

# UGOTAVLJANJE PETIH VIRUSOV V ODMRLIH ČEBELJIH DRUŽINAH V LETU 2015 V SLOVENIJI

Ivan Toplak<sup>1\*</sup>, Danijela Rihtarič<sup>1</sup>, Metka Pislak Očepek<sup>2</sup>, Alenka Jurič<sup>3</sup>, Anita Vraničar Novak<sup>3</sup>, Ivo Planinc<sup>3</sup>, Lidija Matavž<sup>3</sup>, Mira Jenko Rogelj<sup>3</sup>, Martina Škof<sup>3</sup>, Suzana Skerbiš<sup>3</sup>, Vida Lešnik<sup>3</sup>, Vlasta Jenčič<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, <sup>2</sup>Inštitut za patologijo, divjad, ribe in čebele, <sup>3</sup>Nacionalni veterinarski inštitut, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

ivan.toplak@vf.uni-lj.si

V letu 2015 smo v 197 vzorcih odmrlih čebeljih družin izvedli ugotavljanje prisotnosti petih čebeljih virusov, kar je največja tovrstna študija izvedena v enem letu pri nas. Zbiranje in testiranje vzorcev je bilo prvič izvedeno v okviru letne Odredbe. V 94,31% zbranih vzorcev odmrlih čebel smo ugotovili nukleinsko kislino vsaj enega do petih čebeljih virusov. Z metodo RT-PCR smo nukleinsko kislino virusa črnih matičnikov (BQCV) dokazali v 85,79%, virusa deformiranih kril (DWV) pa v 56,35% vzorcev. Virus akutne paralize čebel (ABPV) smo ugotovili v 26,4%, virus kronične paralize čebel (CBPV) v 12,69% in virus mešičkaste zalege (SBV) v 5,58% pregledanih vzorcev. Prav gotovo je bila pomanjkljivost izvedene študije ta, da nismo zajeli vzorcev odmrlih čebeljih družin od februarja do aprila, na splošno pa ugotavljamo, da se opisana klinična slika v čebelji družini stopnjuje s številom ugotovljenih virusov v vzorcu in ob prisotnosti varoje. Virusne okužbe čebel so pogoste in prispevajo k izgubam čebeljih družin.

Ključne besede: čebelji virusi; dokazovanje; RT-PCR; odmrle čebelje družine; čebela

## Uvod

Medonosna čebela (*Apis mellifera*) s svojo oprasovalno funkcijo omogoča ohranjanje raznovrstnosti rastlinstva v naravi ter igra pomembno vlogo v kmetijstvu, saj zagotavlja višje donose pridelkov nekaterim kulturnim rastlinam. Čebelarstvo ima v Sloveniji dolgo tradicijo in je zaradi pridobivanja številnih čebeljih pridelkov tudi pomembna gospodarska panoga. Kranjska čebela (*Apis mellifera carnica*) je naša avtohtona vrsta in spada med zaščitene vrste ter je zato pod posebnim varstvom v naši državi. Čebelja družina je neprestano izpostavljena različnim dejavnikom in spremembam v okolju, na katere se mora prilagajati. Neposredno je izpostavljena tudi številnim parazitom in škodljivcem ter patogenim mikroorganizmom, kot so pršice, virusi, bakterije in protozarne bolezni. Kljub veliki sposobnosti regeneracije čebelje družine pa različni dejavniki pogosto privedejo do propada ene ali večjega števila čebeljih družin v čebelnjaku. V študiji pojavljanja šestih čebeljih virusov med leti 2007 in 2009 smo dokazali prisotnost virusa akutne paralize čebel (ABPV) v 40%, virusa črnih matičnikov (BQCV) v 83,3%, virusa kronične paralize čebel (CBPV) v 18,3%, virusa deformiranih kril (DWV) v 70%, Kašmirskega virusa (KBV) v 1,7% in virusa mešičkaste zalege (SBV) v 8,3% od prizadetih čebeljih družin (1). Študija ugotavljanja prisotnosti petih čebeljih virusov, ki smo jo izvedli v letu 2010, je potrdila prisotnost od enega do petih čebeljih virusov v skoraj vseh pregledanih vzorcih (2). Spremljanje pojavljanja čebeljih virusov v 18 panjih preko celotne sezone je pokazalo, da so virusi najmanj pogosto prisotni pri zalegi, sledijo panjske čebele, najpogosteje pa jih

ugotovimo pri pašnih čebelah (3). Zaradi tega so pašne čebele tudi najpogosteje uporabljen vzorec pri ugotavljanju virusnih okužb čebeljih družin (1, 2, 3, 4, 5). Namen testiranja je bil ugotoviti pogostost pojavljanja posameznega virusa v čebelji družini, prav tako pa sočasno zbrati podatke o pojavljanju klinične slike in prisotnosti varoje.

## Material in metode

V dogovoru z Upravo za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (UVHVVR) smo v letu 2015 v okviru 29. člena Odredbe od meseca aprila do decembra 2015 zbrali 197 vzorcev čebel mrtvic (od 10 do 30 mrtvic iz brade ali panja) ali varoj ali vzorcev odmrle čebelje zalege. Vzorce so odvzeli v klinično prizadetih čebelnjakih specialisti Nacionalnega veterinarskega inštituta s posameznih regionalnih enot, za vse pregledane vzorce smo izdali poročila in rezultate posredovali UVHVVR preko sistema CIS-EPI-LIMS.

Vzorce smo homogenizirali in izolacijo RNA izvedli s komercialnim kompletom (QIAamp® viral RNA Mini, Qiagen Nemčija) po navodilih proizvajalca. Za izvedbo RT-PCR smo pripravili reakcijsko mešanico z reagenti kompleta QIAGEN® OneStep RT-PCR tako, da smo zmešali vodo, RT-PCR pufer, dNTP mešanico, par začetnih oligonukleotidov za specifični dokaz ABPV, BQCV, CBPV, DWV in SBV, kot je bilo predhodno opisano (5). Rezultate za posamezni vzorec smo ovrednotili glede na prisotnost specifične velikosti produkta RT-PCR.

## Rezultati

Po visokem odstotku ugotovljenih pozitivnih vzorcev odstopata dva virusa, in sicer smo nukleinsko kislino virusa BQCV dokazali v 85,79% vzorcih, sledi virus DWV s 56,35% ugotovljenih pozitivnih vzorcev. Virus ABPV smo ugotavljali v 26,4% pregledanih vzorcev, virus CBPV v 12,69% vzorcev, nukleinsko kislino virusa SBV pa smo dokazali v 5,58% vzorcev. V 94,31% vzorcev smo potrdili prisotnost od enega do štirih čebeljih virusov. V 30,96% vzorcev smo ugotavljali prisotnost ene vrste čebeljega virusa, v 36,04% sočasno prisotnost dveh vrst čebeljih virusov, v 21,82% prisotnost treh vrst virusov, v 4,5% smo potrdili sočasno prisotnost nukleinske kisline štirih vrst virusov. Večje število virusov smo v vzorcih prizadetih čebeljih družin ugotavljali skupaj s hkratno prisotnostjo varoje.

## Razprava

Ugotavljanje petih čebeljih virusov je bilo v letu 2015 prvič izvedeno v okviru letne odredbe, zajelo pa je 197 vzorcev, kar je največja tovrstna študija izvedena v enem letu pri nas. V okviru izvedenih testiranj na pet čebeljih virusov smo vse vzorce čebel prvič sprejeli preko CIS-EPI-LIMS in tako tudi uvedli in preizkusili sistem za poročanje rezultatov za te vrste vzorcev. Pri posameznih čebeljih virusih ugotavljamo podobne odstotke, kot že pri predhodno izvedenih študijah, le da so odstotki ugotovljenih virusov tokrat nekoliko nižji, kar gre pripisati tudi poznemu začetku zbiranja vzorcev, šele z začetkom aprila. Primerjava rezultatov s prejšnjimi študijami pa kažejo, da so virusne bolezni v čebeljih družinah stalno prisotne, z značilnim odstotkom za posamezno vrsto virusa, najvišje za BQCV in DWV, sledi ABPV, CBPV in SBV. Prav gotovo je pomanjkljivost izvedene študije ta, da nismo zajeli vzorcev odmrlih čebeljih družin tudi že od februarja do aprila. To je obdobje, ko zaznavamo prizadetost in ugotavljamo uspešnost prezimitve čebeljih družin, vsekakor bi zato bilo potrebno s študijo nadaljevati vsaj še eno leto, da bi dobili celotno sliko virusnih okužb pri čebelah.

## Reference

1. Toplak I, Rihtarič D, Jamnikar Ciglencečki U, Hostnik P, Jenčič V, Barlič Maganja D. Detection of six honeybee viruses in clinically affected colonies of carniolan gray bee (*Apis mellifera carnica*). *Slov. Vet. Res.* 2012; 49: 89-96.
2. Toplak I, Zabavnik Piano J, Pislak Ocepek M. Ugotavljanje prisotnosti petih *čebeljih* virusov v vzorcih obolelih *čebeljih* družin v letu 2010. Ljubljana: Nacionalni veterinarski inštitut, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, November, 2010. 48 str.
3. Jamnikar Ciglencečki U. Preučevanje virusnih okužb pri kranjski *čebeli* (*Apis mellifera carnica*): doktorska disertacija. Ljubljana 2013, 173 str.
4. Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M. Prevalence and seasonal variations of six honey-bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70: 7185-7191.
5. Toplak I, Rihtarič D, Pisak Ocepek M et al. Poročilo o ugotavljanju petih *čebeljih* virusov v *čebeljih* družinah v letu 2015 v Sloveniji. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, Nacionalni veterinarski inštitut, 2016. 17 str.

## Determination of five viruses in dead honeybee colonies in 2015 in Slovenia

In 2015 the study for the presence of five honeybee viruses has been carried out on 197 samples of dead bee colonies, which is the largest number of samples tested in one year in the country. The collection and testing of samples were for the first time performed within the annual decree. A nucleic acid of at least one to five honeybee viruses were detected in 94,31% of the collected samples of dead bees. RT-PCR demonstrated nucleic acid of the black queen cell virus (BQCV) in 85,79% and deformed wing virus (DWV) in 56,35%, the acute bee paralysis virus (ABPV) in 26,4%, the chronic bee paralysis virus (CBPV) in 12,69% and the sacbrood bee virus (SBV) in 5,58% of samples. The shortcomings of the study is that it was not able to collect samples of dead bee colonies from February to April, but in general, we find that the clinical picture described in the bee family increases with the number of viruses detected in the sample and in the presence of varroa. Viral infections are common in honeybees and contribute to the losses of bee colonies.

Key words: Honeybee viruses; detection; RT-PCR; dead bee colonies; honeybee