři řády (99,9 %). Po uplynutí 48 hodin dojde k poklesu množství infekčního viru o minimálně pět řádů (99,999 %). To je velmi významné snížení počtu infekceschopných virových částic. Vzhledem k bodu tání vosku 62 °C však nesmí být překročena teplota 55 °C, jinak dojde k jejich poškození.

3.2 Potřeby a pomůcky

Zařízení vybavené nucenou cirkulací vzduchu umožňující ohřev na 50 °C po dobu alespoň 48 hodin a průběžnou kontrolu teploty. Vhodné regulační termostaty dodává např. firma Logitron, Praha. Vyzkoušená varianta je **Dixell XR60CH**. K regulátoru je možné připojit teplotní čidla PTC / NTC. Přístroje lze plně nakonfigurovat pomocí parametrů, které lze snadno naprogramovat klávesnicí nebo programovacím klíčem HOT KEY. Tato verze má navíc silnější relé pro tepelný zdroj – zatížitelnost 20A při odporové zátěži.

Topení umístíme ve spodní části komory vybavené roštem a řídicí teploměr termostatu naopak umístíme v horní pětině zařízení. Doporučuje se validace procesu pomocí vhodných datalogerů.

3.3 Postup

Pláсты se umístí do vyhřívaného prostoru. Od začátku ohřevu je nutné počítat s dostatečnou dobou ohřevu, aby došlo k rovnoměrnému prohřátí materiálu na požadovanou teplotu 50 °C. Celková doba ohřevu včetně náběhu teploty vedoucí k dosažení poklesu množství infekčních virových částí o více než čtyři řády (99,99 %) je alespoň 72 hodin.

III. Srovnání novosti postupů

Metodika byla vytvořena na základě testování dekontaminačních postupů v laboratorních testech na zcela novém modelovém systému, který využívá lidský enterovirus 71. Jedná se o virus ze skupiny pikornavirů, který se svými vlastnostmi podobá včelím virům) a buněčnou linii VERO (buňky opičích ledvin). V použitém systému byly simulovány podmínky, za kterých předpokládáme přítomnost včelích virů v chovatelských zařízeních a na používaných nástrojích a pomůckách. V případě testování účinnosti jodoforového dezinfekčního přípravku Bee-Safe byla testována jeho účinnost za simulovaného vysokého stupně proteinového znečištění pomocí přidavku bovinního sérového albuminu a telecího séra, a sacharidového znečištění pomocí přidavku medu nebo sacharózy. Znečištění materiálů určených k dezinfekci významně snižuje účinnost dezinfekčních prostředků a je častou příčinou neúspěchu vlastní dezinfekce. Proto je pro použití dezinfekčního prostředků ve specifických případech, jakým bezesporu včelařství je, mimořádně vhodné testovat přítomnost konkrétních znečišťujících látek, které se v dané oblasti běžně vyskytují.

Dále bylo testováno přežívání modelového enteroviru v přítomnosti medu s cílem zjištění teploty, která účinně inaktivuje virové částice přítomné v medu. Rovněž tato metodika byla prvně vyzkoušena a publikována v rámci projektu NAZV QJ1510113. Získané informace následně byly podkladem pro vytvoření postupu inaktivace virů v medových zásobách. Údaje o inaktivaci pikornavirů teplem nebo přípravkem Bee-Safe za podmínek znečištění organickými látkami, jejichž přítomnost může mít vliv na výsledný stupeň inaktivace virových částic a jejichž výskyt v oblasti včelařství se dá s velkou pravděpodobností očekávat, nebyly doposud známy. Podrobný popis experimentů a získaná data zájemce nalezne v odborných článcích uvedených v kapitole VI. Seznam publikací předcházejících metodice ^{22,23}.

IV. Popis uplatnění metodiky a ekonomické aspekty

Metodika přispěje k udržení dobrého zdravotního stavu včelstev, což bude přínosné pro včelaře samotné díky vyšší produkci medu a dalších včelích produktů. V případě, že chovatel včel může při

výskytu viróz touto metodikou dekontaminovat plásty se zásobami namísto jejich likvidace, uspoří materiál (vosk a zásoby) v hodnotě 1000 až 2000 Kč na jedno chované včelstvo. To představuje v ČR milionové částky ročně. Zlepšování zdravotního stavu včelstev představuje prospěch i pro společnost vzhledem k významu včel jako opylovačů. Jedno včelstvo má hodnotu kolem 5000 Kč, takže snížení míry ztrát včelstev o 0,1 % znamená úsporu 2,5 milionu korun.

Metodika je určena širokému spektru včelařů. Bude distribuována členům Českého svazu včelařů prostřednictvím časopisu Včelařství. Ostatní zájemci mohou získat metodiku u pracovníků Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. a Výzkumného ústavu včelařského, s.r.o. Metodika bude také umístěna na webových stránkách Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. (www.vri.cz). Metodika přispěje k udržení dobrého zdravotního stavu včelstev, což bude přínosné pro včelaře samotné díky vyšší produkci medu a dalších včelích produktů, navíc zlepšování zdravotního stavu včelstev představuje prospěch i pro společnost vzhledem k významu včel jako opylovačů. V případě zjištění nových významných poznatků v oblasti výzkumu včelích virů bude metodika aktualizována.

V. Seznam použité literatury

1. Manley R, Boots M, Wilfert L, Emerging viral disease risk to pollinating insect: ecological, evolutionary and anthropogenic factors. *J Appl Ecol* **52**:331-340 (2015).
2. Lefkowitz EJ, Adams MJ, Davison AJ, Siddell SG, Simmonds P, Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, The Online (10th) Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ [accessed 11 March 2017]
3. Le Gall O, Christian P, Fauquet CM, King AMQ, Knowles NJ, Nakashima N, Stanway G, Gorbalenya AE, Picornavirales, a proposed order of positive-sense single-stranded RNA viruses with a pseudo-T=3 virion architecture. *Arch Virol* **153**:715-727 (2008).
4. Škubník K, Nováček J, Füzik T, Přidal A, Paxton RJ, Plevka P, Structure of deformed wing virus, a major honey bee pathogen. *PNAS* **114**:3210-3215 (2017).
5. Spurný R, Přidal A, Pálková L, Kiem HKT, de Miranda JR, Plevka P, Virion structure of Black Queen cell Virus, a common honeybee pathogen. *J Virol* **91**:e02100-16 (2017).
6. Knowles NJ, Hovi T, Hyypiä T, King AMQ, Lindberg AM, Palansch MA, Palmenberg AC, Simmonds P, Skern T, Stanway G, Yamashita T, Zell R, Picornavirales, in *Virus taxonomy, Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*, ed. by King AMQ, Adams MJ, Carsten EB and Lefkowitz EJ, Elsevier/Academic Press, Amsterdam, pp. 835-880 (2011).

7. Prince HN, Prince DL, Principles of viral control and transmission, in *Disinfection, sterilization, and preservation, Fifth edition*, ed. by Block SS, Lippincot Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 543-471 (2001).
8. Singh R, Levitt AL, Rajotte EG, Holmes EC, Ostiguy N, vanEngelsdorp D, Lipkin WI, dePamphilis, Toth AL, Cox-Foster D, RNA viruses in hymenopteran pollinators: evidence of inter-taxa virus transmission via pollen and potential impact on non-*Apis* hymenopteran species. *PLoS ONE* **12**:e14357 (2010).
9. Chen Y, Evans J, Feldlaufer M, Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol* **92**:152-159 (2006).
10. Shen M, Cui L, Ostiguy N, Cox-Foster D, Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *J Gen Vir* **86**:2281-2289 (2005).
11. Chen YP, Pettis JS, Collins A, Feldlaufer MF, Prevalence and transmission of honey bee viruses. *Appl Environ Microbiol* **72**:606-611 (2006).
12. Hung ACF, PCR detection of Kashmir bee virus in honey bee excreta. *J Apic Res* **39**:103-106 (2000).
13. Ribiere M, Lallemand P, Iscache A-L, Schurr F, Celle O, Blanchard P, Olivier V, Faucon J-P, Spread of infectious chronic bee paralysis virus by honeybee (*Apis mellifera* L.) feces. *Appl Environ Microbiol* **73**:7711-7716 (2007).
14. Kahrs RF, General disinfection guidelines. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* **14**:105-122 (1995).
15. Johnson RM, Honey bee toxicology. *Annu Rev Entomol* **60**:415-34 (2015).
16. Durani P, Leaper D, Povidone-iodine: use in hand disinfection, skin preparation and antiseptic irrigation. *Int Wound J* **5**:376-386 (2008).
17. Khan MN, Antiseptics, iodine, povidone iodine and traumatic wound cleansing. *J Tissue Viability* **16**:6-10 (2006).
18. Fuge R, Johnson CC, Iodine and human health, the role of environmental geochemistry and diet, a review. *Appl Geochem* **63**:282-302 (2015).
19. Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P, Honey for nutrition and health: a review. *J Am Coll Nutr* **27**:677-689 (2008).
20. Kamler F, Titěra D, Kamler M, Správná praxe v chovu včel, Certifikovaná metodika, 2. doplněné vydání (2016).
21. Joslyn LJ, Sterilization by heat, in *Disinfection, sterilization, and preservation, Fifth edition*, ed. by Block SS, Lippincot Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 695-728 (2001).

VI. Seznam publikací předcházejících metodice

22. Prodělalová J, Malenovská H, Moutelíková R, Titěra D, Virucides in apiculture: Persistence of surrogate enterovirus under simulated field conditions. *Pest Management Science*, doi: 10.1002/ps.4653. Publikace je dedikována projektu QJ1510113.
23. Prodělalová J, Kyjovská A, Kulich P, Moutelíková R, Titěra D, Model pro přežívání a dezinfekci virových patogenů včel. *Veterinářství* **66**:442-446 (2016). Publikace je dedikována projektům QJ1510113 a RO0516.



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

