



**UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
DEPARTMAN ZA VETERINARSKU MEDICINU**

**DOKAZIVANJE PRISUSTVA VIRUSNIH INFEKCIJA
U ZAJEDNICAMA *APIS MELLIFERA* PRIMJENOM
MOLEKULARNO-BIOLOŠKIH METODA**

Doktorska disertacija

Mentor: Prof. dr Branislav Lako

Kandidat: mr Violeta Santrač

Novi Sad, 2013. Godine

UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

MENTOR

Dr Branislav Lako, redovni
profesor , Poljoprivredni fakultet,
Univerzitet u Novom Sadu

ČLANOVI KOMISIJE

Dr Nada Plavša, vanredni
profesor, Poljoprivredni fakultet,
Univerzitet u Novom Sadu

Dr Bosiljka Đuričić, redovni
profesor, Fakultet veterinarske
medicine, Univerzitet u Beogradu

DATUM ODBRANE

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET**

Ključna dokumentacijska informacija

Redni broj : RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Mr Violeta Santrač
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Branislav Lako, redovni profesor
Naslov rada: NR	Dokazivanje prisustva virusnih infekcija u zajednicama <i>Apis mellifera</i> primjenom molekularno-bioloških metoda
Jezik publikacije: JP	Srpski
Jezik izvoda: JI	Srpski/Engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2013.
Izdavač: IZ	autorski print
Mesto i adresa: MA	Univerzitet u Novom Sadu Poljoprivredni fakultet Trg Dositeja Obradovića, 8. 21000, Novi Sad
Fizički opis rada: FO	10 poglavlja / 144 strane / 20 tabela / 12 grafikona / 6 mapa / 28 slika / 133 reference
Naučna oblast: NO	Medicinske nauke
Naučna disciplina: ND	Veterinarska mikrobiologija i zarazne bolesti životinja
Predmetna odrednica, ključne reči:	Virusi pčela, <i>Apis mellifera</i> , RNK ekstrakcija, RT-PCR

PO	
UDK	565.79:578. 24:577. 2:001.8
Čuva se: ČU	Biblioteka, Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu
Važna napomena: VN	Nema
<p>Izvod: IZ</p> <p>Dokazivanje virusnih infekcija pčela od velikog je interesa za pravilnu procjenu odnosa između domaćina i potencijalnog patogena. Do izrade ove doktorske teze, na teritoriji Bosne i Hercegovine nije bilo proučavanja koja bi dokaz virusnih infekcija pčela dovela do mogućnosti kliničke procjene patološkog odnosa za eko-genotip prilagođene pčelinje zajednice. Evolucijski adaptirani virusi medonosne pčele <i>Apis mellifera carnica</i>, sa stanovišta veterinarske entomologije, veterinarske virusologije i infektivnih bolesti, te saznanja veterinarskog servisa uopšte, nisu bili dovoljno prepoznati. Pojava i dostupnost molekularnih dijagnostičkih metoda omogućile su senzitivno i specifično dokazivanje dijela genoma virusa koji inficiraju pčelinje zajednice.</p> <p>Iz ekstrahovanih uzoraka templatata različitih uzoraka homogenizata slučajno uzorkovanih pčela, RNK, sa jednim parom prajmera za svaki virus, pojedinačno, redoslijedom: BQCV, DWV, SBV, ABPV, KBV, CBPV urađeni su amplifikacijski protokoli i dobijeni rezultati za klasičan, <i>end point</i>, RT-PCR.</p> <p>Ovom doktorskom disertacijom dobijeni su prvi rezultati koji se odnose na utvrđivanje prisustva i raširenosti virusnih infekcija kod vrste <i>Apis mellifera</i> u pčelinjacima Bosne i Hercegovine. Od oko dvadeset virusa koji inficiraju pčele i pčelinje zajednice, metodama primjenjive molekularne dijagnostike u ovoj doktorskoj tezi dokazivali smo prisustvo virusnih infekcija za šest najviše proučavanih virusa pčela. Dobijeni rezultati dokazali su prisustvo pet od šest traženih virusa sa različitim kombinacijama koinfekcija te raznolikom prostornom distribucijom virusa.</p> <p>Poznavanje složenih mehanizama virusnih infekcija pčelinjih zajednica neophodnost je koja sa novim saznanjima proglašava neke od virusa <i>emergentnim patogenima</i>, koji bitno narušavaju opstanak pčelinje zajednice. U patološko-sinergističkom odnosu sa nametnikom pčelinje zajednice <i>Varroa destructor</i> neki pčelinji virusi uzroci su globalno registrovanih gubitaka. Dio istraživanja u radu odnosio se na terensko proučavanje dinamike prisustva grinje <i>Varroa destructor</i> u pčelinjim zajednicama.</p> <p>Za pravilno donošenje suda o uzroku ugibanja pčelinjih zajednica, pored postojećih zahtjeva kontrole patogena pčela definisanih procedurama dijagnostičkog manuala i Koda OIE-a, bilo bi potrebno imati i rezultate kojim bi se dokazalo kvalitativno i kvantitativno prisustvo virusa kod vrste <i>Apis mellifera</i>.</p> <p>Uvođenje i standardizacija molekularno-bioloških metoda u rutinskoj dijagnostici virusnih bolesti pčela je opravdano. Samo je pitanje vremena kada će virusne infekcije pčela biti predmet rutinske dijagnostike kojim se kontroliše zdravstveni status pčelinje zajednice.</p>	

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	23.12.2010.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: KO	<p>Dr Branislav Lako, red.prof za užu n.o. Veterinarska mikrobiologija i zarazne bolesti životinja, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>Dr Nada Plavša, vanredni profesor za užu n.o. Bolesti životinja i higijena animalnih proizvoda, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p> <p>Dr Bosiljka Đuričić, red. prof za užu n.o. Epizootiologija zaraznih bolesti, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF AGRICULTURE**

Key word documentation

Accession number : ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph.D Thesis
Author: AU	Mr Violeta Santrač
Mentor: MN	Branislav Lako Ph.D, Professor
Title: TI	Detection of viral infections in communities of <i>Apis mellifera</i> using molecular-biological methods
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2013.
Publisher: PU	Authors reprint
Publication place: PP	University of Novi Sad Faculty of Agriculture Trg Dositeja Obradovića, 8. 21000, Novi Sad
Physical description: PD	10 chapters / 144 pages / 20 table / 12 graphs / 6 maps / 28 pictures / 133 references
Scientific field: SF	Medical sciences
Scientific discipline: SD	Veterinary microbiology and infectious animal diseases
Subject, Key words: SKW	Bee virusis, <i>Apis mellifera carnica</i> , RNK extraction, RT-PCR
UC	565.79:578. 24:577. 2:001.8
Holding data: HD	Library, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture

Note: N	None
<p data-bbox="229 331 375 407">Abstract: AB</p> <p data-bbox="229 465 1369 878">Evidence of viral infection of bees is of great interest for the proper assessment of the relationship between host and pathogen potential. By making this doctoral thesis on the territory of Bosnia and Herzegovina, where before was no present study of evidence of viral infections, lead to ability on clinical evaluation of pathological relations for eco-genotype adapted colonies. Evolutionarily adapted viruses honeybee <i>Apis mellifera</i>, from the veterinary entomology, veterinary virology and infectious diseases, and knowledge of the veterinary services in general, have not been recognized enough. The appearance and availability of molecular diagnostic methods have allowed sensitive and specific detection part of the genome of the virus that infects the colonies.</p> <p data-bbox="229 896 1369 1070">Templates were extracted from samples of different patterns, homogenisate, randomly sampled bees, RNA, with a pair of primers for each virus, respectively, in the order: BQCV, DWV, SBV, ABPV, KBV, CBPV amplification protocols were done and the results obtained by conventional, end point, RT -PCR.</p> <p data-bbox="229 1088 1369 1406">This doctoral dissertation obtained the first results concerning the determination of the presence and spread of viral infections in the species <i>Apis mellifera</i> in Bosnia and Herzegovina. From about twenty viruses that can infect bees and hives using diagnostic methods applicable in this doctoral thesis we demonstrate the presence of viral infections of six most studied viruses of bees. The obtained results showed the presence five of the six essential viruses in forms of co-infection with different combinations and varied virus spatial distribution.</p> <p data-bbox="229 1424 1369 1697">Awareness of the complex mechanisms of viral infections in colonies is that the new knowledge proclaimed a virus as "emergent pathogen" that significantly impairs the survival of honeybee colonies. The pathogenic synergistic relationship with the parasite <i>Varroa destructor</i> causes that bee viruses are globally listed as reasons for losses. Part of the research work was related to the field study of the dynamics of the presence of <i>Varroa destructor</i> mites in honey bee colonies.</p> <p data-bbox="229 1715 1369 1890">For a accurate judgment of the deaths of bee colonies, in addition to existing requirements bee pathogen control procedures defined by diagnostic Manuals and Code of the OIE, it would be necessary to have the results to prove the qualitative and quantitative presence of the virus in the species <i>Apis mellifera</i>.</p> <p data-bbox="229 1908 1369 2033">The introduction and standardization of molecular biological methods in routine diagnosis of viral diseases of bees is justified. It is only a matter of time before the virus infections of bees will be subject to routine diagnostics which controls the health of bee colonies.</p>	

Accepted on scientific board on: AS	23.12.2010.
Defended: DE	
Thesis Defend board: DB	<p>Dr Branislav Lako, Full professor , Scientific discipline Veterinary microbiology and infectious animal diseases, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, menthor</p> <p>Dr Nada Plavša, Associate professor,. Scientific discipline Animal disease and hygiene of animal products, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture</p> <p>Dr Bosiljka Đuričić, Full professor , Scientific discipline Epizootiology of infectious disease, Faculty of veterinary medicine, University of Belgrade</p>

Zahvalna sam svima koji su u dobroj volji bili na putu:

Brendi Ball, Rothamsted Research, UK;

Michaelu Embreyju, Apiculture Extension, University of Maryland, USA;

APCU – Jedinici za koordinaciju poljoprivrednih projekata Republike Srpske;

dr Jeffu Pettisu, Bee Research Lab, USDA, Maryland, USA;

dr Judy Chen, Bee Research Lab, USDA, Maryland, USA;

Michaelu Hamiltonu, Bee Research Lab, USDA, Maryland, USA;

prof. dr Bosiljki Đuričić, Fakultet veterinarske medicine u Beogradu;

Uni-Prof. Dr Norbertu Nowotnyju, Institute of Virology, University of Veterinary Medicine, Wien;

dr Tamàsu Bakonyiju, Institute of Virology, University of Veterinary Medicine, Wien;

saradnicima u COST FA 8003, COLOSS WG1, WG2;

Savezu udruženja pčelara Republike Srpske – SUPRS;

Kancelariji za veterinarstvo, Bosna i Hercegovina;

saradnicima JU Veterinarski institut Republike Srpske „Dr Vaso Butozan“ Banja Luka;

doc. dr Nadi Plavša, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu;

prof. dr Dragi Nediću, JU Veterinarski institut Republike Srpske „Dr Vaso Butozan“ Banja Luka;

mentor, prof. dr Branislavu Laki, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu,

mojoj porodici;

Tvorcu Svega.



Treba znati da ono što mi ispitujemo nije priroda sama po sebi, nego priroda koja je izložena našem metodu ispitivanja.

Hajsenberg

SADRŽAJ

UVOD.....	8
PREGLED LITERATURE	10
SKRAĆENICE.....	10
O VIRUSIMA UOPŠTE.....	11
TAKSONOMIJA VIRUSA PČELA	12
VIRUSNA PATOGENEZA.....	18
KLASIFIKOVANI VIRUSI PČELA	25
<i>Virus deformisanih krila, Deformed wing virus (DWV)</i>	26
<i>Virus hronične paralize pčela, Chronic bee paralysis virus (CBPV)</i>	29
<i>Virus mješinstog legla, Sacbrood virus (SBV)</i>	33
<i>Virus akutne paralize pčela, Acute Bee Paralysis virus (ABPV)</i>	37
<i>Kašmirski virus pčela, Kashmir bee virus (KBV)</i>	38
<i>Virus crnog matičnjaka, Black Queen Cell Virus (BQCV)</i>	39
<i>Virus egipatske paralize pčela</i>	39
<i>Virus spore paralize pčela, Slow bee paralysis virus (SBPV)</i>	39
NEKLASIFIKOVANI VIRUSI	40
<i>Apis mellifera filamentozni virus (AmFV)</i>	40
<i>Pčelinji X (BVX) i pčelinji Y virus (BKY)</i>	41
<i>Virus zamućenih krila, Cloudy Wing Virus (CWV)</i>	42
<i>Pčelinji iridescetni virus, Apis iridescentni virus, (AIV)</i>	42
<i>Arkanzas pčelinji virus (ABV)</i>	43
<i>Berkeley virus (BBPV) i Macula like virus</i>	43
NEKE OSOBINE VIRUSNIH INFEKCIJA PČELA.....	44
PREVALENCIA I EPIZOOTIOLOGIJA VIRUSA PČELA	46
VIRUSNE INFEKCIJE U CENTRIMA ZA PROIZVODNJU MATICA	49
DIJAGNOSTIČKE METODE U DOKAZIVANJU VIRUSNIH INFEKCIJA PČELA	51
<i>Klinička slika</i>	52
<i>Mikroskopska identifikacija virusa</i>	54
<i>Serološke metode dokazivanja virusa</i>	54
<i>Metode molekularne dijagnostike virusa pčela</i>	54
MEĐUNARODNI PROJEKTI KOJI SU ZA CILJ IMALI VIRUSNE INFEKCIJE PČELA KAO PREDMET GLOBALNOG ISTRAŽIVANJA (2005–2012).....	59
<i>Brave projekat</i>	59
<i>COLOSS projekat – prevencija gubitaka pčelinjih zajednica, EU COST FA 0803 (2008–2012)</i>	60
<i>Projekat u Republici Srpskoj vezan za proučavanje virusa kod vrste A. mellifera (2006) u selekcijsko reproduktivnim centrima</i>	61
RADNA HIPOTEZA, CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA.....	63
RADNA HIPOTEZA	63
CILJEVI I ZADACI	63
PLAN RADA.....	64
METODE I UZORCI ISTRAŽIVANJA.....	65
<i>Metode</i>	65
<i>Uzorci</i>	65
<i>MJESTA I LABORATORIJE VEZANE ZA IZRADU TEZE</i>	65
<i>METODE STATISTIČKE OBRADJE PODATAKA I OSTALIH RELEVANTNIH PODATAKA</i>	65

OBRAZLOŽENJE O POTREBAMA ISTRAŽIVANJA.....	65
MATERIJAL I METODE RADA	67
<i>Uzorci materijala Apis mellifera za ispitivanje prisustva virusa namijenjeni za rad u Bee research laboratory, Maryland, USA</i>	<i>67</i>
<i>Uzorci Apis mellifera za ispitivanje prisustva virusa namijenjeni za obradu na Veterinarskom fakultetu u Beču, Austrija</i>	<i>68</i>
<i>Uzorci Apis mellifera slučajno odabranih pčelinjaka sa teritorije Bosne i Hercegovine u ispitivanju na moguće prisustvo izraelskog soja virusa akutne patalize pčela (IABPV).</i>	<i>71</i>
<i>Uzorak za kontrolu prisustva Varroa destructor</i>	<i>72</i>
<i>Metode rada na dokazu virusa BRL, 2006, USA</i>	<i>72</i>
<i>Metode rada Beč 2007–2008</i>	<i>78</i>
<i>Kontrola prisutnosti soja IABPV</i>	<i>87</i>
<i>Terenska ispitivanja kao primjer ocjene nivoa infestacije</i>	<i>87</i>
REZULTATI.....	89
REZULTATI O ISPITIVANJU ŠEST NAJČEŠĆIH VIRUSNIH PATOGENA IZ UZORAKA SELEKCIJSKO-REPRODUKTIVNIH CENTARA U REPUBLICI SRPSKOJ	89
<i>Rezultati uzoraka za kontrolu kvaliteta ekstrakcije RNK.....</i>	<i>91</i>
<i>Rezultati o integritetu ekstrahovanih RNK.....</i>	<i>92</i>
<i>Rezultati o dobijenoj sekvenci virusa BQCV</i>	<i>93</i>
REZULTATI ISPITIVANJA POJAVNOSTI PET NAJČEŠĆIH VIRUSNIH PATOGENA IZ UZORAKA PČELA SLUČAJNO IZABRANIH PČELINJAKA U BIH.....	93
<i>Rezultati Arc GIS 10.0 ESRI obrade podataka</i>	<i>99</i>
REZULTATI DOKAZA IAPV	104
REZULTATI TERENSKIH ISPITIVANJA KAO PRIMJER OCJENE ZNAČAJNOSTI NIVOVA INFESTACIJE SA V. DESTRUCTOR	105
<i>Efikasnost tretmana i pad Varroae</i>	<i>111</i>
DISKUSIJA	113
ZAKLJUČCI	132
LITERATURA.....	133

UVOD

Medonosna pčela je najznačajniji oprašivač biljnih kultura širom svijeta. Ovaj aspekt po svemu prevazilazi druge ekonomske koristi koje savremeno pčelarstvo ima kroz proizvodnju meda, propolisa, matične mliječi, voska, pčelinjeg otrova.

U toku dugog evolucionog perioda postojanja, insekti, a samim tim i vrste medonosne pčele, *Apis mellifera*, pokazale su vrlo uspješne oblike prilagođavanja, tako da su naselile skoro sve teresterialne biotope. Posljedično tome, ove vrste bile su izložene uticajima različitih patogena.

Moderno pčelarstvo, ekonomski održivo, jeste način organizovane proizvodnje ove vrlo specifične grane stočarstva. U tom smislu, povoljna epizootiološka situacija pčelinjaka predstavlja važan činilac u intenzivnom i uspješnom razvoju pčelarstva. Jedan od problema koji bitno utiče na razvoj pčelarstva u cijelom svijetu jesu bolesti pčela, od kojih prvenstveno treba spomenuti virusne, bakterijske i gljivične infekcije, te naročito nametničke parazitoze izazvane *Varroa destructor* vrstom.

Sa zdravstvenog i ekonomskog aspekta, značajnu opasnost predstavljaju virusne infekcije pčela za koje se smatra da su već odavno dostigle razmjere panzootije. Kako je kliničku sliku virusnih infekcija nemoguće prepoznati u terenskim uslovima, one, nažalost, forenzičko-dijagnostički budu pogrešno pripisane bakterijskim i dugim infekcijama, a epilog njihovog prisustva su značajne ekonomske štete koje rezultiraju smanjenjem broja i jačine pčelinjih zajednica.

Virusne infekcije su danas veliki izazov kako za pčelinju zajednicu tako i za veterinarski servis. *Varroa destructor* je glavni razlog zašto su virusne infekcije pčela postale ozbiljan problem i za divlje i za „tehnologijom domestifikovane“ pčelinje zajednice. Prelazak *Varroae* sa azijske pčele *Apis ceranae* na evropsku pčelu *Apis mellifera* u prvoj polovini dvadesetog vijeka i kasnije širenje na veliki broj teritorija svijeta ima za rezultat gotovo katastrofalne posljedice. Najveći rizici destruktivnog djelovanja parazitske grinje jesu u prenosu virusa pčela.

Uticaj virusnih infekcija na medonosnu pčelu je značajan. Iako ga OIE u svom Priručniku za dijagnostiku, kao ni u dijelu Zakona ne spominje, sve je više informacija o tome kako bi podatke o virusnim infekcijama pčela i njihovom uticaj trebalo revidovati u oba ona dijela kojim se regulišu značajni patogeni pčela, kao i u

važecem zakonodavstvu u međunarodnoj trgovini. Nacionalno zakonodavstvo kojim se reguliše problematika pčelinjih bolesti ni u jednom dijelu ne spominje virusne infekcije pčela.

Skorija terenska istraživanja prisustva pčelinjih virusnih infekcija u svijetu dokazala su da jedinke pčelinje zajednice, kao i kompletne zajednice mogu biti pogođene teškim formama infekcije. Razvoj infekcije uslovljen je mnogobrojnim faktorima koji su u stanju na neki način konvertovati uzročnika i izazvati manje ili više patogene forme bolesti. Drugim riječima, pčelinja društva mogu nositi virus i nemati nikakve štetne posljedice, a da, pod određenim uslovima, infekcija postane fatalna na nivou cjelokupnog društva. Za mnoge pčelinje viruse stepen patogenosti je još uvijek nedovoljno proučen. Virusi spadaju u grupu najjednostavnijih parazitarnih formi široko zastupljenih i uvijek spremnih za adaptaciju na nove uslove, uključujući i one koje je stvorio čovjek, pčelar. Prisustvo nametnika, grinje, *Varroa destructor* vrste, usložilo je uslove i načine virusne transmisije, što je dramatično promijenilo značaj evolucijski prisutnih virusnih infekcija kod pčela.

Varroa virus destruktivni sinergizam jedan je od najviše proučavanih mehanizama kojim se nastoje objasniti veliki gubici pčelinjih zajednica u cijelom svijetu.

Problem koji izazivaju virusi pčela je značajan i zahtijeva odgovarajuća istraživanja u pravcu razumijevanja i kontrole infekcije.

Cilj izrade ove disertacije posvećen je dokazivanju prisustva virusnih infekcija pčelinjih zajednica na teritoriji Bosne i Hercegovine, metodama molekularne dijagnostike te mogućnostima praktične aplikacije metode u određivanju zdravstvenog statusa medonosnih pčela.

PREGLED LITERATURE

Skraćenice

Radi jednostavnijeg korištenja naziva, naslova i drugih taksonomskih odrednica, u tekstu disertacije korištene su skraćenice koje se, s obzirom na dominantno literaturno navođenje i njihovo ishodište u međunarodnoj stručnoj literaturi (kao i u domaćoj), označavaju na sljedeći način:

ABPV – *Acute Bee Paralysis virus* – virus akutne paralize pčela

BQCV – *Black Queen Cell virus* – virus crnog matičnjaka

CBPV – *Chronic bee paralysis virus* – virus hronične paralize pčela

CCD – *Colony Colapse Disorder* – sindrom iznenadnog nestanka pčelinjih zajednica

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

DWV – *Deformed wing virus* – virus deformisanih krila

IABPV – *Israeli acute paralysis virus* – izraelski virus akutne paralize pčela

ICTV – *International Comitte of Taxonomy of Viruses* – Međunarodni komitet za taksonomiju virusa

KBV – *Kashmir bee virus* – kašmirski virus pčela

OIE – *The World Organisation for Animal Health* – Svjetska organizacija za zdravlje životinja

RNK – ribonukleinska kiselina

RT-PCR – reverzno transkribovana polimeraza lančana reakcija

SBPV – *Slow bee paralysis virus* – virus spore paralize pčela

SBV – *Sacbrood virus* – virus mještinastog legla

O virusima uopšte

Virusi su invazivni biološki agensi koji se mogu umnožavati samo unutar ćelija živog domaćina. Na osnovu ICTV popisa iz 2005, prepoznato je više od 6000 virusa klasifikovanih u 1950 vrsta i u više od 391 različite diferencirane taksativne grupe (CM Fauque, 2005). Virusna evolucija proučava se u dijelu evolucione biologije i vrlo je složena i važna sa aspekta epidemiologije virusnih bolesti. Većina virusa, a posebno oni RNK, imaju kratko generacijsko vrijeme i relativno visok nivo mutacija koji, kada mu se pridoda i faktor prirodne selekcije, dozvoljava virusu da se brzo prilagodi i adaptira na uslove domaćina.

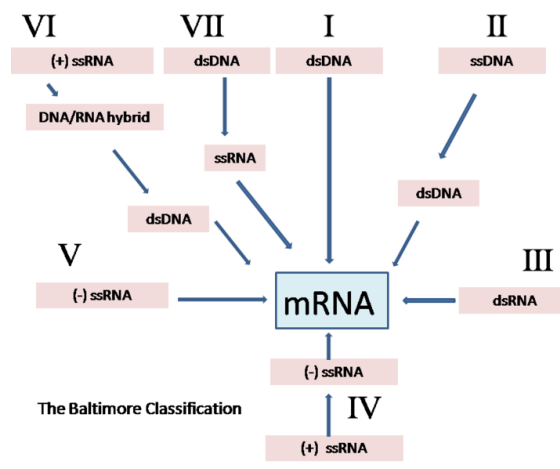
Za razliku od većine živih sistema, virusi se ne razmnožavaju diobom. Nakon prodora virusne čestice, ćelija domaćina je primorana da proizvede hiljade identičnih kopija virusa. Građa virusna sastoji se iz tri osnovna dijela: genetskog materijala (DNK ili RNK), proteinskog omotača koji čuva gene kao dijelove genetske informacije, i omotača koji štiti dvije prethodne komponente onda kada se virus nalazi u spoljašnjoj sredini. Virus je sasvim zavisan od mogućnosti njegove reprodukcije u ćelijama domaćina. To znači da on iskorištava domaćina na način da mora napraviti ravnotežu između vlastite maksimalne reprodukcije koja mora da bude izbalansirana na način da se opstanak domaćina, kao i virusa ne ugrozi njihovom vlasitom smrću. Ovaj balans različit je za svaki virus i zavisi od tzv. *strategije virusne transmisije*. Mali broj virusa će izazvati bolest koja dovodi do destrukcije domaćina, većina njih adaptirana je na neki manje destruktivan koegzistencijski odnos sa njihovim domaćinom. Virusi su u stanju da se vrlo lako adaptiraju na izmijenjene uslove, što ima efekta u odnosu na njihovu transmisionu efikasnost ili na pojavu novih transmisionih puteva, što je zapravo centralna karakteristika kojom se mijenja i utiče na virusni patogenitet. Virus prodire u ćeliju domaćina procesom endocitoze (čemu prethodi receptorsko prepoznavanje površine ćelije), nakon čega se virus reprodukuje u citoplazmi. Replikacija genoma, translacija i organizacija nastalih partikula visoko su koordinirani procesi i kojem učestvuju kompleksi virusnih i proteina domaćina, adekvatno uvezanih u fizičkom prostoru i ponekad obuhvaćenih zajedničkom membranom. Ove infektivne partikule najčešće se vide intracelularno elektronskom mikroskopijom. Ovako organizovane partikule budu oslobođene u spoljašnjost najčešće kao posljedica oštećenja ćelije – ćelijske smrti.

Taksonomija virusa pčela

Taksonomija virusa pčela ima za cilj procesuiranje informacija koje slijede različita pravila sa zadatkom razvoja, optimizovanja i održavanja postojeće virusne taksonomije. Zadatak taksonomije uopšte jeste kategorizacija velikog broja utvrđenih virusa u jednostavne klasifikacione šeme na osnovu kojih je moguće utvrditi njihove evolucionarne zavisnosti i njihovu individualnu filogenezu.

Klasifikacija virusa je postupak imenovanja virusa i njihovog taksonomskog pripadanja. Taksonomija virusa uopšte, svih vrsta, napravljena je na bazi dvije različite međunarodne klasifikacije.

Baltimor klasifikacija napravljena je od strane autora Davida Baltimorea i grupiše viruse na kategorije i na familije zavisno od građe njihovog genoma (DNK ili RNK), kao i načina njihove replikacije. Baltimor klasifikacija virusa temelji se na metodi sinteze virusne mRNA i dijeli se kao na slici ispod.



Slika 1. Baltimor virusna klasifikacija u odnosu na sintezu virusne mRNK

(http://en.wikipedia.org/wiki/Virus_classification)

Većina virusa pčela koji su RNA građe po Baltimor klasifikaciji spadaju u Picornaviridae, ss IV.

Druga klasifikacija za viruse je ICTV klasifikacija. ICTV je tijelo osnovano od strane Međunarodne unije mikrobioloških društava, čiji je zadatak razvoj, poboljšanje i održavanje univerzalne virusne taksonomije. Virusna klasifikacija počinje na nivou reda i prati imenovanje kako se navodi u nastavcima u kurzivu: red (*-viraes*), familija (*-viridae*), potfamilija (*-virinae*), rod (*-virus*), vrsta (*spp.*).

ICTV, tj. Međunarodni odbor za taksonomiju virusa, započeo je rad na klasifikaciji i imenovanju virusa u ranim sedamdesetim godinama 20. vijeka. Taj rad traje i danas. Virusi se uglavnom klasifikuju na osnovu fenotipskih karakteristika, morfologije, vrste nukleinske kiseline, načina replikacije u organizmu domaćina, te zavisno od tipa bolesti koje uzrokuju. Vrsta je i u ovom slučaju osnov za svaku biološku klasifikaciju. Trenutna taksonomija virusnih bolesti pčela data je od strane International Committee of Taxonomy of Viruses (ICTV) www.ictvonline.org, a bazira se na poznavanju naučno-bioloških pristupa, koji su posljedica evolucije naučnih saznanja razvoja virusa, izmjena i divergencije unutar nekog vremena. Klasifikacioni i taksonomski odnos prema oblasti virusnih bolesti pčela pridonose boljem razumijevanju ovih organizama i omogućavaju da se na osnovu utvrđene taksativne nomenklature ostvare zajednički prepoznatljivi nazivi za različite viruse. Zadaci ICTV-a su:

1. razviti međunarodno prihvaćenu taksnomiju,
2. razviti međunarodno prihvaćena imena za virusne takse, uključujući vrste i subviruse uzročnika (subviralne agense),
3. obezbijediti održavanje indeksa svih imena virusa

Virusi pčela nalaze se u dijelu podgrupe *Invertebrate*. Podjela virusnih imena bazirana je na tzv. specijesnom konceptu, gdje je specijes najniži taksom (grupa u razgranatoj hijerarhiji virusnih taksi). Virusni specijes se definiše kao politetična klasa virusa (nema univerzalne, standardne ni fiksne definicije) koji čine replikativnu vezu i zauzimaju određene ekološke niše.

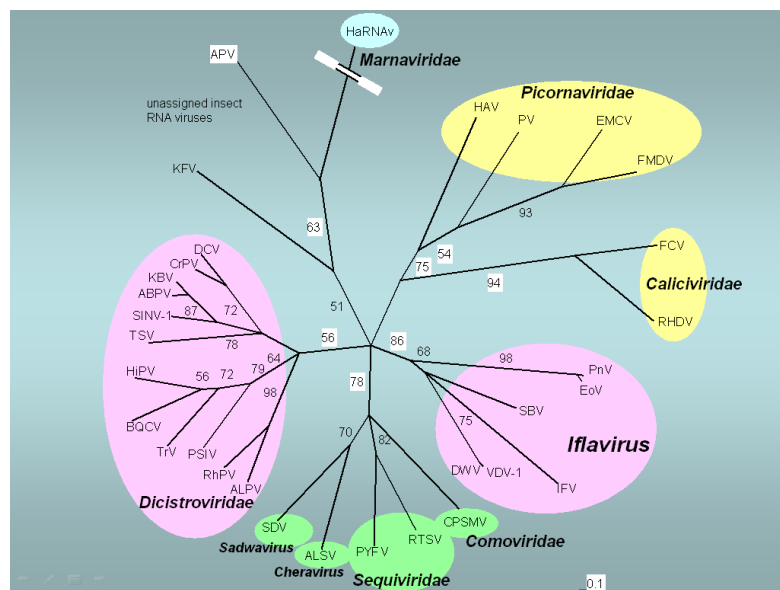
Virusi su prozvod biološke evolucije genetike, a odnos virusnih specijesa predstavlja prvu liniju odnosa između biologije i logike.

Virusi (uključujući virusne izolate, sojeve, varijante, tipove, suptipove, itd.) trebalo bi, kad god je to moguće, da budu označeni kao članovi određenog virusnog specijesa, iako su mnogi virusi ostali neklasifikovani zbog toga što su nedovoljno karakterisani (tako da veliki broj virusa pčela nije definitivno karakterisan).

Svi virusni specijesi moraju biti reprezentovani bar jednim virusnim izolatom, ali treba reći da je izolacija virusa pčela više nego komplikovana. Taksnomoska pravila propisuju hijerarhniju u prepoznavanju virusnih taksi: red – familija – potfamilija – rod – vrsta, i samo na ovaj način klasifikovane taksnomoske jedinice prepoznaje ICTV. Drugi način grupisanja od *clade* (*clade* = grupa organizama, kao npr. *species*, čiji članovi dijele homologne karakteristike koje su dobili od zajedničkog pretka) do

superfamilije, mogu služiti samo kao korisne deskriptivne informacije pod određenim uslovima, ali ne mogu biti formalno prepoznate niti priznate.

Na sličan način, naziv „kvazispacijes“, iako sa sobom nosi značajan pristup, još uvijek nema prepoznat taksnonomski značaj. Nastajanje ili nestajanje, preimenovanje ili preklasifikacija jednog virusnog specijesa, genusa familije, zahtijeva dozvolu i pristanak svih članova ICTV-a.



Slika 2. Taksonomska struktura reda Picornvirales (RNK virusa insekata), iz knjige *Virus taxonomy, deveti izvještaj ICTV*.

Saznanje nukleotidnih sekvenci revolucionarizovalo je biologiju i umnogome racionalizovalo taksnomoske odnose te je najveći broj novih virusa određen i genetski karakterisan primjenom molekularnih metoda. Poredak nukleinskoacidnih sekvenci je njihov identitet, odrednica za demarkaciju specijesa i kriterijume unutar jednog roda, dok su i druge biološke karaktersitike (pripadnost domaćinu, serotip itd.) takođe značajni. Taksonomija virusa pčela utvrdila je do sada samo osam virusnih specijesa koji su pri tom i genetski karakterizovani. Granica u utvrđivanju specijesa odnosi se na tzv. demarkacione kriterijume za vrstu:

- prirodna zastupljenost u odnosu na vrstu,
- da li je sekvencionalna podudarnost identiteta iznad ili ispod 90%.

Najveći dio virusa pčela klasifikovan je u familije *Dicistroviridae* i *Iflaviridae*, reda *Picornavirales* (Le Gall et al., 2008). Ostali virusi su pripali grupi neklasifikovanih virusa.

RED: *PICORNAVIRALES*

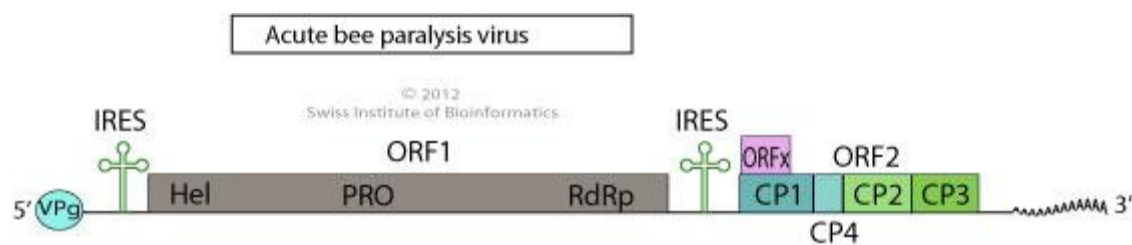
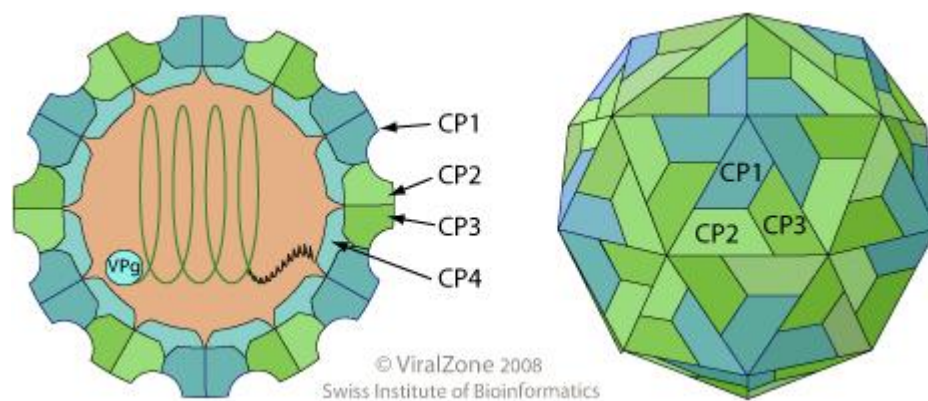
FAMILIJA: *DICISTORVIRIDAE*

ROD: *Cripavirus*:

- *Black Queen Cell virus (BQCV)*

ROD: *Aparavirus*:

- *Acute Bee Paralysis (ABPV)*
- *Israel acute paralysis virus (IAPV)*
- *Kashmir bee virus (KBV)*



Slika 3. Grafički prikaz ABPV: *ViralZone Swiss Institute of Bioinformatics*,
www.expasy.org/viralzone

Prema sličnosti u organizaciji i ekspresiji genoma, oni su:

- monopartitni, biscistronični +ssRNA genomi (jednostruka zavojnica),

- replikacija u citoplazmi,
- iksoedralni virioni, veličine oko 30 nm,
- nestrukturalni proteini kodirani su sa pozicije 5' (ORF 1),
- intergenski region (IGR) je u formi stem-loop strukture,
- (IRES) *Internal ribosomal entry site region* se nalazi unutar IGR,
- kapsidni poliprotein kodiran je na region 3' strane (ORF 2),
- prirodno visokovarijabilni sa više od 15% razlika između glavnih varijanti unutar svakog virusa ili virusnog kompleksa.

Demarkacija unutar rodova vrši se na osnovu:

- razlika u konzervacionim sekvencama na nivou IGR-IRES,
- različitog broja zavoja na poziciji 3' IGR-IRES,
- filogenetskih analiza određenih aminokiselinskih sekvenci koje su prekursori kapisoidnih kiselina.

RED: *PICORNAVIRALES*

FAMILIJA: *IFLAVIRIDAE*

ROD: *Iflavirus*:

- *Sacbrood virus (SBV)*
- *Deformed wing virus (DWV)*
- *Kakugo virus (KV)*
- *Varroa Destructor virus – 1 (VDV)*

Ovi virusi do sada su utvrđeni samo kod beskičmenjaka. Sličnosti gorenavedenih sa *Picornia*, *Marna*, *Seqvividae* su u tome što su oni:

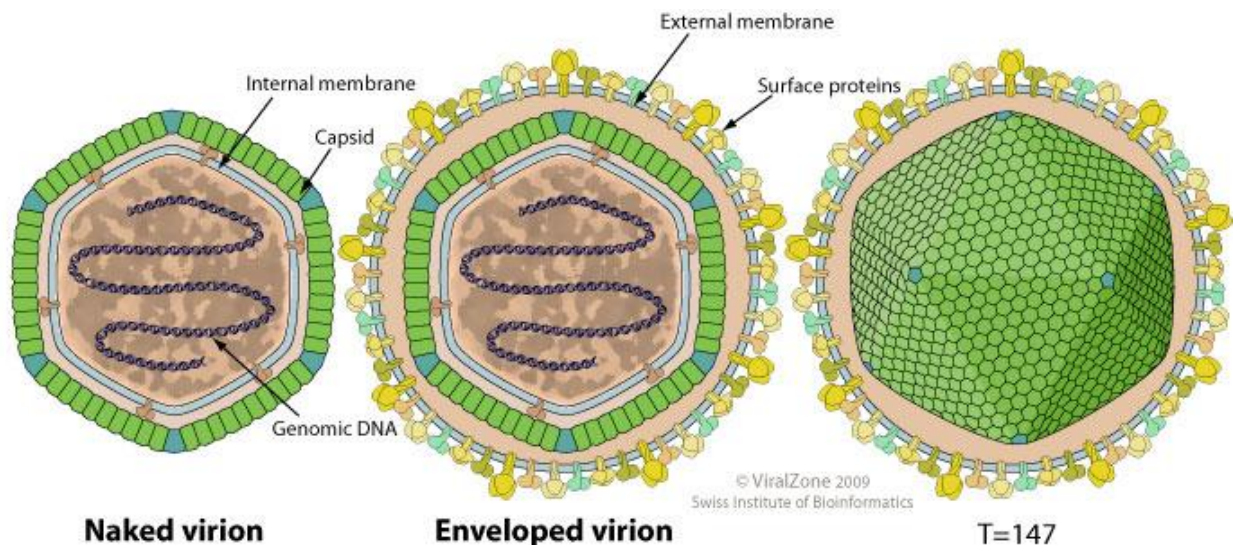
- monopartitni, monocistronični +ssRNK genom,
- kapsidni poliprotein se kodira sa regiona na pozicij 5', a nestrukturalni proteini kodiraju se na regionu 3',
- što imaju genski regulisanu proizvodnju helikaza, proteaza i polimeraza,

a razlike u odnosu na ostale familije su u tome što je raspored gena koji regulišu strukturalne proteine različit u odnosu na *Picornaviridae*.

NEKLASIFIKOVANI ODNOSNO NEOZNAČENI VIRUSI PČELA

Ovo su virusi za koje do danas ne postoje sekvencioni podaci:

- virus spore paralize pčela (SBPV),
- virus hronične paralize pčela (CBPV),
- virus zamućenih krila (CWV),
- Arkansas pčelinji virus (ABP),
- Berkley pčelinji virus (BPV),
- pčelinji virus X (BXV),
- pčelinji virus Y (BYV),
- egipatski pčelinji virus,
- filamentozni virus,
- pčelinji iridescetni virus (AmFV).



Slika 4. ViralZone: Pčelinji iridescetni virus AmFV

Swiss Institute of Bioinformatics www.expasy.org/viralzone DNK, AmFV, Iridovirus

Dosadašnje filogenetske analize poslužile su kao baza za trenutno prihvatljivu taksonomsku klasifikaciju većeg broja „picorna sličnih“ virusa. Filogenetske analize su omogućile stvaranje modela na osnovu kojih se evaluira evolucionni proces ovih mikroorganizama. Relativno visok nivo razlika na nivo sekvenci utvrđen je unutar ova dva roda, što implicira jako dugačku i evolucijski nezavisnu genezu ova dva roda unutar sadašnjih prirodnih domaćina. Neke primjere u vezi sa taksonomskim

nejasnoćama (virusne varijante u odnosu na nove vrste) takođe je moguće dokazati. Znanja o genetskim vrijednostima i filogenetskim relacijama virusa pčela umnogome su unaprijeđena zahvaljujući dijagnostici molekularne genetike u posljednjih 20-ak godina. Koncept kvazispicijesa u odnosu na RNK viruse dozvoljava da se opišu i razumiju neobičajne molekularne heterogenosti unutar RNK virusne populacije. Da bi se objasnila potencijalna kvazispicijesna priroda virusa pčela, moraju se pronaći određene genetske varijante unutar pojedinačno inficiranog organizma – u ovom slučaju unutar samo jedne pčele i unutar cijele pčelinje zajednice. Filogenetske analize ili geografska različitost izolata, iako značajni, ne mogu dati odgovor na pitanje o postojanju kvazispicijesa (Moore et al., 2011). U isto vrijeme, označiti novu vrstu virusa koji se razlikuje samo na nivou nukleotida (uz činjenicu da RNK virusi zbog svojih mutacija unutar nekih populacija nastoje stvoriti filogenetski bliske varijante, tzv. *mutant spektre*.) u ispitivanju jednog inficiranog organizma nebi bilo moguće. Ne treba zaboraviti da se koncept virusnih kvazispicijesa označava u odnosu na divlji tip kao definisan genom sa specifičnom nukleotidnom sekvencom.

Analize genoma bile su neophodan alat u razvoju vrlo preciznog deskriptivnog taksonomskog sistema. Veliki broj genetskih informacija pomogao je uspostavljanju taksonomskih jedinica unutar velike grupe tzv. „neklasifikovanih malih RNK virusa beskičmenjaka“ i „*picorna* sličnih virusa“. Šest pomenutih pčelinjih virusa – SBV, BQCV, ABPV, KBV, DWV, KV sada su klasifikovani u dva odvojena roda, zajedno sa virusima ostalih insekata.

Posmatranjem filogenetskog stabla zaključeno je da postoji veoma visoka različitost odnosno diverzitet unutar pčelinjih virusa: dugačke odvojene grane BQCV i SBV u stablu dokaz su da ova dva virusa imaju dugotrajnu evolucionarnu udaljenost sa zajedničkim precima i da su se vjerovatno adaptirali na njihove domaćine jako davno.

Virusna patogeneza

Medonosna pčela, po literaturnim saopštenjima autora, može biti domaćin za 18 dokazanih virusa (Allen and Ball, 1996; Bailey and Ball, 1991). Od virusa koji mogu inficirati pčele u SAD pronađeno je 10 virusa (Allen and Ball, 1996). Izuzimajući filamentozne pčelinje viruse, svi virusi pčela imaju jednostranu RNK 20–30 nm u prečniku, izometrijski su oblikovani, nenukleirani, a posjeduju gustoću u CsCl u obimu 1,33–1,42 gr na ml i 100–190 S koeficijent (Bailey, 1976).

Dugotrajan koevolutivni odnos pčela i njihovih virusa uticao je na visok nivo adaptacije koji djelimično može biti objašnjen činjenicom da pčelinji virusi kod svog domaćina vrlo često izazivaju inaparentne latentne infekcije.

Picorna virusi, koji inficiraju i kičmenjake, pokazuju mnogo veću bliskost, odnosno sličnost, u odnosu jedan na drugoga. Naravno, to je normalno, jer je evolucionarna istorija vertebrata kraća nego invertebrata, pa je, posljedično tome, odnos virus–domaćin u evoluciji započeo mnogo ranije. Na drugom mjestu postoji i evolucionarna separacija unutar pčelinjih virusa. Bliža genetska srodnost vidi se kod različitih virusnih vrsta, npr. ABPV/ KBV, ili DWV/ KV. Ovo je dokaz „skorašnjih“ izmjena u divergentnosti virusa iako selektivni pritisak još nije dovoljno dobro prepoznat.

Bolesti pčela bili su predmet interesovanja još u periodu Aristotela (384–322 p.n.e.). (*Honey bee pests, predators and diseases*, 1997). Uzimajući u obzir značajnu genetsku povezanost i veliku gustoću unutar zajednice, medonosne pčele ugrožene su od strane relativno malog broja bolesti. Neki specifični patogeni i paraziti koji napadaju odrasle jedinke, larve i lutke adaptirali su se na pčelinju zajednicu i u mogućnosti su izazvati njeno potpuno uginuće. Za razliku od njih, drugi patogeni mogu biti prisutni u latentnim formama infekcije i njihov uticaj na zajednicu nije lako predvidjeti. Neke infekcije dovode do kolapsa zajednice, dok druge, iako letalne na nivou jedinke, mogu biti manje virulentne i patogene na nivou zajednice. Poznavanje virusa avertebrata šezdesetih godina prošlog vijeka prije pojave *Varroa* vrste na evropskoj pčeli *Apis mellifera* bilo je vrlo površno (Allen and Ball, 1966). Procjenjujući različitost i broj invertebratnih vrsta, broj prepoznatih virusa do tada je bio vrlo mali. Genetske informacije o ovim virusima bile su takođe ograničene.

Viruse pčela je nemoguće razlikovati na osnovu njihovih morfoloških karakteristika. Virusni kod pčela postoje u perzistentnoj i inaparentnoj formi, uz vrlo čest izostanak kliničkih simptoma bolesti (Bailey, 1976). Vrlo je teško identifikovati pčelinje virusne infekcije bazirano samo na terenskim ispitivanjima, tj. kliničkim opservacijama. Na osnovu sadašnjih saznanja, virusne bolesti unutar pčelinje zajednice prenose se na dva osnovna načina: horizontalnom i vertikalnom transmisijom. Veći broj virusa pčela može se umnožavati i širiti nezavisno, samo rijetko izazivajući teške forme bolesti. Češće opstaju u košnicama naizgled zdravim, iako su one inficirane sa nekoliko različitih virusa. Virusni kod pčela su veoma česti, a ima ih mnogo više nego svih ukupno

poznatih pčelinjih patogena. Shodno tome, virusi su vjerovatno u najvećem broju slučajeva bili osnovni uzrok greške u razmatranju dijagnoze, a samim tim i u odnosu prema menadžmentu bolesti. To se najbolje može objasniti na primjeru istorije bolesti paralize pčela.

Do sada poznati virusi skraćuju život svake pojedine pčele. Svi od njih su štetni, a mnogi od njih su veoma zastupljeni. Teški oblici infekcije dovode do značajnih uginuća, što se ne dešava tako često, ali što se ne smije izgubiti iz vida kada se razmatraju faktori koji su doveli do nestanka ili oštećenja pčelinje zajednice.

Neki virusi pčela zastupljeni su na određenim regijama, ali njihova sposobnost da postoje u formama inaparentnih infekcija, u uslovima povećanog međunarodnog transporta, ostavlja im mogućnost neizbježne globalne raširenosti. Još uvijek ne postoje direktne metode kontrole virusa pčela osim u fazi njihove dijagnostike. Svakako da je ignorisanje značaja virusa u prošlosti dovelo do nepotpunih i netačnih dijagnoza bolesti, što je na kraju dovelo i do loših rezultata tretmana.

Poznavanje evolucijske istorije virusa pčela, kao i svakog drugog patogena, omogućilo bi da se identifikuju okolnosti koje dovode do njegovog umnožavanja i širenja unutar pčelinjih zajednica, a takođe i sprovođenje kontrolnih mjera koje bi u tom slučaju mogle biti primjenjivane. Dosadašnji odnos prema bolestima pčela u veterinarskoj medicini i pčelarskoj praksi rješavali su se kroz primjenu direktnih tretmana, u najčešćem broju slučajeva hemoterapijski. Hemoterapijski tretmani koji se danas koriste protiv *Nosema apis* i *Varroa destructor*, ukoliko se koriste ispravno, mogu indirektno suprimirati viruse udružene sa ovim patogenima.

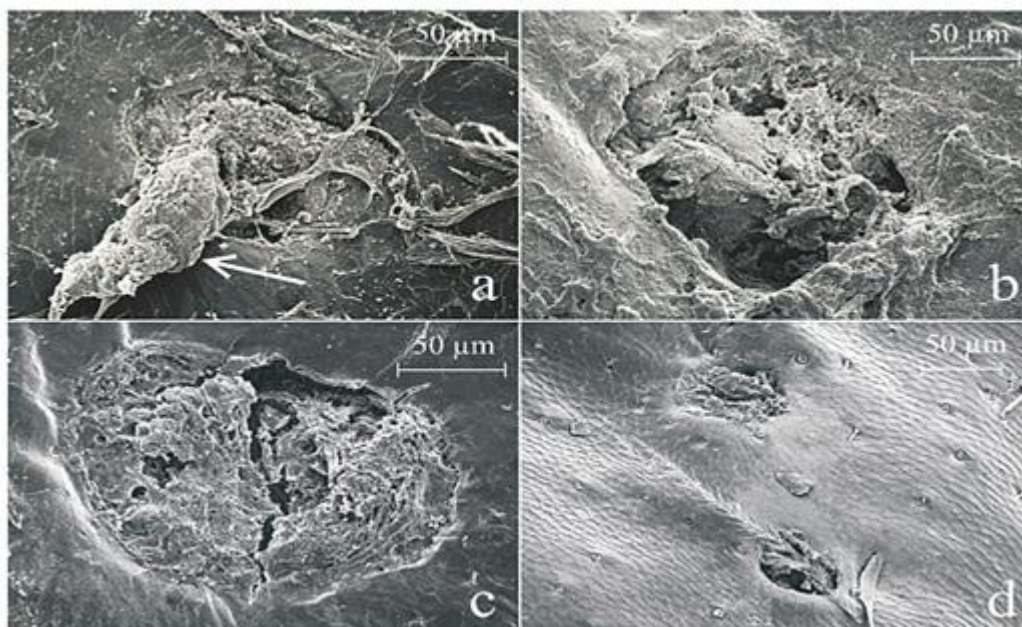
Virusi se prenose najdirektnije bliskim kontaktima sa jedinkama koje su već inficirane, kao što je to slučaj hronične paralize, a u slučajevima drugih virusa moguće je širenje i po drugim okolnostima, što na kraju rezultuje smetanjama u normalnom funkcionisanju zajednice.

Faktori rizika u prirodi bi se mogli odnositi na slučajeve neadekvatnog prinosa nektara prebrojene populacije pčela na užem regionu, dok druge procedure u pčelarstvu, kao što su seljenje, uzgoj matica, ili pretjerano dodatno hranjenje pčela šećerom mogu asistirati u širenju kontagioznih virusa.

Virus mještinastog legla bi se mogao kontrolisati u prirodnim uslovima različitih kasta u toku perioda prikupljanja nektara, što ovaj virus čini samolimitirajućim na način da nije u stanju da inficira sve klase radilica. Neki drugi virusi vjerovatno se šire u

košnicama posredstvom fecesa, odnosno kontaminacijom koja nastaje nakon nepotrebnog produženog boravka pčela u košnicama.

Varroa je u stanju favorizovati ekspresiju, replikaciju ili transmisiju virusa.



Slika 5. Elektronske mikroskopije "rana" nastalih djelovanjem *Varroae* na integumentumu lutke medonosne pčele: a) rana nastala na trutovskoj lutki 21–22 dana starosti, infestiranoj sa tri *Varroae*, strelica pokazuje hemolomfu koja izlazi na mjestu perforacije; b) rana na trutovskoj larvi 21–22 dana staroj, infestiranoj sa pet *Varroae*, rana sa dubokim defektom i izraženim ivicama; c) rana na radiličkoj lutki staroj 20–21 dan, infestiranoj sa četiri *Varroae*: velika rana pokazuje tek početak zarastanja; d) rana na trutovskoj larvi 21–22 dana staroj, infestiranoj sa dvije *Varroae*, sa dvije vrlo blisko vidljive perforacije na drugom abdominalnom sternitu, primjećuje se i početak razvoja dlake na kutikularnoj površini; www.ars.usda.gov

Virusi pčela imaju direktan uticaj na preživljavanje u periodu prezimljavanja. Način preživljavanja u slučaju virusnih infekcija još uvijek nije jasan. Jačina zajednice i nivo *Varroa* infestacije značajni su faktori koji utiču na preživljavanje zajednice, a tzv. „indeks prezimljavanja“ može biti dobar način prepoznavanja osjetljivih pčelinjih zajednica, što ima značaj i u selekciji (Garido, 2008, Freiburg OIE meeting).

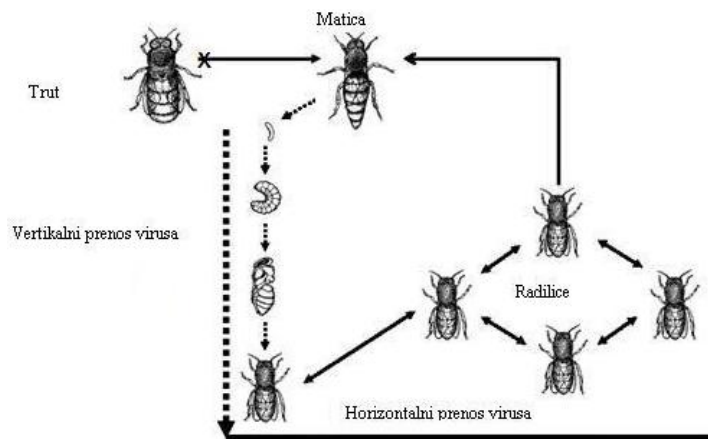
Grupa francuskih autora (Le Conte et al., 2009) proučavala je fenomen preživljavanja pčelinjih zajednica infestiranih sa *Varroa destructor* i ulogu virusa. Podatak da su neke pčelinje zajednice preživjele infestaciju *Varroa destructor* više od četiri godine bez ikakvog tretmana omogućila je različite hipoteze u objašnjenju ove opservacije.

Jedna od njih bila je da ukoliko pčelinja zajednica sadrži manje virusa ili je manje osjetljiva na virusnu infekciju ima više mogućnosti za preživljavanje. Neki virusi pčela, naročito ACBV, pokazuju udruženost sa infestacijama *Varroa destructor*.

Patogeneza virusnih infekcija podrazumijeva molekularne, fizičke i fiziološke odgovore domaćina na virusni patogen. Tri su osnovne determinante koje određuju virusne infekcije pčela:

1. *domaćin*: genotip, stepen biološkog razvoja, polna pripadnost, nutritivni status, zdravstveni status, ulazna vrata;
2. *okolina (prirodna sredina)*: klima, predisponirajući fizički faktori, prisustvo pesticida, menadžment, reljef;
3. *virus*: infektivnost, patogenost, virulentnost, imunogenost, otpornost.

Pčelinja zajednica je određena kao vrsta *superorganizma* u kojoj je svaka jedinka značajna koliko i svaka pojedinačna ćelija u ljudskom organizmu. Podjela odnosno cijepanje jedne ili dvije odvojene zajednice u procesu rojenja rijedak je fenomen i u dva nivoa reprodukcije značajno je obratiti pažnju na način prenosa patogena i prenos imuniteta koji posljedično njemu nastaje (Moritz and Southwick, 1992).



Slika 6. Prikaz načina prenosa virusa u zajednici (Chen et al., 2006)

Na nivou pčelinje zajednice, ova dva modela transmisije pojavljuju se kao intra- i interkošnički nivo (Fries & Camazine, 2001). Imunološki odgovor na nivou zajednice bazira se na patogenom pritisku na nivou kako zajednice tako i svake pojedinačne jedinice. U prilog tome opisuje se sljedeći kratak rezime invazije patogena na pčelinju zajednicu:

- a) prenos virusa u pčelinjoj zajednici rezultat je virusne adaptacije i virusne evolucije;

b) pčelinja zajednica je složen socijalni organizam koji njeguje leglo, u kom se nalaze različite starosne kategorije jedinki, u kojoj postoji jasna podjela rada, a koja opstaje u velikim i gustim zajednicama, sa ogromnim brojem kontakata među jedinkama.

Sve navedene karakteristike od značaja su za širenje infekcije u zajednici. U jakim zdravim pčelinjim zajednicama virusi perzistiraju u formama niskih titrova, a do ispoljenih formi infekcije dolazi na nekoliko različitih načina (Hails et al., 2008; Chen and Siede, 2007). Najčešći putevi širenja infekcije su sljedeći:

Horizontalni prenos

Oralni prenos – ovaj način transmisije uključuje unos virusa kontaminiranim materijalima, u prvom redu preko matične mliječi i polena u toku hranjenja larve i procesima trofilakse (među odraslim pčelama), pojavom kanibalizma jaja i mladih larvi, čišćenja legla i uklanjanja bolesnih i fecesom onečišćenih zajednica (Ribiere, 2007). Virus se najčešće nakupljaju u crijevima, mozgu, pljuvačno-hipofaringealnoj žlijezdi (Chen et al., 2006), što jasno ukazuje na značaj oralno-fekalnog širenja uzročnika. Ovaj način širenja je relativno neefikasan jer je za uspostavljanje infekcije potrebna velika količina virusa.

Širenje kontaktom – neki virusi među pčelama se prenose kontaktom, najčešće prodorom virusa preko slomljenih dlaka ili oštećenjima egzoskeletona pčele. Ovo se najčešće dešava kada je zajednica prenaseljena ili kada se u zajednici razvija pojačana agresivnosti ili grabež (Ball and Bailey, 1997).

Širenje vazduhom – vrlo malo se zna o aerogenom širenju virusa. Jedini dokaz je u slučaju transmisije virusa zamućenih krila (CWV), za koji je dokazano da se može prenijeti između odraslih pčela kada se one čuvaju u zasebnim, odvojenim kavezima (Ribiere et al., 2008).

Vertikalni prenos je prenos virusa sa roditelja na potomke, a sastoji se iz tri komponente: veneralna transmisija (prenos sa truta na maticu u toku oplodnog leta); transovarijalna transmisija (preko inficiranih ovarija matice na oplodena i neoplodena jaja); i prenos spermom iz depoa sperme (spermatoka) direktno na oplodena jaja.

Transovarijalna transmisija je način na koji se može inficirati kompletna pčelinja zajednica tokom više generacija jer je matica majka svih pčela u zajednici. Mnogo virusa je detektovano na nivou jajnika (Chen et al., 2006; Gauthier et al., 2011), sjemenih kesica i sperme (Yue et al., 2006), gdje se virus akumulira u veoma visokim

titrovima, što ovaj put genitalnog prenosa i vertikalnog širenja čini vrlo efikasnim (Yue et al., 2007; de Miranda and Fries, 2008). Oplodnja matica nastaje u posebnim uslovima, na mjestima gdje se skuplja veliki broj trutova različitog porijekla i različitog infektivnog statusa. To je razlog što je oplodnja vrlo efikasan način disperzije virusa među pčelinjim zajednicama širih geografskih razmjera.

Vektorski put prenosa virusa

Pojava *Varroa destructor* na *Apis mellifera* postala je globalan problem zbog gotovo katastrofalnih efekata koje ovaj nametnički patogen nosi sa sobom. Nezadovoljavajući kontrolni modeli u suzbijanju infestacije, razvoj rezistencije na akaricidana sredstva, vektorska uloga za bakterije i viruse samo su najvažniji navodi koji potvrđuju da je varoza glavni uzročnik gubitaka pčela u svijetu.



Slika 7. *Varroa destructor*, ventralno, veličina 1,5 mm,

<http://www.yorksphotoweb.co.uk/gallery3.html>

Varoza se sa originalnog domaćina, azijske pčele *A. ceranae*, prebacila na evropsku pčelu *A. mellifera* tokom prve polovine 20. vijeka, (Rosenkranz et al., 2010), a onda proširila na gotovo cijeli svijet. To je klasičan primjer nečega što se u stručno obrazlaže kao „preskakanje barijere vrste“. *Varroa* je glavni razlog zašto su virusi pčela postali značajni naučnoj javnosti. Ona je promijenila prirodu patološkog odnosa između virusa i njegovog domaćina, pčele, kako na individualnom nivou tako i na nivou ukupne zajednice.

Otpribliže 20 različitih virusa identifikovano je kod medonosne pčele u periodu prije dolaska *Varroe* u Evropu, uglavnom u toku istraživanja vršenih 60-ih i 70-ih godina prošlog vijeka. Mnogi pčelinji virusi ne mogu se razlikovati na osnovu njihove morfologije. Značajno se razlikuju u odnosu na njihovu genetsku i proteinsku građu, i ove osobine bile su osnova za razvoj većine dijagnostičkih testova (Baily and Ball,

1991; Ribiere et al., 2008; de Miranda, 2008). Pčelinji virusi su zastupljeni u pčelinjim zajednicama širom svijeta, a mogu izazvati različite patološke manifestacije, u formi oboljenja ili čak uginuća pčelinje zajednice. Većina pčelinjih virusa opstajala je evolucijski u koegzistentnim odnosima sa domaćinom, dugo vremena, ne utičući značajno na patološke procese koji ugrožavaju vrstu, perzistirajući u formama inaparentnih infekcija, bez ikakvih štetnih uticaja unutar pčelinje populacije.

Nekada su fizički simptomi patološkog procesa najlakše uočljivi. Mnogi virusi pčela inficiraju mozak, izazivajući promjene u ponašanju kao što su dezorijentacija, otežano učenje, ubrzano starenje, smanjenje senzornih sposobnosti i probleme na poslovima skupljanja hrane. Na kliničkom nivou ovo se može prepoznati kao simptom podrhtavanja tijela, nemogućnosti letenja i skupljanja pčela u grupe. Većina virusa smanjuje dužinu života pčele. Ovi patološki procesi zavise od količine virusa i vrste tkiva koje je inficirano. U slučaju niskih virusnih titrova moguće je da se inficira mali broj pčela, a da ostatak pčelinje zajednice može kompenzovati nastalu štetu i na taj način oporaviti se od infekcije. Ukoliko se virus zaista proširi na veći broj članova pčelinje zajednice, što za posljedicu ima uginuće koje ne može da se kompenzuje, zajednica brzo brojčano pada i ugiba. Većina pčelinjih virusa je sveprisutna u niskim titrovima unutar košnice, pčela, rezervi hrane, voske. Stresori spoljašnje sredine, kao što su prenaseljenost, hladnoća, vlaga, glad, trovanje i drugi patogeni pčela u stanju su preokrenuti virusnu infekciju iz forme perzistentne u formu letalno epidemijske (Genersch and Aubert, 2010). Govoreći o virusima pčela (koji su najčešće RNK virusi), treba napomenuti da su oni u stanju razviti veliki broj genetskih varijanti, koje su ključ njihovog opstanka i njihove adaptibilnosti. Ovo je razlog što se mnogobrojne virusne varijante dinamički odupiru odbrambenim snagama domaćina.

Klasifikovani virusi pčela

Nedavno je sasvim proučen genom (sekvencioniran) za pet virusa: virus akutne pčelinje paralize (ABPV, GenBank Accession No. AF 150629), virus crnog matičnjaka (BQCV, GenBank Accession No. AF 183905), virus deformisanih krila (DWV, GenBank Accession No. NC 004830), kašmirski pčelinji virus (KBV, GenBank Accession No. NC 004807) i virus mješinstog legla (SBV, GenBank

Accession No. AF 092924), i djelimično sekvencion genom virusa hronične paralize pčela (CBPV, GenBank Accession No. AF 461061), što je razvilo mogućnost molekularne detekcije i karakterizacije ovih virusa (Bakonyi et al., 2002; Benjeddou et al., 2001; Chen et al., 2004c; Evans, 2001; Genersch, 2005; Grabenstiner et al., 2001; Hung et al., 1996; Ribiere et al., 2002; Stoltz et al., 1995; Tentcheva et al., 2004).

Virus deformisanih krila, *Deformed wing virus (DWV)*

Virus deformisanih prvi put je bio izolovan iz pčela koje su bile inficirane parazitom *V. jacobsoni* na teritoriji Japana. Osnovna karakteristika najmlađih pčela, tek izašlih iz legla, jeste da pokazuju jasne simptome ili deformisanih ili nepotpuno razvijenih krila, a da se istovremeno u ovakvim individuama nalazi vrlo osjetljiv virus koji u poređenju sa egipatskim pčelinjim virusom pokazuje neke sličnosti serološkog odgovora. Ovaj navod o deformacijama krila kod tek izleženih pčela saopšten je i iz mnogih drugih zemalja, no ove promjene i oštećenja su se pripisivali posljedicama oštećenja *V. jacobsoni*. Izgled simpotma i deformisanosti krila zavisi od faze u kojoj je došlo do inficiranja pčele odnosno larve. Virus se umnožava sporo, a larva inficirana u fazi bijelih očiju može preživjeti do momenta oslobađanja iz ćelije, ali je ona degenerisana i uskoro ugiba. Leglo može uginuti i u ranijim fazama razvoja, a pčele inficirane kao adulti izgledaju sasvim normalno do uginuća.



Slika 8. Klinički ispoljene deformacije krila, www.ars.usda.gov

Između do sada pronađenih virusa koji mogu inficirati *A. mellifera*, DWV je jedan od najprisutnijih u pčelinjim zajednicama, što je u korelaciji sa njegovom mogućnošću da bude prenesen preko *Varroa destructor* vektora. Takođe, postoje podaci da se DWV prenosi u kontaktu između jedinki u košnici bilo horizontalno, hranjenjem, ili vertikalno, preko jaja. Gauthier, L. (2007) mjerio je prisustvo DWV RNK udjela u tri stotine šezdeset naizgled zdravih pčelinjih zajednica u uzorku od 100 pčela, koristeći

kvantitativni PCR, što je dokazalo da pčelinja društva mogu tolerisati veoma visoke količine virusa, a da pri tome ne pokazuju spoljašnje kliničke simptome. Koristeći tehniku hibridizacije *in situ*, dokazali su da su matice i trutovi imali oštećene funkcije u odnosu na plodnost. Matice su primarno bile inificirane na nivou ćelija masnog tkiva (*fat body cells*), dok je kod trutova gotovo cijeli reproduktivni trakt bio zahvaćen virusnim RNK materijalom. U istim ispitivanjima ovaj autor je dokazao da je kod individua koje su pokazale oštećenja, tj. deformacije krila nalazio veoma veliki udio DWV RNK kopija genoma na nivou digestivnog trakta, što ukazuje vjerovatno na negativan efekat DWV infekcije na digestivne funkcije pčela. Podaci iz ovog eksperimenta značajno su pokazali da DWV uzrokuje patogene efekte kod visokoinficiranih jedinki pčelinjih zajednica. Naravno, u odnosu na ukupnu pčelinju zajednicu, preživljavnje zajednice zavisi od broja inficiranih pojedinačnih članova i sposobnosti pčelinje zajednice da se održi. Nekoliko godina kasnije, Gauthier et al. (2011) dokazali su da DWV može izazvati značajnu degeneraciju janjika matice, ali da sama infekcija ne mora dovesti do takvog rezultata uvijek, čak i kada se virus nađe u visokim titrovima. Veliki je broj radova koji su obrađivali kompletne genske sekvence virusa DWV (Tentcheva et al., 2004a; Tentcheva et al., 2004b; Chen et al., 2004; Genersch, 2005; Chen et al., 2005) imao za cilj otkriti incidencu i prevalencu ovog virusa kako kod pčela tako i kod *Varroe*.

Virus može izazvati mortalitet i u zajednicama koje nisu inificirane sa *V. jacobsoni*, ali je u laboratorijskim uslovima i u terenskim ispitivanjima dokazano da grinja prenosi virus na isti način kao kod akutne paralize (Ball, 1989). Virus deformisanih krila dokazan je kod sojeva evropske pčele u većini evropskih zemalja, Azije, Latinske Amerike i kod *Apis cerana* iz Kine. U vrijeme ovih dokaza, izolati virusa razlikovali su se samo na osnovu njihovih proteinskih omotača, ali su serološki bili vrlo slični jedan drugom i ne tako udaljeni serološki od tzv. egipatskog pčelinjeg virusa.

Rezultati koji su proučavali prenos DWV u društvima infestiranim *Varroom* pokazali su da ona redovito prenosi virus na larve (Fries et al., 2008). Ovaj parazitizam na nivou larve je značajan jer dovodi do inficiranja novoizleženih pčela, kao i do vidljivih deformiteta krila. Sve pčele sa visokom infestacijom sa simptomima deformiteta krila imale su visoke titre DWV iako je 1/3 infestiranih pčela bez vidljivih promjena takođe imala visok virusni titar na DWV. To znači da virusni titrovi nisu

neophodni i ne moraju biti dovoljni da bi proizveli očigledne promjene deformisanosti krila. *Varroa* favorizuju prenos virusa unutar društva, ali prisustvo virusa u larvama ne mora uvijek biti rezultat vektorske transmisije, jer se virus takođe može nešto rjeđe pronaći u društvima u kojima postoje larve na kojima nema parazitizma. Jednom kada se utvrdi virus unutar pčelinje zajednice, transmisija se može odvijati preko njegovateljica na larve.

Virus DWV ili, da ga tako nazovemo, „virus koji deformiše krila pčele“ može se dokazati u različitim životnim stadijumima pčele, uključujući vrijeme adulta, larve, lutke i jaja, kao i kod *Varroa destructor* (Chan et al., 2005). Dokaz DWV kod *Varroa* potvrđuje da se prethodni navodi potvrđuju u pravcu da je *Varroa destructor* ukuljučena u transmisiju virusa (Bowen-Walker et al., 1999). Dokazano je prisustvo infekcije DWV-om jaja i larvenih razvojnih oblika pčele bez uticaja *Varroae* što govori o činjenici da postoji drugi način transmisije, tj. da inficirane matice u inficiranim društvima mogu prenositi virus vertikalno na jaja (Chen et al., 2005).

Značajna je uloga DWV u mortalitetu pčelinjih zajednica infestiranih sa *Varroa destructor*. Ovo je dokazano u engleskim studijama koje pokazuju da je DWV, koji se prirodno nalazi u pčelinjim zajednicama, u asocijaciji sa vektorom razlog masovnih gubitaka pčelinjih zajednica. Mnogobrojni simptomi koji su prvobitno bili opisani kao rezultat djelovanja krpelja sada se mogu objasniti na drugačiji način, odnosno kao rezultat infekcije DWV. Uloga grinje je primarno vektorska. Kada se jednom DWV nađe u hemolimfi parazitiranih individua kao posljedica hranjenja krpelja, započinje njegova brza multiplikacija. Ovo dovodi do smanjenja legla i pojave deformacije krila, ali ne kod svih novoizleženih pčela. One pčele koje se na ovaj način izlegu imaju znatno kraći životni vijek (Martin et al., 2010). Određivana je prevalentnost i perzistentnost DWV u društvima koja su tretirana akaricidima ili su puštena da uginu. To je pokazalo da je broj inficiranih odraslih pčela bio veći nego broj *Varroa* infestiranih pčela, dok je istovremeno uzročnik pronađen u poklopljenom leglu. Da bi se obezbijedilo preživljavanje zajednice, *Varroa* se mora iz njih ukloniti prije proizvodnje zimskih pčela, da bi se na taj način minimizirao značaj DWV infekcije u zimskoj populaciji pčela. Virus DWV replicira se u tkivu krila, glave, toraksa, ekstemiteta, hemolimfe, crijeva, kako kod pčela tako i na nivou istih postojećih tkiva kod *V. destructor* (De Miranda i Fries, 2008). Ovi autori dokazali su horizontalnu i vertikalnu transmisiju DWV virusa. I drugi autori (Shah et al., 2009) dokazali su

lokalizaciju virusa DWV u mozgu medonosne pčele. Dokazano je da virus DWV i infekcija koju izaziva nisu ograničeni samo na digestivni trakt pčele nego da se mogu širiti u cijelom tijelu, uključujući ovarijume matice, masno tkivo matice, a kod trutova virus je utvrđen u sjemenim kesicama (Julie Fievet et al., 2006).

Incidenca i prevalenca DWV još uvijek se zasniva na molekularnom dokazu više nego na samoj patogenezu DWV. Grupa njemačkih autora (Yue, C., 2006; Yue et al., 2007) proučavali su prvi korak u patološkom procesu koji je zapravo transmisija DWV virusa. Utvrđen je vertikalni prenos DWV preko trutova, horizontalni nastao kao posljedica hranjenja larvi i vektorska transmisija sa larve na adult posredovanjem *Varroa destructor*, koji ima ulogu virusnog vektora. Interesantan nalaz je bio da se broj pčela koja se pokazivale deformisana krila nalazi u korelaciji sa sposobnošću virusa da se replikuje u pčeli. Proučavajući značaj male košničine bube, *Aethina tumida*, kao kleptomanskog parazita kod *Apis mellifera*, Peter Neumann (Coloss workshop, New molecular tools, Bern, Switzerland, 12–21 May, www.coloss.org/proceedings) utvrdio je da ovaj kornjaš može biti biološki vektor pčelinjih virusa. Korištenjem metoda RT-PCR utvrđeno je prisustvo virusa DWV kod *Aethinae tumidae* (Small Hive Beetle), u košnicama, koje su bile inficirane sa DWV, što je otvorilo novi pristup razumijevanju bioloških vektora virusnih infekcija pčela.



Slika 9. Insekt *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulide, SHB) kao vektor virusa pčela
www.getfarming.com.au

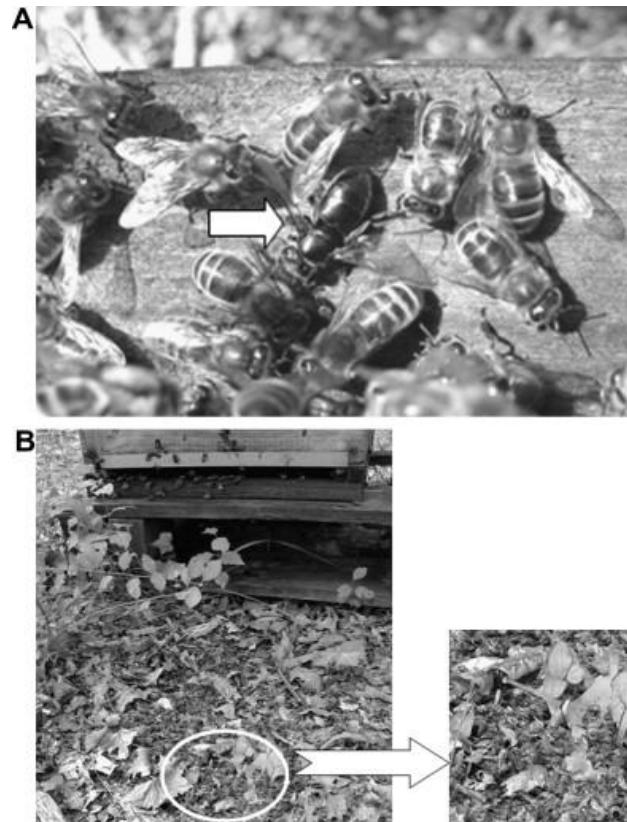
Virus hronične paralize pčela, *Chronic bee paralysis virus (CBPV)*

Iako je paraliza kao simptom bolesti kod pčela opisana vijek prije konačnog dokaza, prisustvo virusa otkriveno je tek 1963. (Baily et al., 1963). Tako je u tim ranim fazama dokaza uzročnika vezanog sa ispoljenom kliničkom slikom, i uzročnik akaroze, trahealna grinja, *Acarapis Woody*, bio inkrimisan i prihvaćen kao uzrok

paralize pčela u Britaniji, poznatije pod nazivom „Isle of Wight disease“. Virusi su bili rijetko uzeti u razmatranje sve dok Burnside (1933) nije dokazao da je simptome paralize pčela dobio i tretirajući pčele bakterijski slobodnim filtratima na teritoriji USA. Infektivnost ovog poznatog agensa uništavala se grijanjem i činilo se da se radilo o istom virusu koji je bio opisan kao virus paralize u Britaniji (Baily et al., 1963) i u SAD-u (Rinderer and Green, 1976). Nakon toga, takav dokaz utvrđen je od strane Bailyja (1976). Virus je prepoznat kao izazivač hronične paralize pčela, po čemu se razlikuje od akutne virusne paralize, kao jedan različit virus koji je pronađen kod pčela slučajno, u toku istraživanja bolesti hronične paralize. Virus hronične paralize je najčešće gotovo uvijek pridružen sa tzv. „satelitskim virusom“, za koji se još uvijek ne zna pravo mjesto i značaj, naročito u slučajevima kod matice koje pokazuju simptome paralize.

Simptom paralize odraslih pčela, virus CBPV, zapravo je sindrom, jedan tip bolesti, najčešće viđen u Britaniji, koji uključuje nenormalne pokrete („trembling“), drhtanje krila i cijelog tijela inficirane pčele. Ovakve pčele ne mogu letjeti i sakupljaju se na zemlji ponekad u grupama većim od 1000 pčela. Često se sabijaju zajedno na vrhu košnice. Imaju uvećane abdomene i djelimično raširena krila sa nepravilnim položajima. Ovakav otok abdomena nastaje kao posljedica širenja mednog želuca usljed nakupljanja tečnosti. Ovo dovodi do ubrzavanja simptoma koji se nazivaju „dizenterija“, a bolesne jedinke ugibaju za nekoliko dana nakon pojave prvih simptoma. Neke teško inficirane pčelinje zajednice iznenada ugibaju, što predstavlja tzv. „kolaps pčelinje zajednice“, najčešće u toku ljeta, ostavljajući košnicu samo sa maticom i nekoliko radilica u ovakvom napuštenom društvu. Opisani simptomi su identični onima koji su opisani kao „Isle of Wight disease“.

Drugi sindrom, tzv. „tip 2“, na osnovu kliničke slike inficiranih pčela dobio je različite nazive – „crna kradljivica“, „mala crna pčela“ ili „sindrom ćelave crne pčele“.



Slika 10.

- A) crne sjajne pčele
- B) uginuća ispred košnice (Magali Ribière, 2010)

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201109001840>

Ovako inficirane pčele mogu letjeti, potpuno su obezdučene, izgledajući na taj način tamne, gotovo crne, što ih na prvi pogled odvaja veličinom i bojom od ostalih pčela sa samo malo uvećanim stomacima. Naizgled su sjajne, gotovo masnog izgleda kada se na njih pusti snop svjetlosti, a njih zbog tako izmijenjenog izgleda zdrave pčele nastoje napasti braneći svoje društvo, tako da ovakva pojava liči na onu opisanu kod grabeži (Drum and Rothenbuhler, 1983). Za nekoliko dana ove pčele ne mogu više letjeti, pokazuju „tremor“ i uskoro ugibaju. U inficiranoj zajednici mogu se uočiti oba sindroma bolesti, ali jedan od njih dominira.

Razlika između ova dva sindroma vjerovatno je uzrokovana genetskom različitošću između svake individualne pčele. Uočeno je da se osjetljivost pčela na oblike paralize određuje na osnovu nekoliko naslijeđenih kvaliteta, koji u tom slučaju dovode do varijacija u ispoljavanju sindroma. Rinderer et al. (1975) i Kulinčević i Rothenbuhler (1975) uspjeli su selekcionisati sojeve pčela osjetljivije na drugi tip sindroma bolesti

paralize. Virus hronične paralize pčela izaziva kontagioznu bolest odraslih pčela koja se naziva hronična paraliza. U posljednjih nekoliko godina, sve slučajeve masovnih uginuća pčela koje su imale simptom „tremora“ provjeravali su laboratorijski, nakon čega su uslijedile molekularne dijagnostičke procedure u kojim su potpuno sekvencionisani svi virusni nukleotidi dva glavna dijela RNKs, CBPV, koji je bio u stanju detektovati različite varijable virusnih izolata, nakon čega su razvili i realtime PCR kvantifikacionu tehniku za ovaj virus (Magali Ribiere, 2009). Nakon toga pristupilo se sakupljanju uzoraka u različitim periodima godine, različitim starosti legala i odraslih pčela. Tom prilikom detektovano je prisustvo CBPV kod dvije vrste mrava (*Camponotus vagus* i *Formica rufa*). Ovaj nalaz je otvorio novi pogled na moguće puteve širenja virusne infekcije, kao i održavanje prisustva virusa u uslovima sredine pčelinjaka. Testovima infektivnosti sa ekstraktima živih pčela prikupljenim iz zdravih zajednica u Britaniji, virus paralize je dokazan među mnogima od njih u toku cijele godine, bez značajne sezonske varijacije, tako da su utvrdili da je manje od 2% košnica u Britaniji inficirano virusom paralize, ali da te pčele pokazuju značajan stepen rezistentnosti na širenje i umnožavanje virusa pod normalnim okolnostima. Okolnosti prirodnog širenja virusa paralize određene su različitim faktorima. Kada se naizgled zdrave zajednice čuvaju u prekrcanim kavezima na temperaturi od 35°C, što je normalna temperatura legla, paraliza se mnogo brže širi unutar zajednice (Baily et al., 1983a). Virus se širi u vrlo kontagioznoj formi gotovo uvijek kada su individue aktivne, ali u neuobičajnom produženom tjelesnom kontaktu. Čini se da je u prvim fazama proučavanja dokazano da se hranjenjem ne može značajnije povećati stepen infektivnosti virusa jer je infektivna doza mjerena milionima virusnih čestica potrebnih da bi se jedinka inficirala hranjenjem, ali dovoljno je nekoliko virusnih čestica da taj virus prodre u tijelo kroz neko oštećenje tipa rane, vjerovatno zato što je virus u stanju lako inficirati vitalna tkiva pčele. U prirodi, to se najčešće dešava onda kada se pčele zbog bliskog kontakta češu jedna o drugu, dovodeći prilikom toga do lomljenja dlaka ili njihovog potpunog ispadanja, otvarajući pri tome površinu kutikule i izlažući infektu normalno tkivo. Ovo je dokazano i u laboratorijskim uslovima primjenom kulture virusa na svježe (obrijane) površine pčela. Senzitivnost pčela na infekciju virusa dokazana je kada su one hranjene smjesom polomljenih dlačica u hrani (Rinderer and Rothenbuhler, 1976, *Insect Pathology*, By Y. Tanada, Harry K. Kaya), vjerovatno zato što one mehanički oštećuju dijelove intestinalnog trakta,

omogućavajući virusu da inficira izloženo tkivo. Shodno tome, paralizovane pčele možemo očekivati na terenu kada se lokalni uslovi u odnosu na odrasle pčele i košnice u nekom vremenu godine dešavaju u pravcu da im je onemogućeno normalno izletanje i prikupljanje nektara. Ovo se može desiti u različitim intervalima godine, iz različitih razloga, tako da su i kolapsi zajednica kao posljedica istog evidentni.

Grupa francuskih autora (Ribier M. et al., 2010) utvrđivala je prisustvo CBPV u pčelinjim ekskretima da bi utvrdili moguće uloge u indirektnom prenosu infekcije. Uzorci pčela sa CBPV, glave pčela ili fecesa (svježe uzetog na papir) ispitivane su sa RT-PCR. CBPV je dokazan u fecesu i prirodno i eksperimentalno inficiranih pčela. Dodatno su proučavali CBPV infektivnost primjenom intratorakalne inokulacije zdravih pčela sa fekalnim ekstraktom ili stavljanjem zdravih pčela u kaveze koji su prethodno bili naseljeni inficiranim, tj. kontaminiranim individuama. Obje procedure ispitivanja na kraju su dale rezultat oboljevanja zdravih pčela. Bio je to jedan od prvih dokaza esperimentalne potvrde da su infektivne partikule virusa CBPV izlučene fecesom u stanju inficirati pčele.

Znanja o distribuciji virusa unutar pčelinje zajednice, kao i kretanju virusne infekcije krucijalna su za razumijevanje dinamike oboljenja koje izaziva virus hronične paralize pčela. Grupa francuskih autora (Ribiere M. et al., 2008) proučavala je društva sa simptomatskim i asimptomatskim slikama iz različitih vrsta uzoraka, jaja larvi, lutke, njegovateljice, braniteljice, sakupljačice, u poređenju sa onim uzorcima uginulih pčela sa poletaljke metodom RT-PCR. Rezultati koje su dobili od pčelinjih društava sa simptomima bolesti ili onih uginulih ukazuju direktno na korelaciju između količine CBPV u uzorku i patološke ekspresije. Ono što je iznenadilo jeste da nije uočeno najveće prisustvo CBPV virusa u grupi najstarijih pčela (sakupljačica) nego kod stražarica, što pokreće pitanje o njihovoj ulozi u nastanku infekcije.

Virus mješinstog legla, Sacbrood virus (SBV)

Kada je 1917. godine White u Americi izvršio ogled inokulacije larvi, filtratima promijenjenog dijela larvi sa tipičnim kliničnim promjenama mješinstog legla, napravio je zapravo biološki ogled, dokazujući da je uzročnik infekcije virus. Desilo se to mnogo prije nego što je tehnički bilo moguće vidjeti čestice virusa elektronskim mikroskopom, tako da je virus mješinstog legla bio jedan od najranije dokazanih

uopšte. Ovaj virus dokazan je gotovo pola vijeka nakon Whiteovog eksperimenta od strane Bailyja 1964. god. (Baily et al., 1964). Virus mješinstog legla umnožava se u nekoliko različitih tkiva larve, no one izgledaju sasvim normalno do momenta njihovog poklapanja u leglu. Tada virus dovodi do promjene boje larve iz normalne u više žutu i nemogućnosti pretvorbe larve u lutku zbog nemogućnosti zamjene čvrste endokotikule u toku pretvorbe u njenu konačnu „kožu“. Larve ostaju nabrane, tj. uvećane u njihovom zadnjem dijelu sa glavom okrenutom u pravcu poklopčića. Endocistalna tečnost odnosno fluid koji se nakuplja između tjelesne i neotvorene mješinstaste kože larve jasno doprinosi izgledu i nazivu ove virusne bolesti. Naizgled tipična promjena u leglu može se opisati kao larva zarobljena u zatvorenu mješinu ispunjenu tečnošću.



Slike 11. i 12. Tipične promjene kod SBV infekcije (mješinsto leglo)

www.ent.uga.edu, http://www.ars.usda.gov/images/docs/7461_7655/sacbrood.jpg

Larve su na virus mješinstog legla najosjetljivije u starosti od dva dana, a inficiraju se hranjenjem. Virus u mrtvoj larvi vrlo brzo gubi infektivnost i u nastavku infekcije naročito u toku prizimljavanja opstaje u odraslim pčelama kod kojih se virus multiplikuje, ne izazivajući pri tom značajna oboljenja. Najmlađe radilice su najosjetljivije na infekciju, a inficiraju se u periodu njihovog najranijeg posla, čišćenja ćelija. Kada se one, čisteći larve uginule zbog virusa mješinstog legla, inficiraju ingestijom, odnosno endocistalnom tečnošću uginulih larvi, unutar jednog dana najveća količina virusa mješinstog legla akumulira se u hipofaringealnim žlijezdama osjetljivih pčela (Bailey, 1964). Vjerovatno one prenose virus onda kada postaju hraniteljice, hraneći mlade larve sadržajem glandularnog sekreta. Virus se može prenijeti na larve preko polena skupljenog od strane inficiranih sakupljačica. One ga inficiraju virusom koji se nalazi u njihovim glandularnim sekretima. Infekcija

virusom ubrzava normalne funkcionalne sekvence u životu radilica skraćujući im posljedično život: inficirane pčele prestaju uzimati polen, postaju sakupljačice prije nego što je to normalno i u zajednicu unose mnogo manje polena nego zdrave individue (Bailey and Fernando, 1972).

Virus dovodi do nekoliko značajnih promjena u ponašanju pčele koje u odnosu na labilnost virusa limitiraju njegovo širenje unutar zajednice. Infekcije virusom mješinatog legla su najčešće uočljive u proleće i rano ljeto, što je normalno s obzirom na razvoj zajednice, koji je tada najznačajniji. Transmisija virusa sa inficiranih odraslih pčela na larve smanjuje se prilikom povećanja broja sakupljačica u toku glavnog nektarskog prinosa, kada najveći broj košnica ozdravi, odnosno zajednica se oporavi spontano. Virus je u stanju inficirati odrasle pčele u vremenu prezimljavanja tzv. zimske pčele. Mnoge od tih pčela ugibaju prevremeno, smanjujući na taj način dalje širenje infekcije u toku sljedeće sezone. Bailey and Ball (1991) dokazali su u Engleskoj i Welsu da veći dio košnica nosi infekciju, a da više od 30% ima po nekoliko larvi koje su očigledno inficirane virusom mješinatog legla. Virus je takođe dokazan u naizgled sasvim zdravim larvama u južnoj Australiji, što dokazuje da je mnogo više zastupljen nego što je prvobitno pretpostavljeno (Dall, 1985).

SBV je u filogenetskim istraživanjima dosad pokazao tri različita genetska podstabla, tj. soj sa Dalekog Istoka, iz Južne Afrike i Evrope. Iako ove populacije nisu bile homogene, one su pokazale konzistentnost u odnosu na minorne varijante koje su se razlikovale od referentnih sekvenci na različitim pozicijama, što ove varijacije opet ne može proglasiti kvazispecijesnim vrstama (Eigen, 1996).



Slike 13. i 14. Thai sacbrood virus – klinički nalaz na leglu *A. cerana*
(Foto: S. Devanesan©, 2006, preuzeto iz knjige autora)

Soj virusa mješinatog legla koji je izolovan iz larve *Apis cerana* sa Tajlanda (Bailey, 1982) čini se da je široko rasprostranjen kod ove pčelinje vrste u Jugoistočnoj Aziji.

Vrlo je sličan sa virusom mješinstog legla kod *A. mellifera*, ali posjeduje neke određene razlike u odnosu na virulentnost i patogenost. Bolest izazvana ovim virusom naziva se *Thai Sacbrood disease*. Prisustvo Thai Sacbrood virusa u pomoru *Apis ceranae indica*, 80-ih i 90-ih godina u sjevernim dijelovima Indije nanijelo je značajne gubitke pčelarstvu tog dijela svijeta. Proučavajući simptomatologiju, Steeven Devanesan (2006) utvrdio je da se kod ovog tipa mješinstog legla pojavljuje promijenjena struktura i boja larve. Larve mijenjaju njihovu boju iz bijele u svijetložutu, padaju na dno sušeći se, dobijaju smeđe-crnu boju već poslije 15 dana od momenta infekcije. Uginula osušena larva poprima karakterističan izgled zakrivljenosti (kao čamac). Uginule larve leže ispružene na leđima, a izgledaju kao mješine ispunjene mliječnobijelom tečnošću. Ove larve prilikom izvlačenja lako pucaju. Pčele njegovateljice nastoje ukloniti uginule larve te ih se kod masovnijih infekcija može naći ispred košnice. Zajednica progresivno slabi, što dovodi, na kraju, do uginuća zajednice. Ovaj proces sa jako brzo širi unutar košnice, a ramovi imaju izgled rasutog legla. Virus je uzročnik najznačajnije bolesti pčela kod vrste *A. cerana* (Devanesan, 2006).

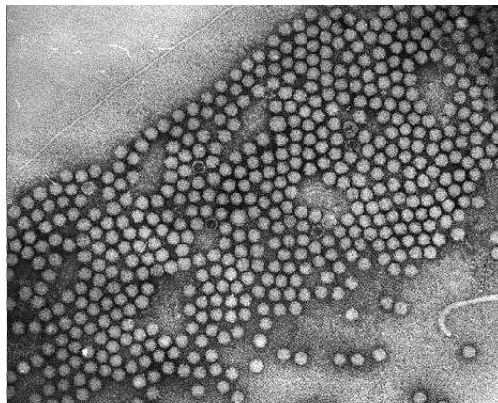


*Slika 15: Geneza patološkog procesa larve inficirane sa Thai-SBV
(foto: S. Devanesa©, 2006, preuzeto iz knjige autora)*

Thai sacbrood virus naročito je virulentna i patogena varijanta virusa mješinstog legla. Godine 1979, virus je bio odgovoran za nestanak 95% zajednica *Apis cerana Indica* u sjevernoj Indiji. U toku osamdesetih godina, ovaj virus se proširio na gotovo sve dijelove sjeverne Indije, a u periodu 1991–1992. veliki gubici registrovani su na jugu Indije.

Virus akutne paralize pčela, *Acute Bee Paralysis virus* (ABPV)

Virus akutne paralize pčela nalazi se i u naizgled zdravim odraslim pčelama, naročito u toku ljeta, ali donedavno nije bio udružen sa značajnim oboljenjima i uginućima pčela u prirodi. U kontinentalnoj Evropi i Sjevernoj Americi, sojevi virusa paralize udruženi sa invazijom *Varroa jacobsoni* doveli su do kliničke slike uginuća kako adulta tako i njihovog legla (Ball and Alen, 1988; Hung et al., 1996).



Slika 16. Elektronska mikroskopija virusa ABPV. <http://www.chdphd.com>

Postoje najmanje dva različita genetska podstabla u odnosu na postojeće ABPV viruse. Glavnu granu čine uzorci iz Amerike i Engleske, dok drugu granu čine kontinentalnoevropski izolati (Govan et al., 2000).

Varroa je zapravo faktor koji dovodi do multiplikacije virusa. Na tijelu pčele u toku normalnog životnog ciklusa *Varroae* koji je uvijek parazitaran, hraneći se naizgled zdravim, ali virusom inificiranim pčelama, dovodi do toga da se virus brzo širi unutar pčelinje zajednice i postaje smrtonosan. Visoka koncentracija ABPV nalazi se uvijek tamo gdje su pčelinje zajednice uginule od varoze. *Varroa destructor* je vrlo reprezentativan vektor za ABPV. Grupa njemačkih autora (Siede R. et al., 2008) u toku 2004. i 2005. godine posmatrali su jedanaest njemačkih pčelinjaka, prateći faktore koji su se odnosili na prezimljavanje. Utvrđivali su stepen jesenske *Varroa* infestacije i jačinu društava prije i nakon zimskog pregleda. Kod košnica koje su preživjele, tri od njih su slučajno bile izabrane da se utvrdi prisustvo i količina ABPV. Svi uzorci pčela porijeklom od košnica sa anamnezom kolapsa bile su visokoinficirane sa ABPV. Utvrđen je i značajan broj varijacija u odnosu na ABPV i posljedice u toku dvije godine posmatranja uticaja na društva između pojedinih pčelinjaka i, u svakom slučaju, povećan udio ABPV infekcije na određenim pčelinjacima i društvima uvijek

je prethodio uginuću košnica, što govori o tome da je količina ABPV virusa u jesen u direktnoj korelaciji sa lošim prezimljavanjem zajednica.

Mehanizmi ovakve virusne indukcije nisu još sasvim jasni. Odrasla ženka krpelja biva inficirana virusom, hraneći se na inficiranom domaćinu i dovodeći sebe u funkciju vektora koji je u stanju da prenese virus akutne paralize na druge odrasle pčele ili lutke unutar njihovog razvojnog perioda unutar legla. Odrasle pčele inficirane virusom, u kojima se virus aktivno multiplicira, mogu inficirati mlade larve sekrecijom velike količine virusa unutar hrane. U teško inficiranim pčelinjim društvima, populacija odraslih pčela se rapidno smanjuje, a simptomi na oboljelom leglu mogu nalikovati ili biti pripisani onima koji nastaju kod američke ili evropske gnjiiloće. Shimanuki et al. (1994) saopštavaju da je uobičajno ugibanje odraslih pčela i smrtnost u leglu kod košnica inficiranih sa *V. jacobsoni* koji nije bio u tako velikom brojnom odnosu da bi izazvao uginuća, ali se efekat virusa pripisuje ovakvoj koincidentnoj infestaciji.

Kašmirski virus pčela, *Kashmir bee virus* (KBV)

Kašmir virus (KBV) i virus akutne paralize posmatrani su u početku zajedno, bez njihove serološke sličnosti i činjenice da su u stanju inficirati odrasle pčele na vrlo sličan način. Kašmirski pčelinji virus prvi put je detektovan kod azijske pčele *Apis cerana* iz Kašmira (Baily and Woods, 1977).

Nekoliko vrlo sličnih, ali različitih sojeva ovog virusa identifikovano je i kod *A. mellifera*, na različitim regionima Austarlije (Bailey et al., 1979), gdje je virus bio odgovoran za nekoliko teških žarišta, izazivajući visok mortalitet i kod odraslih pčela i na leglu. Kao i virus akutne paralize pčela, soj kašmirskog pčelinjeg virusa perzistira kao inapartentna infekcija odraslih pčela i lutke (Andreson and Gibs, 1988), što znači da se i on može aktivirati i multiplicirati do letalnog nivoa posredstvom *V. jacobsoni*. Svi sojevi kašmirskog pčelinjeg virusa su visokovirulentni: samo nekoliko čestica virusa potrebno je za infekciju, a virus se umnožava vrlo brzo kada prisprije u hemolimfu odrasle pčele ili larve, izazivajući uginuće u roku od tri dana. Sojevi kašmirskog virusa pčele su široko rasprostranjeni u SAD-u (Bruce et al., 1995).

Kašmirski pčelinji virus (KBV) otkriven je kod pčela u različitim dijelovima Azije, ali sada se već zna da je prisutan u dijelovima USA i nekim dijelovima Evrope (Norman

Carreck, 2009). Ovaj virus je dokazano fatalan nakon laboratorijskih infekcija pčela, a dokazano je da je *Varroa destructor* u stanju prenijeti KBV. Takođe je dokazan direktan prenos sa pčele na pčelu. No, iako laboratorijski veoma patogen, u prirodi nema takve efekte.

Virus crnog matičnjaka, Black Queen Cell Virus (BQCV)

BQCV prvi put je identifikovan kao uzrok uginuća larve matice ili matice u fazi prepupe nakon njihovog poklapanja u matičnjaku, što dovodi do potamnivanja (od smeđeg do crnog) matičnjaka spolja.

Oboljele larve imaju svijetložuti izgled i u startu liče na one oboljele od mještinastog legla, ali za razliku od patogenog efekta tog virusa, virus crnog matičnjaka ne može se umnožiti kada se njime hrane mlade radiličke larve ili mlade odrasle pčele. Kada se ovaj virus vještački injektuje u larvu, on počinje da se umožava do fatalnog ishoda u inficiranoj larvi. Virus crnog matičnjaka, filamentozni virus i Y virus ranije su posmatrani zajedno zato što su veoma blisko udruženi sa prisustvom parazita *N. apis*, a na svaki drugi način oni su potpuno različiti (Bailey et al., 1981, 1983b).



Slika 17. Desno izgled matičnjaka sa BQCV promjenama, (autor Topolska©)

Virus egipatske paralize pčela

Egipatski pčelinji virus dokazan je jedino kod odraslih pčela u Egiptu, i o njegovoj prirodnoj istoriji nedovoljno se zna. Novija istraživanja nisu obuhvatila ovaj virus.

Virus spore paralize pčela, Slow bee paralysis virus (SBPV)

Ovaj virus dokazan je slučajno u toku laboratorijskih eksperimenata za dokaz pčelinjeg virusa X. Izaziva mortalitet kod pčela nakon što se injektuje u hemolimfu, a

inficirane individue tipično pate od paralize prednja dva para nogu dan-dva prije njihovog uginuća. Virus vjerovatno postoji u formi inaparentne infekcije na vrlo sličan način kao i virus akutne paralize, a njegovo umnožavanje može biti posljedica hranjenja *Varroe*.

Nema više saznanja o prirodnoj istoriji ovog virusa.

Virus spore paralize je počeo pokazivati značajan mortalitet pčelinje zajednice, ali samo onda kada je bio istovremeno udružen sa patogenim uticajem *V. jacobsoni* (Ball, nepublikovane observacije).

Neklasifikovani virusi

Ova grupa virusa odnosi se na slabo karakterisane viruse pčela koji imaju nisku virulentnost. S obzirom na efekat koji ima *Varroa* na virusne infekcije DWV i ABPV, postoji opasnost da bi i ova grupa virusa mogla postati uzrok uginuća pčela u budućnosti.

Nema puno podataka o simptomima ovih infekcija: laboratorijska ispitivanja kod dvjesto normalnih, slučajno uzorkovanih košnica u periodu od četiri godine u Britaniji pokazale su da virus crnog matičnjaka i Y virus skraćuju dužinu života svake pojedinačne pčele, a da su ugibanja košnica u zimskom periodu bila značajno veća tamo gdje su one bile inficirane virusima, u odnosu na one kod kojih je postojalo pristustvo samo *N. apis*. Isti trend zapažen je i kod filamentoznog virusa sa manjim nivom značajnosti (Bailey et al., 1983).

***Apis mellifera* filamentozni virus (AmFV)**

Opisan je prvi put 1961. godine u Švajcarskoj, a građen je od jednog dugog filamentoznog proteina koji se zavija u tri prostorne figure sa osam zavojnica, štapićastog oblika viriona. Filamentozni virus identifikovan je i u Sjedinjenim Američkim Državama (Clark, 1978.). Filamentozni virus je pronađen još i u Rusiji i Japanu.

Virus ima DNK genom, replicira se u masnom i ovarijalnom tkivu odraslih pčela, a jedan od simptoma ove infekcije jeste mliječnobijeli izgled hemolimfe teško inficiranih pčela sa sadržajem velikog broja virusnih partikula. Na osnovu dosadašnjih

saznanja, ovaj virus ne prenosi se *Varroa*. Nisu prepoznati drugi simptomi infekcije ovim virusom. Mogao bi biti pridružen *N. apis* infekcijama sa najčešćim pojavljivanjem u proljeće (Clark, 1978).

Pčelinji X (BVX) i pčelinji Y virus (BVY)

Ovo su dva vrlo slična virusa odraslih pčela: oba su okrugli virioni veličine 35 nm, RNK genoma (Bailey and Ball, 1991), a pronađeni su na teritoriji Sjeverne Amerike, Australije i Evrope.

BVX virusi su prirodno pridruženi protozoarnom parazitu *Malpigiella mellificae*. Izazivaju dizenterične forme bolesti, naročito u slučajevima nižih temperatura zajednice (35°C), sporo napreduju i čini se da su tipična zimska virusna bolest (Ribiere et al., 2008).

Pčelinji virus X je serološki različit od virusa Y, ali je gotovo nemoguće odvojiti ga na osnovu fizičkih i hemijskih karakteristika. Takođe se multiplicira kod odraslih pčela nakon ingestije, ali ne i onda kada se injicira direktno u njihovo hemolimfu, što ga svodi na iste patološke mehanizme kao i virus Y.

Virus X nije u direktnoj relaciji sa *N. apis* i najčešći je sredinom zime, kada je i više virulentan. U Britaniji, pčelinji virus X je udružen sa infekcijom protozoe *Malpigiella mellificae*, nađenim u toku zimskih uginuća, ali nije u direktnoj vezi sa tim parazitom kao što su drugi virusi zavisni od *N. apis*, jer se na isti način multiplicira u pčelama i u prisustvu i u odsustvu *Malpigiella mellificae*.

Virus se može širiti naročito posredstvom fekalne kontaminacije kod pojave dizenterije koja je vrlo česta u isto vrijeme kada dizenterija nastaje sa *Malpigiella mellificae*.

Virus BVY se vezuje za *N. apis* infekcije, oštećuje crijevo odraslih pčela, a smatra se da je pojava *Nosema ceranae*, novog parazita, značajno doprinijela incidenci ovog virusa koji takođe ima mogućnost razvoja na nižim temperaturama i dužim inkubacijama. Pčelinji virus Y multiplicira se kada se on unese *per os* od strane odraslih pčela, ali nije u stanju učiniti to isto nakon injekcije u samo tkivo, što znači da je njegova replikacija svedena samo na crijevni trakt.

Smatra se da, iako do sada nije pokazana direktna veza između X i Y virusa i *Varroa*, postoji opasnost da bi u budućnosti ovaj vektorski transmisioni put mogao biti značajan (Ribiere et al., 2008).

Virus zamućenih krila, Cloudy Wing Virus (CWV)

Povezuje se sa simptomom zamućenosti odnosno neprozirnosti krila odraslih pčela. Ovo je također RNK virus koji se sastoji od oko 1500 nukleotida. Spada u grupu manjih pčelinjih virusa (17 nm). Kod pčela može dovesti do skraćenja dužine života i infekcija torakalne muskulature. Prenos ovog virusa je još uvijek nepoznat. Virus je dokazan u leglu, ali nije bilo uspjeha prilikom vještačke infekcije legla. Nije dokazano da *Varroa* utiče na transmisiju ovog virusa. Prirodna prevalenca je oko 15%, sa malim sezonskim varijacijama, a ponekad se može dovesti u vezu sa uginućima pčelinjih zajednica (Carreck et al., 2010).

Ovaj virus je vrlo čest kod pčela koje pokazuju kliničku sliku u kojoj krila postaju zamućena, manje prozirna, iako to nije jedini simptom ove infekcije. Dokazuje se serološki. Životni vijek pčela je skraćen, a pčelinja društva sa velikim stepenom infekcije ugibaju. Virusne partikule su izuzetno male, pretpostavlja se da infekcija nastaje aerogeno, jer je u laboratorijskim uslovima dokazno širenje infekcije između kaveza inkubiranih zajedno u laboratoriji. Nema sezonalne varijacije, što dokazuje da različiti faktori dovode do multiplikacije i širenja virusa unutar društva, a u vrijeme ispitivanja (Bailey et al., 1980a) da je oko 15% društava u Britaniji bilo inificirano ovim virusom. Virus je dokazan i u Evropi, Sjevernoj Americi i Egiptu.

Pčelinji iridescetni virus, Apis iridescent virus (AIV)

Apis iridescetni virus pripadnik je iridovirusa sa 140 nm velikim igzoedralnim virionom (DNK), unutrašnjom membranom i jednim spoljašnjim proteinskim omotačem. Pronađen je kod velikog broja insekata i kičmenjaka.

Virus je ime dobio zbog stvaranja kristalnih masa koje se formiraju u pročišćenim kulturama i tkivima na mjestu njihovog umnožavanja koji, osvijetljeni bijelom svjetlošću, iluminiraju plavo-ljubičastom ili zelenom bojom, što je lako vidljivo

mikroskopskim ispitivanjem jer su inficirane ćelije svijetloplave boje u odnosu na okolinu normalno bjeličaste boje tkiva.

Ovaj virus se multiplicira u većem broju različitih tkiva: masnom tkivu, digestivnom traktu, hipofarngialnim žlijezdama i jajnicima pčele.

Virus je bio jedan od patogena koji je dodat listi faktora udruženim sa CCD (Bromenshenk et al., 2010), mada, kao i sva prethodna ispitivanja CCD-a, nije dao jasne korelacije da je jedan od faktora koji izaziva CCD.

Virus je povezan sa simptomima opisanim kao *Clustering disease Apis cerana* u Indiji, naročito u toku ljeta jer se dijelovi društva prikupljaju u manje nakupine pčela koje ne mogu letjeti, koje kao takve padaju ispred košnice. Ovako inficirana društva jednostavno nestaju unutar dva mjeseca od prvih vidljivih simptoma, mada simptomi mogu nestati u vrijeme pojačane nektarske paše. Bolest po svojim osobina vrlo liči na bolest opisanu kod hronične paralize. Pronađen je u Kašmiru i Sjevernoj Indiji i vezan je za azijsku pčelu *A. cerana*, iako se može umnožavati i vještački na *A. mellifera*.

Arkanzas pčelinji virus (ABV)

Ovaj virus je otkriven na teritoriji Arkanzasa, USA, kada se iz naizgled zdravih lokalnih pčela njihov ekstrakt polena nošenog od sakupljačica davao zdravim zajednicama. Pčele injektirane ovim virusom ugibaju nakon 14 dana bez ikakvih simptoma bolesti (Baliey and Woods, 1974). Ovaj virus nije pronadjen izvan Amerike.

Berkeley virus (BBPV) i Macula like virus

Ovo su virusi o kojima se još uvijek malo zna, što zbog njihovog lokalnog pojavljivanja i detektovanja, što zbog nepostojanja sekvencioniranih genoma. O njihovom uticaju na zdravstveni status pčelinje zajednice potrebno je imati više informacija.

Neke osobine virusnih infekcija pčela

Osobina virusne infekcije kod pčela je perzistentnost, što se vidi kroz nizak nivo replikacije virusa ili kroz normalan titar distribucije.

Odgovor domaćina ima mnogo nivoa, mogućnost adaptacija na infekciju, te je progresija bolesti logaritamski linearan odnos sa titrom patogena, što se onda manifestuje na kritičnu granicu oštećenja odnosno patogenitet. Epidemijski nivo virusnih infekcija ima zavisnost od načina transmisija, statusa infekcije u zajednici (da ili ne), a u zavisnosti od titra virusa razlikuje se asimptomatski ili simptomatski ispoljena infekcija. Različiti putevi širenja infekcije, različita pravila odnose se i na progresiju epidemije. Izvor žarišta, putevi širenja i virulentnost u odnosu na inficirane i neinficirane jedinke čine virusne infekcije pčela vrlo kompleksnim (de Miranda, Amsterdam <http://www.coloss.org/documents/COLOSS-Proceedings-Workshop-Amsterdam-2010-final.pdf>)

Kašmirski virus (KBV) i virus deformisanih krila (DWV) su u svojoj patologiji blisko udruženi sa *Varroa* infestacijom, što dovodi do zaključka da bi oni mogli biti glavni patogen u društvima u kojima se pojavljuje kolaps i vjerovatno jedan od razloga nekonzistentnosti podataka koji povezuju stepen infestacije *Varroa* sa kolapsom. U eksperimentima koje su uradili Miranda et al. (2010) početak razmatranja problema bio je u prvom redu sekvencioniranje genoma oba pomenuta virusa. KBV sekvencija je slična onoj kod ABPV – gotovo 70% sličnosti na nivou nukleotida i aminokiselina. Ovi podaci se slažu sa prethodnim podacima o serološkoj sličnosti između ova dva virusa. DWV ima stvarni pikorna genom. Antitijela koja će se koristiti za mapiranje funkcionalnih proteina virusnog genoma dovešće do istraživanja virusne replikacije i genske ekspresije da bi se na taj način izvršila lokalizacija virusa u pčelama, kao i u krpeljima.

Podrazumijeva se da je status perzistentne inaparentne infekcije okarakterisan vrlo niskim nivoom virusne replikacije. Visok replikacioni nivo i kratko vrijeme generacije su pretpostavke za jedinstvo kompleksnosti unutar molekularnih varijacija RNK virusnih populacija. Većina virusa pčela teško može dokazati koncept „kvazispicijesa“ sve dok virusna populacija ne bude izolovana iz uzoraka koji pokazuju jasnu sliku akutne i produktivne infekcije. Ovo bi bilo vrlo lako dokazati kod mještinastog legla i virusa deformisanih krila jer oni izazivaju vidljive kliničke

simptome u toku infekcije. Iako ne postoje jasni simptomi za ovu infekciju, ovaj virus je deklarisan kao najvirulentniji poznati virus pčela. On je letalan za pčelinju zajednicu i uzrok je uginuća unutar tri dana posteksperimentalne inokulacije vrlo niskim infektivnim dozama. Opisana virulentnost KBV, kombinovana sa nedostatkom dijagnostičkih simptoma, ostavlja mogućnost da su gubici pčelinjih zajednica od KBV mnogo češći nego što je to prethodno bilo prepoznato. KBV pokazuje stečeni diverzitet, što je jasno vidljivo kroz izučavanje njegove proteinske strukture, što ga stavlja u poziciju da može biti tretiran i analiziran kao virus sa kvazispecijusnom prirodom.

U slučaju koincidence infekcije pčela od akutne *N. apis* infestacije nakon koje je izvršena jedna oralna infekcija APV, uginuće kod radilica može biti pripisano gotovo sasvim nozemozi. Naknadna APV infekcija nije pokazala nikakav efekat. Oralna apsorpcija APV sasvim sigurno ne može biti uzrok mortaliteta pčela. Značaj barijere na nivou srednjeg dijela crijeva prevenira pristup agensa. Ukoliko bi se virus injektirao u abdomen pčele, bio bi to isti slučaj sa zaražavanjem kojim *Varroa* vrši transfer APV u njenom patološkom djelovanju, kada do povećanja mortaliteta dolazi odmah prvog dana zbog djelovanja APV virusa. U ovom slučaju zaražavanja, infestacija *N. apis* ne pokazuje nikakav efekat. Rezultati pokazuju da ne postoji niti potencirajući niti antagonistički efekat između oba patogena *N. apis* i APV (Ritter et al., 1984).

Osjetljive molekularne tehnike dokazale su prisustvo pčelinjih virusa u naizgled zdravim društvima, ponekad i u jako visokim titrima (Tentcheva et al., 2004).

IAPV je vrsta dicistrovirusa koji se najčešće spominjao kao glavni uzročnik globalnog problema nazvanog kolaps pčelinje zajednice (CCD).

Izraelska grupa naučnika (251 Eyal Maori, Pg. 146. Apimondia 2009 congress, France, Montpellier, Scientific programe, zbornik apstrakata) proučavala je izraelski tip virusa akutne paralize i dinamiku odnosa virus–domaćin. Interesantan je nalaz da su, korištenjem molekularnih metoda, pronađeni dijelovi IAPV inkorporirani u pčelinji genom tako da su pčele zapravo bile nosioci jednog ugrađenog virusnog segmenta i pokazivale osobine na virus rezistentnog fenotipa. Ova izmjena genetske informacije između IAPV i domaćina pčele je recipročna, sekvenca pčele je nađena i

pripojena jednom dijelu IAPV tzv. defektivne RNK (dRNK). Dokazano je da IAPV virioni nose druge tipove dRNK: neki od njih su rekombinante različitih genomskih dijelova IAPV, a drugi su rekombinante IAPV sa drugim dicistrovirusnim RNK materijama. U ovom nalazu krije se mogući način kontrole ove virusne infekcije jer je hranjenje pčela sa dvostruko zavojitom RNK (dsRNK) efikasno i aplikativno te se govori o nastanku nove RNK i tehnologije u kontroli u virusnih bolesti, kao i CCD.

Neki virusi su u stanju propagirati se i kod vertebrata i kod avertebrata, mnogi od njih se prenose artoprodnim vektorima na ljude (zoonotski arbovirusi) i mogu izazvati teška oboljenja (*Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bunyaviridae*). Nameću se značajna praktična pitanja od strane pčelara: radeći oko pčela i sa medom, pčelari su vrlo često u bliskom kontaktu gotovo kontinuirano izloženi virusima pčela. Dosadašnja iskustva pokazala su da virusi mogu promijeniti prirodnog domaćina i na taj način kreirati jednu novu bolest prethodno neregistrovanu kod domaćina (npr. HIV, SARS, etc.), te nije bez razloga i zahtjev da se razmotri rizik koji bi virusi pčela mogli imati na zdravlje ljudi. Ono što se do sada zna jeste da se mogu napraviti samo ograničene pretpostavke na osnovu dosadašnjih saznanja o evolucionarnoj istoriji pčelinjih virusa.

Filogenetsko stablo pokazalo je da se virusi pčela mijenjaju jako sporo i da su striktno adaptirani na jednog domaćina. Na osnovu toga zaključeno je da su virusi pčela veoma mali rizik po zdravlje ljudi. Koliko je poznato, za sada, zoonotski potencijal virusa pčela u odnosu na čovjeka je isključen.

Prevalenca i epizootiologija virusa pčela

Prve radove sa tematikom virusnih infekcija pčela sa teritorije bivših jugoslovenskih zemalja dao je u to vrijeme autor dr Kulinčević radovima u Americi, proučavajući viruse kod zajednica napadnutih *Varroa jacobsoni* sa teritorije Jugoslavije, (Kulinčević et al., 1990).

Grupa švajcarskih autora (Hélène Berthoud et al., 2010) uzorkovala je uginuća ili uzorke slabih naizgled zdravih košnica u kontroli sa zdravim košnicama susjednih pčelinjaka, analizirajući pul od 50 uzoraka pčela na ABPV, DWV, CBPV i KBV. Rezultati su pokazali da KBV nije bio prisutan ni u kontrolnim ni u uginulim društvima. U kontrolnim društvima ABPV nije utvrđen, a DWV titar je pronađen u

25% ispitivanih društava. U uzorcima iz oboljelih zajednica sve zajednice su bile pozitivne na DWV u veoma visokim virusnim koncentracijama. Oko 70% ispitanih zajednica koje su bile oboljele bile su pozitivne na ABPV. To ukazuje da su opservacije između zdravih i oboljelih društava pokazale da ABPV i DWV mogu imati značajnu ulogu za uginuća društava u toku zime, na način da virus smanjuje dužinu života iako se drugi faktori, kao što su visina virusnog titra i značajnost krpeljske infestacije moraju i dalje proučavati.

U istraživanjima sprovedenim u maju, julu i septembru 2005. i toku zime 2005. i 2006, uzorci sa dvadeset tri austrijska pčelinjaka (H. Koglberger, I. Derakhshifar, J. Kolodziejek, N. Nowotny 2006) ispitivani su na prisustvo *Nosema apis*, *Malpigiella mellifica*, iz abodomena dvadeset pčela, a preostali dio uzoraka bio je obrađen korištenjem RT-PCR protokola na prisustvo šest pčelinjih virusa. U toku ovog ispitivanja utvrđeno je da je *Malpigiella mellifica* nađena u jednom uzorku uzetom u toku ljeta, juli (2%), *Nosema apis* u 68% uzoraka u toku maja, 46% u julu i 33% u septembru, a 38% u toku zimskih uzoraka. Virusno prisustvo KBV i CBPV nije pronađeno, dok je virus ABPV nađen 2% u maju, 57% u julu i 52% u septembru, SBV 44% u maju, 72% u julu i 50% u septembru, BQCV 67% u maju, 46% u julu i 43% u septembru, te DWV 25% u maju, 11% u julu i 24% u septembru.

Ukupno 160 uzoraka košnica sa 49 pčelinjaka testirano je (Siede R. et al., 2008) na prisustvo virusa ABPV, SBV i BQCV. Radilice od najmanje tri društva po pčelinjaku uzorkovane su u zimskom periodu 2001–2002, maj 2002. i septembar 2002. godine. Pulirani RNK ekstrakti od 10 pčela iz svake košnice testirani su sa RT-PCR. ABPV utvrđen je u 34%, SBV u 33% i BQCV u 46% kod svih zimskih uzoraka. SBV i BQCV utvrđivanje virusa na zimskim uzorcima pokazalo je slučajna spacijalni izgled (*random spatial pattern*), kao što je pokazano i u susjednim analizama pčelinjaka, gdje je $R_n=0.85$ i 0.90 . Tendencija stvaranja klastera u slučaju ABPV bila je $R_n=0.67$. Ovi nalazi govore da je zdravstvena situacija u odnosu na virusne bolesti pčela djelimično zavisna od pčelarske prakse.

Grupa holandskih naučnika (Jozef van der Steen, 2008), na uzorku od 170 slučajno izabranih pčelinjaka širom zemlje, utvrdila je prisustvo bolesti u sljedećim procentima: KBV 0%, DWV 16%, BQCV 92%, SBV 40%, CPBV 0%, IV-iridescentni virus 0% i ABPV 0%. Pri ovom istraživanju, svi uzorci sa pčelinjaka su u određenoj količini pulirani (svaki pčelinjak je bio predstavljen sa pet društava), a

radilo se o klinički zdravim društvima. Ovi rezultati se nisu odnosili na pojedinačnu pčelinju zajednicu, nego na zdravstveni status cijelog pčelinjaka.

Istraživanje u Tajlandu (Sirikarn Sanpa, Panuwan Chantawannakul, 2009; Apimondia 2009), na 46 zdravih košnica uz primjenu RT-PCR detektovao je prisustvo šest virusa pčela iz uzoraka adultnih pčela i larvi. Kod adultnih oblika najprevalentiji je bio virus DWV (33% uzoraka), ABPV (20%), te SBV (4%). U slučaju nalaza virusa kod larvi prevalenca je iznosila: DWV 63%, ABPV 46%, SBV 11% i KBV 4%. Iz prikupljenih uzoraka *Varroa destructor* pronađeno je jedino prisustvo DWV (58%). BQCV i CBPV nisu uopšte utvrđeni niti na jednoj zajednici SBV (30%) (Rudolf Mossbechofer et al., 2008).

Ispitivanje prevalencije virusnih bolesti pčela u Austriji (Rudolf Mossbechofer et al., 2008) u periodu 2006–2007. godine dokazala je prisustvo četiri tražena virusa, gdje je prevalenca virusa izražena za svaki virus iznosila: DWV 65%, BQCV 47%, ABPV 45%. Ovi uzorci sakupljeni su kao uzorci ljetnih i zimskih pčela, a procedura je provedena na osnovu primjene optimizovane metode (Bereny et al., 2006). Od ukupno ispitanih 110 uzoraka pčela (košnica) koji su pokazivali različite simptome bolesti ili su već bile uginule, samo pet uzoraka (19%) bilo je bez utvrđenog prisustva ijednog virusa.

U istraživanju provedenom u Sloveniji u periodu između 2006. i 2008. godine, (Gregorc, A., 2009) u cilju utvrđivanja virusnih infekcija kod matice utvrđeni su procenti infekcije: DWV 65%, BQCV 25%, SBV 8%, i ABPV 4%. Proučavajući uzroke letalnih i subletalnih efekata u kolabriranim košnicama metodom RT-PCR, utvrđeno je da je većina uzorkovanih radilica bila istovremeno inficirana sa oba virusa ABPV i DWV (64%), dok je pojedinačno DWV utvrđen u 22% slučajeva i ABPV u 5% ispitivanih društava.

Ispitujući prisustvo BQCV u komercijalnim centrima za uzgoj matice, Topolska (2008) poredila je informaciju nekih izvještaja iz Merilenda (USA) koji su govorili o prisustvu ovog virusa u 100% matice slučajno izabranih uzoraka, nastojeći pri tome dokazati razlike u stepenu BQCV infekcije na teritoriji Poljske sa četiri uzgojne jedinice u toku maja i avgusta mjeseca. U ovom istraživanju, virusi su dokazani samo u jednom pčelinjaku u oba perioda maj–avgust, a značajno je da su ispitivane matice bile slobodne od *N. apis* spora, što ih je navelo na zaključak da su se matice u tom

slučaju mogle inficirati kontaminiranom hranom u toku larvenog, prije nego zrelog stadijuma.

Virusne infekcije u centrima za proizvodnju matica

Kvalitet matice je jedan od glavnih faktora koji određuje uspjeh u pčelarstvu. Pčelari kupuju matice poželjnih svojstava najčešće u centrima koji se bave reprodukcijom ili selekcijom.

Proces uzgoja matica nije jednostavan, i različiti faktori (od kojih su virusne infekcije samo jedan od mnogobrojnih) mogu imati različite uticaje. Poljski autor (Topolska, 2008) je uginule matičnjake iz šest reprodukcionih centara ispitivala na prisustvo virusa BQCV, SBV i APV serološkim metodama AGID testa i RT-PCR za BQCV genom. BQCV je utvrdila kao faktor uginuća matice u leglu u 66% slučajeva. Inficirani matičnjak sadržavao je uvijene larve, prepupe i lutke u fazi bijelih ili crvenih očiju, koje su mijenjale boju od slabo žute do potpuno tamne. Procenat od 40% takvih inficiranih matica imale su matičnjake sa crnim zidovima. Najčešća manifestacija infekcije bila je klinički simptom svijetložuto obojene larve u normalnom matičnjaku u 27% slučajeva, a 12% matičnjaka imalo je djelimično ili kompletno zatamnjenje larve ili prepupe sa promjenama crnila na zidovima matičnjaka. SBV bio je prisutan u 87%, a APV u 2% matičnjaka. Larve su eksperimentalno inficirane prvog ili petog dana nakon izleganja iz jaja i ovo je jedan od prvih uspješnih eksperimentalnih infekcija u kojoj je dokazano da se larve mogu eksperimentalno inficirati virusom BQCV na način da ga larve unesu sa suspenzijom matične mliječi. Nije bilo razlike u osjetljivosti na infekciju virusom BQCV, bez obzira na to da li se ona dešavala prvog ili petog dana nakon izleganja iz jaja: sve larve su bile osjetljive na infekciju.

Porast saznanja o virusnim infekcijama pčela nije dao sasvim dovoljne informacije o statusu virusa kod matica. Koristeći RT-PCR dijagnostiku, status pojedinačnih matica i virusa su detektovali na različitim stadijumima razvoja pčela, kao i kod parazitske grinje *Varroa destructor* (Chen et al., 2004a; Chen et al., 2005). Tako, 29 matica koje su se nalazile na teritoriji Beltsvilla, MD, USA, i na ostrvu Sapelo korištene su u istraživanju. Studija je pokazala da adultne matice mogu biti nosioci multiplih virusa, iako nije bilo podataka o bolesti na maticama, svi virusi osim virusa akutne paralize

pčela dokazani su u sekvencionim analizama. Pokazalo se da RT-PCR specifične linije potvrđuju BQCV, CPBV, DWV, KBV, SBV virus. Procenat od 86% matice (n=29) bilo je pozitivno na BQCV, 14% je bilo pozitivno na CBPV, 100% pozitivno na DWV, 21% pozitivno na KBV i 62% pozitivno na SBV. Rezultati jasno pokazuju da matice mogu biti koinficirane multiplim virusnim infekcijama istovremeno. Od 29 matice, 93% imalo je multiplu virusnu infekciju sa dva, tri, četiri ili čak pet virusa. Iako rezultati pokazuju da se virusi mogu naći kod matice, oni ne daju jasnu sliku kako ove infekcije mogu uticati na ponašanje ili na fiziologiju matice.

Uticaj virusa DWV na maticu i održivost pčelinje zajednice proučavala je grupa francuskih naučnika (Laurent Gauthier, 2008) koja je dokazala da je DWV virus sa najvećom prevalencom u odnosu na ostale viruse pčela. Široko je rasprostanjen u cijelom svijetu, a nalazi se pridružen infestaciji sa *Varroa destructor*, koja je njegov glavni vektor. Dokazano je da se virus prenosi vertikalno sa matice na radilice i trutove, a detektovan je u mnogim različitim tkivima pčele. Dokazivanjem prisustva DWV RNK u masnom tkivu matice utvrđena je činjenica da oštećenje ovog vitalnog fiziološkog tkiva dovodi do patološkog uticaja na snagu pčelinje zajednice.

Proučavanjem 10 najčešćih virusnih infekcija kod oplodjenih matice, utvrđeno je šest virusa: virus deformisanih krila (DWV), *Varroa destructor* virus (VdV), virus crnog matičnjaka (BQCV), virus mješinstog legla (SBV), izraelski tip virusa akutne paralize (IAPV), kašmirski pčelinji virus (KBV). Najčešći nalaz je ipak bio u detekciji DWV i VdV, a prilikom sekcije ovarijuma utvrđena je tipična slika celularnih oštećenja kao posljedica ove infekcije.

Grupa naučnika istraživačkog centra UC Davis, USA, u saopštenju Apimondia 2009, na čelu sa Johnom Pollardom i Susan Cobey, pronašla je interes u razvoju embriotransfera u proizvodnji matice koje bi bile slobodne od uobičajenih patogena, a dominantno bi se tražio status zajednica koje bi bile slobodne od nekih uzročnika virusnih infekcija pčela. Ova nova tehnologija, koja nije nimalo jednostavna, obećava mogućnosti i metode eventualnog načina kontrole agresivnih patogena. Za sada, uspješnost u proizvodnji matice dobijena je u 42% slučajeva pokušaja proizvodnje SPF matice. Na ovaj način dobijene matice u zajednicama u koje su unošene imaju normalan procenat prihvatanja 86%, a vrijeme polaganja jaja već petog dana sa vrlo kvalitetnim razvojem legla, kao i uspješnim preživljavanjem.

<http://beebiology.ucdavis.edu/RESEARCH/index.html>

Da su oplođivački letovi putevi vertikalnog prenosa virusa istraživali su njemački stručnjaci (Yanez, O. et al., 2012) i dokazali da, iako postoje podaci o značajnoj selekciji u odnosu na kvalitet simetrije krila, nije pronađena razlika između količine infekcije DWV kod trutova u zoni oplodnih letova u odnosu na količinu DWV u njihovim matičinim košnicama, što potvrđuje da se u fazi asimptomatske infekcije virus DWV uspješno adaptirao i vertikalno prenio na trutove.

Dijagnostičke metode u dokazivanju virusnih infekcija pčela

Kvalitetna dijagnoza patogena, te potreba za određivanjem adekvatnog ispitivanja u odnosu na kvatitet uzorka, jeste izazov za sve protokole kojim se nastoji urediti ili standardizovati virusna dijagnostika i kod *Apis mellifera*.

Vrlo često, veći broj različitih pčelinjih virusa koegzistira u formi inaparentne infekcije (Balley, 1976) te je nemoguće izvršiti prepoznavanje kliničke slike virusnih infekcija na osnovu samo terenskih ispitivanja.

Pravilna detekcija bolesti i izbor metode od izuzetnog su značaja u smislu pravilnog odabira dijagnostičke metode, kao i vremena u kojem one mogu spriječiti odnosno smanjiti negativne efekte širenja bolesti.

Na osnovu kriterijuma iz knjige *Merck Manual of Diagnosis and therapy*, www.merckmanuals.com/professional/index.html, dijagnostičke metode laboratorijske dijagnostike klasifikovane su kao procedure kojima se u uzorku dobija čista kultura, sa mogućnošću mikroskopske identifikacije i kao serološko-imunološke metode te metode na bazi detekcije nukleinskih kiselina. Svaka od nabrojanih metoda ima prednosti i nedostatke u odnosu na dijagnostiku mikrobioloških agenasa, kao i u oblastima različitih istraživanja na terenu. Postoji nekoliko različitih dijagnostičkih pristupa u dokazu virusnih infekcija pčela, od kojih svaki ima neke prednosti i nedostatke, što je prikazano okvirno u tabeli br. 1.

Tabela 1. Poređenje različitih dijagnostičkih metoda i nekih ključnih karakteristika u dijagnostici virusa pčela

	Klinička slika	Mikroskopija	Serologija	Molekularna dijagnostika
Senzitivnost	-	+	±	+
Specifičnost	±	±	+	+
Pouzdanost	±	-	+	+
Brzina	+	-	±	-
Jednostavnost	+	-	+	-
Cijena	+	-	±	-

Legenda: - loše; + dobro; ± srednje

Klinička slika

Dijagnostika na osnovu simptoma, tj. ispoljene kliničke slike je najjeftiniji, najbrži i najjednostavniji način kako se može dokazati virusna infekcija. Simptomi kod pčela vezani za virusne infekcije, zavisno od vrste virusa, opisuju se najčešće na razvojnim fazama zajednice na nivou legala kao mješnasto leglo, crni matičnjak, a na odraslim pčelama, kao crne masne grabljivice, deformisana krila, zamućena krila (Ioachim De Miranda Coloss/ Amsterdam 2011, www.coloss.org/proceedings).

Paraliza kod pčela je lako prepoznatljiv simptom, ali ona u pčelinjoj zajednici ima različite uzroke, uključujući i efekte nekoliko različitih virusa. Simptomi kod paralize postaju očigledni samo u slučaju visokih virusnih titrova, što znači da će perzistentne i asimptomatske infekcije koje imaju dugotrajan uticaj na zdravstveni status zajednice ostati nedetektovane. Istovremeno, prisustvo koinfekcije multiplim virusima ovakvu vrstu dijagnostike čini nepouzdanom.

Tabela 2. Klinička slika za pojedine virusne infekcije pčela

Bolest opisana kliničkom slikom	Virus	Klinička slika i/ili patološko-anatomski nalaz
Mješinsto leglo	SBV	Larve obično imaju izgled vodene mješine; počinju se raspadati, pri čemu vanjska ovojnica larve zadržava prvobitan oblik. Pri pokušaju izvlačenja ove tvorevine iz ćelija legala u najranijim fazama bolesti, ovojnica lako puca, prilikom čega dolazi do izlivanja nekrotičnog sadržaja. U kasnijim fazama patološkog procesa, uginule larve dehidriraju i ostaju sasušene nakupine detritusa, obično izgleda sasušene ljuške.
Bolest crnih matičnjaka	BQCV	Lutke matica ugibaju, a to za posljedicu ima prebojavanje zida matičnjaka u tamnosmeđu ili crnu boju. Obično se bolest češće primjećuje u intenzivnom uzgoju matica.
Bolest deformisanih krila	DWV	Mlade pčele imaju loše oblikovana krila, deformisanih formi, disfunkcionalna te takve ne mogu letjeti, iznenadna ili produžena slabljenja zajednica.
Akutna paraliza pčela	ABPV	Nagla uginuća većeg broja pčela koje obično nalazimo ispred košnica.
Hronična paraliza pčela	CBPV	U slučaju da bolest zahvati veći broj pčela, promjene se uočavaju kroz promjene ponašanja: pčele izlaze iz košnica, trepere krilima, skupljaju se u hrpice, ne mogu letjeti, zadak im je povećan, mogu imati proliv, česta su masovnija uginuća. Kod infekcija manjeg broja pčela pčele pokazuju više morfoloških promjena: pčele su sitne i sjajne, masnog izgleda, bez dlačica na zatku, imaju široko razmaknute ekstremitete, primjećuje se i njihova ukočenost, krila mogu biti oštećena.
Izraelska akutna paraliza pčela	IAPV	Naglo slabljenje i propadanje zajednice.
Kašmirska bolest pčela	KBV	Naglo slabljenje i propadanje zajednice.

Mikroskopska identifikacija virusa

Za dijagnostiku virusa potrebno je pripremiti preparate za elektronsku mikroskopiju, što nije jednostavno za potrebe rutinskih testova. Mikroskopija je jako korisna za određivanje lokacije virusa unutar inficiranog tkiva, što daje jasne informacije o vrsti virusa, kao i simptomima koje on može prouzrokovati. Zbog činjenice da mnogi virusi pčela imaju sličnu morfologiju, elektronska mikroskopija nije način kojim bi se ovi virusi mogli razlikovati.

Serološke metode dokazivanja virusa

Serološke metode baziraju se na primjeni specifičnih antitijela proizvedenih u procesima imunizacije životinja (najčešće zečevi ili miševi) sa pročišćenim virusnim partikulama ili proteinima. U dokazivanju virusnih infekcija pčela oni se najčešće koriste za rutinske imunoeseje, lateralno protočne testove, kao i za imunomikroskopiju (De Miranda, 2008). Serološka dijagnostika virusa pčela je specifična, senzitivna i može se primjenjivati u brzim terenskim testovima. Virus pčela pokazuju mnogo manje serološke varijacije, ali se i dalje razlikuju na nivou nukleotidnog filogenetskog statusa.

Nedostatak ove metode jeste što je reakcija između antitijela i antigena složen proces koji zahtijeva kontrolu kvaliteta dijagnostičkog sredstva, kalibraciju i standardizaciju testa za svako antitijelo, što ovakvu vrstu dijagnostike čini skupom.

Metode molekularne dijagnostike virusa pčela

Napredak molekularnih metoda značajno je olakšao proučavanje mikroorganizama.

Zavisno od vrste targetnog molekula, molekularni detekcioni metodi dijele se u dvije kategorije:

1. detekcija nukleinskih kiselina,
2. detekcija specifičnih proteina.

Najspecifičniji i najsenzitivniji dijagnostički metod bazira se na detekciji virusnih nukleinskih kiselina, odnosno genoma virusa. Specifičnost se bazira na stabilnoj i prepoznatljivoj sekvenci nukleinske kiseline za svaki virus. Senzitivnost ima uporište u činjenici da je vještačnom amplifikacijom moguće dokazati niske vrijednosti

targetnih nukleinskih kiselina. Ova vrsta dijagnostike je u poređenju sa drugim jednostavnija, brža, jeftinija, a omogućava da se neki uzorci ekstrahovanih materijala mogu bezbjedno razmjenjivati između različitih laboratorija, što rezultira kvalitetom evaluiranih rezultata. Glavni nedostatak ove dijagnostike jeste fragilnost nukleinskih kiselina, naročito RNK, što zahtijeva posebnu pažnju u toku prikupljanja uzoraka, njihovog transporta i konzervisanja.

Molekularne tehnologije su vrlo efikasno oruđe za specifično, senzitivno i brzo identifikovanje virusa pčela. Činjenica da su genomi nekih virusa pčela u potpunosti sekvencionisani (*GenBank Accesion*) čini molekularnu detekciju i karakterizaciju tih virusa mogućim koristeći RT-PCR metod. Viruse je moguće dokazati u različitim životnim stadijumima pčela i u različitim organima i tkivima inficiranih oboljelih pčela. Takođe, koristeći ovaj metod, moguće je dokazati viruse pčela i kod parazita *Varroa destructor* (Chen et al., 2005, 2004).

Molekularne metode u dijagnostici virusnih bolesti pčela danas ne spadaju u procedure koje su samo eksperimentalne. Radi se o procedurama koje će u budućnosti biti značajno pojednostavljene (multiplex PCR, qRT PCR), aplikativne, dostupne, ekonomski opravdane i suštinski neophodne. Oblast tzv. molekularne patologije samo je dio informacija koje treba uvesti u postavku Kohovih postulata virusnih infekcija *Apis mellifera*. Danas se znaju nukleotidne sekvence nekih, ali ne svih pčelinjih virusa, ali se njihov tropizam u odnosu na targetne ćelije ili organe, patološke mehanizme i virulentnost još uvijek ne zna. Istraživanja se mogu nastaviti u sljedećim pravcima:

1. istraživanje kompleksa biologije pčela kao holometaboličkih insekata,
2. nedostatak jasnih kliničkih simptoma otežava hipotezu o značaju virusa u odnosu na zdravstveni status pčela,
3. nemogućnost uspostavljanja sistema ćelijskih kultura na kojima bi se virus mogao propagirati,
4. najveći broj svih pčelinjih virusa je iz RNK grupe.

U vremenu svemogućih molekulanih dijagnostičkih metoda virusnih bolesti, javlja se i potreba za postizanjem Kohovih postulata infekcije, što za virusne bolesti znači ili biološki ogled ili primjenu virusnih kultura. Jedan od prvih radova iz te oblasti koji se bavi proučavanjem replikacije ABPV na primarnim ćelijskim kulturama porijeklom

od pčela bio je jedan od pionirskih pokušaja uspostavljanja kulture tkiva za virusološke studije ABPV (R. Siede/ OIE/ Freiburg, 2008) sa zaključcima da se primarne kulture mogu ostvariti na nivou primarnih ćelijskih kultura, ali se nisu uspjele proizvesti u kontinuirane ćelijske kulture. Na ovim kulturama bilo je moguće pratiti kinetiku multiplikacije ABPV, prilikom čega je uočena izuzetno brza replikacija sa dokazom da je kriva rasta ABPV slična krivi poznatoj kod ostalih *Picorna* virusa. Nisu utvrđeni citopatogeni efekti u postupku uobičajene svjetlosne mikroskopije. Primarne ćelijske kulture nisu bile adherentne. Očigledno je da zahtjevna procedura ostvarivanja adekvatnih uslova u sistemu kultura i tkiva neće biti nimalo lak izazov za multiplikaciju ostalih virusa pčela u ovom sistemu virusne identifikacije.

Moguće je napraviti i biološki infektivni ogled za dokaz virusne replikacije virusa (Topolska, 2008).

RNA ekstrakcija

Svi dijagnostički protokoli bazirani na dokazu nukleinskih kiselina, bilo DNA ili RNA, počinju od njihove ekstrakcije. Najkritičnija faza ovih detekcionih tehnika jeste kvalitet ekstrahovane nukleinske kiseline. RNA vrlo lako propada, degradira u prisustvu ubikvitarnih endogenih enzima, te je izbor načina čuvanja uzorka od ključne važnosti (De Miranda, 2008; Chen et al., 2007).

Iako su do sada u upotrebi standardizovani i vrlo efikasni metodi ekstrakcije nukleinskih kiselina, neke inhibitorne supstance ili faktori još uvijek mogu uticati na kinetiku u toku PCR reakcije. Izbor enzima i pufera koji učestvuju u reakciji takođe je veoma značajan za ishod PCR reakcije.

Greške nastale kao posljedica lošeg čuvanja uzorka i njegovog procesuiranja u metodi postaju očigledne u odnosu na rezultate kvantitativnog iskazivanja. Iako su tehničko-tehnološka usavršavanja pojednostavila RNA ekstrakciju dovodeći je u sigurnije automatizovan i brz metodološki pristup, prisustvo PCR inhibitora u kompleksnosti biološkog uzorka još uvijek je značajno. Interferencija kojom nastaje djelovanje PCR inhibitora iz meda takođe je dokazana, što je veoma značajno kod dokaza RNK i DNK materijala iz meda.

Lančana reakcija polimeraze: PCR

Široko rasprostranjena metoda koja dozvoljava brzu, specifičnu i senzitivnu amplifikaciju targeta DNK iz uzoraka. PCR metod koristi par „prajmera“ (to su kratki jednostruki dijelovi DNK) koji su dizajnirani na način da hibridizuju određeni dio DNK targeta. Prajmeri se vezuju na targetni region koji se posljedično duplicira u svakoj cikličnoj reakciji. Ovo dupliranje dešava se uz pomoć enzima polimeraze koji, vezujući zajedno nukleotide, stvara novi komplementarni DNK lanac. Završni proizvod ovog udvojenog regiona naziva se ampikon i obično se identifikuje vizuelizacijom u procesu elektroforeze.

PCR je tehnički i teoretski jednostavan metod, iako sve DNK i RNK ekstrakcije i PCR reakcije moraju biti vrlo precizno evaluirane i optimizovane.

Kada se PCR koristi jedino za dokaz prisustva ili odsustva specifične DNK, takav metod se naziva kvalitativni PCR u kojem se rezultati iskazuju u formi „postoji“ ili „ne postoji“.

RT-PCR (RT – reverzna transkripcija) jeste PCR kojim se detektuje RNK na način da se ona prvo konvertuje u komplementarnu DNK (cDNK) uz pomoć enzima reverzne transkriptaze (RT), nakon čega se provodi postupak PCR.

Ovaj metod se najčešće koristi za dokaz virusa pčela jer većina ovih virusa posjeduje RNK genom (Blanchard et al., 2008; De Miranda et al., 2008; Blanchard et al., 2007; Generesh et al., 2006; Chen et al., 2005; Grabensteiner et al., 2001).

Značajnost ovog RT-PCR je određena visokim stepenom uspješnosti, zbog toga što je primjena enzima reverzne transkriptaze (RT) u dijelu reakcije u odnosu na izvodljivost mnogo varijabilnija nego u slučaju kada reakciju pokreće termostabilna DNK polimeraza.

Kreiranje enzima visokorezistentnog na temperaturu i dovođenje reakcije na nivo jednostavnog reakcionog pufera omogućila je istovremeno nastajanje cDNK, kao i PCR aplikaciju u istoj epruveti. Ovaj tzv. One Step RT-PCR korišten je u svim postupcima dokaza virusa unutar ove doktorske teze.

Na osnovu precizno dizajniranih prajmera koji se specifično vežu na određenu sekvencu targetnog dijela, PCR se može koristiti za dokaz mikroorganizama iz njihovih kultura odnosno različitih vrsta izolata ili iz kliničkih uzoraka. Iako su do sada u upotrebi standardizovani i vrlo efikasni metodi ekstrakcije nukleinskih kiselina, neke inhibitorne supstance ili faktori još uvek mogu uticati na kinetiku u toku PCR

reakcije. Izbor enzima i pufera koji učestvuju u reakciji takođe je veoma značajan za ishod PCR reakcije.

U dokazu uzročnika bolesti pčela razvijeni su mnogi PCR i RT-PCR protokoli za prisustvo dokaza patogena kod odraslih pčela, legla, meda, polena i voska (Chen et al., 2009; Eyer et al., 2009; De Miranda et al., 2008; Blanchard et al., 2007; Gauthier et al., 2007; Higes et al., 2007b; Genersch et al., 2006; Chen et al., 2005; Tenetcheva et al., 2004; Lauro et al., 2003; McKee et al., 2003).

U novije vrijeme često se koristi tzv. multiplex PCR, koji omogućava da se primjenom nekoliko različitih prajmera dokažu različiti lokusi u samo jednoj PCR reakciji, što omogućava da se u toku jedne reakcije dokaže nekoliko različitih patogena. Naravno, primjena ove metode je ograničena i detekcioni nivoi mogu biti nešto niži zbog veće akumulacije nespecifičnih produkata.

Za razliku od konvencionalnog PCR metoda, Real Time PCR (qPCR) dokazuje amplifikacione elemente (amplikone) onako kako se oni pojavljuju, u stvarnom vremenu i na taj način određuje broj novonastalih molekula DNK koji se formiraju u svakoj reakciji. Ovo je dokazni proces koji razlikuje trenutni dokaz neke količine traženog amplikona u odnosu na tzv. konvencionalni „end-point PCR“. Ovaj PCR zahtijeva prisustvo fluorescentnog reportera odnosno izvještača koji se vezuje na amplikon i izvještava o njegovom prisustvu, odajući fluorescencijom. Kako se količina proizvoda akumulira, fluorescentni signal se uvećava eksponencijalno. Broj amplifikacionih ciklusa koji je potreban da bi se u uzorku detektovala specifična kriva dostignutog fluorescentnog krajnjeg nivoa naziva se kriva kvantifikacionog ciklusa. Postoje dvije glavne varijante za detekciju amplikona: specifična i nespecifična. Većina specifičnih riltajm PCR procesa uključuje hibridizaciju fluorofor obilježenih oligoproba, koristeći njihovu fluorescentno rezonantnu energiju i tzv. crnu rupu nefluorescentnog hvatača. Nespecifični eseji koriste boje koje će reagovati sa svakom i svakom dvostruko lančanom DNK, npr. SYBR green. Uopšteno govoreći, i specifične i nespecifične fluorogene hemikalije detektuju amplikon sa istom senzitivnošću. Riltajm PCR ne znači uvijek kvantitativni PCR. U većini mikrobioloških dokaza je kvalitativna procedura, mada ova tehnika omogućava

kvantifikaciju targetnih nukleinskih kiselina za više namjena. Kvalitet podataka, kao i njihove kvantitativne vrijednosti nalaze se u odnosu na različit broj PCR varijabli, kao varijacije u količini templata unutar uzoraka, loš ili različit kvalitet templata nastao kao posljedica varijacija u procesu purifikacije i čuvanja, prisustvu inhibitora (i fluorescence i amplifikona), varijacije u performansama DNK polimeraze, varijacije u amplifikaciji među uzorcima i načinu kalibracije.

DNA sekvencionisanje

Sve molekularno-genetske metode bazirane su na postojanju razlika određenih DNK sekvenci tako da je sekvencionisanje najbolji pristup kojim se diferenciraju različiti mikrobi. Na osnovu DNK sekvencionisanja najčešće se direktno detektuje mali region hromozoma te se ispitivanje malog dijela takvog mjesta koji potencijalno varira između organizama koristi kao način prepoznavanja. DNK sekvencionisanje utvrđeno je kao zlatni standard u procesu tipizacije virusa.

Izveštavanja o virusnim infekcijama pčela zahtijevaju izradu standarda u izvještavanju sa jasnim protokolima i web baziranim aplikacijama.

Danas postoji standard zvani MIQUE – međunarodno prihvaćeni standard za izvještavanje i publikovanje RT-qPCR podataka. Slični standardi za izvještavanje drugih eksperimentalnih podataka daju se na GenBANK: podaci o sekvencama, a naglašava se potreba međunarodno prihvaćenih kolekcija virusa (sakupljanje i njihovo konzervisanje) te unapređenje znanja korisnika kroz radionice i seminare, treninge i demonstracije.

Međunarodni projekti koji su za cilj imali virusne infekcije pčela kao predmet globalnog istraživanja (2005–2012)

Brave projekat

Bazirano na Eurbee inicijativama, Brave projekat (2005) zamišljen je kao način transfera znanja između eksperata iz oblasti virusologije insekata i naučnika uključenih u istraživanja pčela i sličnih vrsta. Projektni zadatak bio je da objedini postojeća znanja potrebna za zaštitu medonosne pčele i sličnih polinatorskih insekata od virusnih bolesti, kao i da predstavi okvirni plan za istraživačke programe iz ove oblasti. Na prvom sastanku održanom u aprilu 2005. godine u Francuskoj, učesnici su

se sastali da bi utvrdili činjenice oko taksonomije pčelinjih virusa, dijagnostičkih tehnika i njihove značajnosti. Genetika, fiziologija, ponašanje pčela proučavani su u odnosu na njihovu rezistentnost na virusne infekcije, udruženost virusnih infekcija i parazitarnih sindroma sa *Varroa destructor* i *N. apis* i njihov mogući uticaj na imunološki odgovor, kao i značaj subletalnih doza pesticida. Evolucionarna epidemiologija virusnih oboljenja, važeće informacije o incidenci distribuciji i ulozi virusa, te menadžment pčelinjim bolestima, uključujući regulacione mehanizme svjetski poznatih saznanja takođe su bili u programu ovog projekta. Saopštenja iz ovog sastanka uključuju naučne tekstove i preporuke elaborirane od strane rukovodilaca radnih grupa o kojima se razgovaralo na plenarnim sesijama. Jedan od zadataka ovoga publicističkog dijela projekta jeste i objavljivanje knjige pod naslovom *Virusologija i medonosna pčela*, M. Aubert, B. Ball, I. Fries, N. Milani, R. Moritz, AFSSA, E-mail:m.aubert@afssa.fr

COLOSS projekat – prevencija gubitaka pčelinjih zajednica, EU COST FA 0803 (2008–2012)

Saopštenja o težim gubicima pčelinjih zajednica koji se, u mozaičnosti simptoma, uključujući i CCD (Colony Collapse Disorder), različito klasifikuju. Iako su ovakvi gubici poznati od ranije, čini se da se u posljednje vrijeme dešavaju češće, sa tendencijom pogoršanja u nekoliko posljednjih godina. Ektoparazitska grinja *Varroa destructor* sasvim sigurno ima značajnu ulogu u gubicima, ali se oni ne mogu pripisati i objasniti samo ovim patogenom.

Postoje drugi manje poznati faktori i mehanizmi za koje se smatra da bi mogli biti uzroci masovnih pomora. Pčelarski praktičari i veterinarska struka nisu u stanju prepoznati faktore, što znači da ne postoje načini kako bi se ovi gubici stavili pod kontrolu. Ovo je bio razlog pokretanja COST ACTION istraživačke mreže i projekta koji je trajao četiri godine (2008–2012).

Postoji potreba da se problem globalno sagleda i da se standardizuju pristupi kojima će se identifikovati faktori kako na individualnom nivou tako i na nivou cijele zajednice, te će se kroz ispitivanje sinergetskih efekata među njima tražiti način za uvođenje efikasnih kontrolnih mjera.

Organizovana je COLOSS mreža istraživača koja će ujediniti interese vodećih naučnika, pčelara praktičara, pčelarske industrije u procesima saradnje na očuvanju brojnosti pčelinjih zajednica, unapređenja apitehničkih procedura i očuvanju biodiverziteta (Peter Neuman, scientific programme pg. 105, apstrakt no. 161, Apimondia 2009, 41st Congress, France, Montpellier).

Projekat u Republici Srpskoj vezan za proučavanje virusa kod vrste *A. mellifera* (2006) u selekcijsko-reproduktivnim centrima

Vlada Republike Srpske 2002. godine započela je projekat koji je trebalo da bude okosnica unapređenja genetskog materijala u cilju razvoja visokootpornih i radnih pčela blagog karaktera koje mogu svoje osobine prenijeti na potomstvo bez gubitka poželjnih osobina, a na osnovu utvrđenih vrijednosti međunarodnih standarda u selekciji matica. Razvoj projekta imao je za cilj povećanje obima proizvodnje meda i drugih pčelinjih proizvoda na području Republike Srpske, sa posebnim osvrtom na značaj pčela u procesu oprašivanja sa procjenom da se u polinatorskom servisu obezbjeđuje 20 puta veća korist u odnosu na značaj direktnih proizvoda medonosnih pčela.

U procesu praćenja uzgojnih karaktersitika, rase, ekotipa, praćene su i ocjenjivane karakteristike ocjenama od 4 do 1 na odliku vezanu za agresivnost, mirnoću na saću i rojidsbeni nagon, pri čemu je uvrđivana i jačina pčelinje zajednice s obzirom na broj okvira sa pčelama i broj okvira sa leglom. U ovom četvorogodišnjem projektu korištena su pravila linijske selekcije lokalnih sojeva kranjske rase pčela *Apis mellifera carnica*, a planirana je, zajedno sa različitim tehnološkim procedurama, stalna dijagnostika zdravstvenog stanja pčelinjih zajednica.

Intrigantno je bilo suočiti se sa problemom zdravstvene zaštite pčela u reproduktivnom selekcijskom centru jer je postavljen veoma blag kriterijum u odnosu na otpornost pčela na bolesti s obzirom na to da je to najzahtjevniji cilj u savremenoj selekciji pčela danas. Kontrola zdravstvenog stanja legla i pčela od strane pčelara morala se usredsrediti na američku gnjiloću, nozemozu, varozu i krečno leglo, pri čemu se jasan plan dijagnostičkog uzorkovanja ne vidi, a tretiranje zajednica ne razlikuje se tehnološki u pristupu u odnosu na vrlo zastarjele apitehničke procedure, npr. tretman protiv *Varroa*.

Smatrajući da je neophodno prepoznati prisustvo drugih značajnih patogena o kojima se po planu nije govorilo, isplanirano je prvo istraživanje prisustva virusnih infekcija unutar genetskog potencijala definisanih reproxekcionih centara Republike Srpske. Proučavanje virusnih infekcija, osim šturih knjiških navoda na teritoriji zemalja bivše Jugoslavije, spominje se samo u radovima prof. dr Jovana Kulinčevića iz vremena njegovog naučnog rada u SAD-u. Takođe, informacije o značaju virusnih infekcija kod pčela bile su značajan dio izlaganja sekcije za patologiju Apimondije 2003. i 2005. godine, a poticale su uglavnom iz nekoliko svjetskih centara u Engleskoj, Njemačkoj, Francuskoj, Mađarskoj, Australiji i SAD-u.

S obzirom na to da se na teritoriji jugoslovenskih zemalja 2006. godine nije nalazio nijedan dijagnostički centar iz ove oblasti, odlučeno je da se uz pomoć sredstava jedinice za koordinaciju poljoprivrednih projekata i uspostavljene stručno-naučne komunikacije sa USDA, Bee Research Lab, Beltsville, uzorci matica iz selekcijsko-reproduktivnih centara sa teritorije Republike Srpske pregledaju primjenom molekularno-dijagnostičkih metoda.

Glavni cilj bio je steći znanja i iskustva u primjeni molekularno-dijagnostičkih metoda koje se koriste za detekciju virusa pčela. Drugi cilj je bio stvoriti uslove za proširenje nacionalnog monitoringa na prisustvo virusnih bolesti pčela na teritoriji BiH u prevalenciji i distribuciji virusnih bolesti pčela, izgradnja laboratorijskih kapaciteta, kao i osavremenjavanje i razvijanje protokola za kontrolu zdravstvenog statusa medonosne pčele na nivou reproduktivno-selekcijskih centara. Planirane aktivnosti trajale su od 20. 8. do 30. 09. 2006. godine. Dobijeni rezultati objavljuju se u jednom dijelu ove doktorske teze.

RADNA HIPOTEZA, CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

RADNA HIPOTEZA

Utvrđivanje prisustva i raširenosti virusnih infekcija kod vrste *Apis mellifera* u pčelinjacima Bosne i Hercegovine.

Uvođenje i standardizacija molekularno-bioloških metoda u rutinskoj dijagnostici virusnih bolesti pčela.

Dobijanje relevantnih podataka koji bi u budućnosti omogućili promjenu ili optimizaciju postojećih pravilnika kojim se reguliše zdravstveni status i nadzor nad zdravljem pčelinjih zajednica.

CILJEVI I ZADACI

1. Utvrditi prevalencu virusnih infekcija u pčelinjacima Bosne i Hercegovine.
2. Utvrditi vrste virusa koji izazivaju infekcije pčelinjih zajednica u Bosni i Hercegovini.
3. Ustanoviti eventulano prisustvo različitih vrsta virusa kod jedne jedinice odnosno zajednice u formama multiplih koinfekcija kako kod zdravih tako i kod uginulih zajednica.
4. Prijedlog preporuka za standardizaciju i uvođenje molekularnih metoda za rutinsku dijagnozu virusnih infekcija pčela.
5. Utvrđivanje epizootioloških parametara u odnosu na virusne infekcije medonosne pčele i procjene zdravstvenog statusa zajednice za potrebe diferencijalne dijagnostike, zahtjeva međunarodne trgovine, kao i selekcijsko-reproduktivnih poboljšanja u proizvodnji matica.

PLAN RADA

U okviru planiranih istraživanja koristiće se protokoli za različite vrste ekstrakcija, kao i za različite procedure polimerizacije i vizuelizacije nukleinskih produkata virusa pčela.

1. U prvoj fazi istraživanja planirano je utvrđivanje prevalence virusnih infekcija pčela (matica, radilica) iz reproduktivnih i selekcijskih centara Republike Srpske.
2. Za drugu fazu planirano je prikupljanje uzoraka materijala (radilice, trutovi) sa pčelinjaka sa različitih teritorija Bosne i Hercegovine. Ova faza istraživanja podrazumijeva preporuke za uvođenje i standardizaciju molekularno-bioloških metoda (RNK ekstrakcija, RT PCR) u rutinskoj dijagnostici virusnih bolesti pčela.
3. Paralelna komparativna laboratorijska i terenska ispitivanja prisustva drugih anamnestički značajnih patogena (*Varoa destructor*, *Nosema spp.*, *Acar apis*, *Paenibacillus larvae*).
4. Za posljednju fazu istraživanja planirana je statistička obrada rezultata.

METODE I UZORCI ISTRAŽIVANJA

Metode

Molekularno-dijagnostičke metode: RT-PCR; sekvencionisanje.

Dijagnostika patogena pčela na osnovu klasifikacije OIE dijagnostičkog priručnika

Kontrola stepena infestacije *Varroa destructor* na pčelinjaku.

Uzorci

Uzorci pčela iz zdravih proizvodnih pčelinjaka, ciljani uzorci porijeklom iz depopulisanih, oslabljenih ili uginulih zajednica u različitim sezonalnim periodima 2006. i 2007. godine, pregledani pojedinačno, u paru ili kao grupni uzorci od više desetina pčela različitih kasti.

MJESTA I LABORATORIJE VEZANE ZA IZRADU TEZE

1. USDA, BEE Research Lab Beltsville, MD., USA (Jeff Pettis, Judy Chen)
2. Veterinarski fakultet u Beču (prof. dr Norberth Nowotny, prof. dr Tamash Bakony)
3. Centre de Biologie et Gestion des Populations, Campus International de Baillarguet, Montferrier-sur-Lez, France
4. Veterinarski institut Republike Srpske „Dr Vaso Butozan“, Banja Luka, RS, Bosna i Hercegovina
5. Terenska uzorkovanja i ispitivanja

METODE STATISTIČKE OBRADJE PODATAKA I OSTALIH RELEVANTNIH

PODATAKA

1. Metode deskriptivne epidemiologije
2. Za unos i mapiranje podataka za distribuciju virusa korišten je program Arc GIS 10.0 ESRI

OBRAZLOŽENJE O POTREBAMA ISTRAŽIVANJA

- Nema epizootioloških podataka o raširenosti virusnih infekcija u pčelinjacima Bosne i Hercegovine.
- Nema epizootioloških podataka o vrstama virusa koji izazivaju infekcije pčelinjih zajednica u BIH.

- Nema dovoljno epizootioloških podataka o raširenosti virusnih infekcija u zemljama regiona.
- Nema podataka o broju različitih virusa kod jedne jedinice odnosno zajednice u formama multiplih koinfekcija kako kod zdravih tako i kod uginulih zajednica.
- Postoji potreba utvrđivanja epizootioloških parametara u odnosu na virusne infekcije medonosne pčele i procjene zdravstvenog statusa zajednice za potrebe diferencijalne dijagnostike, potrebe međunarodne trgovine, kao i selekcijsko-reproduktivnih poboljšanja u proizvodnji matica.
- Za brzu i specifičnu rutinsku dijagnozu virusnih infekcija pčela, neophodno je uvođenje standardizovanih molekularnih metoda.

MATERIJAL I METODE RADA

Ova disertacija se u odnosu na izbor materijala (uzorka) koji se ispitivao tehnički dijeli na dvije vremenske i radne cjeline. U prvom dijelu istraživanja, materijal su činili uzorci *Apis mellifera* vrste uzorkovani sa svih selekcijsko-reproduktivnih centara u Republici Srpskoj. U drugom dijelu ispitivanja korišteni su uzorci pčela (uglavnom radilica i trutova) uzorkovanih na zdravim pčelinjacima ili uzorci uginulih radilica i trutova dostavljenih u Veterinarski institut sa zahtjevom za utvrđivanje uzroka uginuća. Materijali su pretraživani u dvije različite laboratorije, a u slučaju dokaza IAPV virusa uzorci su u okviru ciljanog istraživanja prevalencije poslani u treću laboratoriju. Za potrebe kontrole i utvrđivanja prisustva vektora *Varroa destructor* uzorci su bili kompletne pčelinje zajednice jednog izabranog pčelinjaka.

Na osnovu prethodne sistematizacije, uzorci materijala za ispitivanje korišteni u ovom radu grupisani su na sljedeći način.

Uzorci materijala *Apis mellifera* za ispitivanje prisustva virusa namijenjeni za rad u Bee research laboratory, Maryland, USA

Od svakog registrovanog uzgajivača matica sa teritorije Republike Srpske uzorkovano je u toku jula 2006. godine pet matičnih kaveza sa po jednom maticom i deset pratećih radilica. Uzorci su bili porijeklom iz odgajivačkih društava, a matice su bile u statusu neoplođenih jedinki. Uzorak iz Trebinja sadržavao je tri kaveza sa tri matice (dvije matice manje od dogovorenog). Do momenta prispijeća u laboratoriju Veterinarskog instituta „Dr Vaso Butozan“ Banja Luka, uzorci bili su transportovani u normalnom režimu transporta materijala, kako se on transportuje za potrebe prodaje matica. Sve matice i radilice u momentu prijema bile su žive. Pčele su prije potapanja u alkoholni rastvor bile ohlađene na +4°C u trajanju od dva sata, tako da su, praktično, žive ohlađene te ugušene u alkoholnom konzervansu. Uzorci su pažljivo, bez mogućnosti međusobne kontaminacije, prebačeni u sterilne Falconove 50 ml epruvete sa dodatim 70% etilnim alkoholom.

Tabela 3. Uzorci materijala iz selekciono-reproduktivnih centara u Republici Srpskoj

R. br.	Pčelar	Mjesto	Broj matica	Broj radilica
1.	Boško Mijić	Banja Luka	5	10
2.	Lazo Grbić	Gradiška	5	10
3.	Nebojša Andrić	Doboj	5	10
4.	Mladenko Milišić	Derventa	5	10
5.	Miloje Četković	Rudo	5	10
6.	Željko Maletić	Prijedor	5	10
7.	Radivoje Maksimović	Trebinje	3	10

Uzorci su adekvatno obilježeni i spremljeni za međunarodni avionski transport biološkog materijala u uslovima slanja pošiljke shodno zahtjevima i propisima (UN 1845). Uzorci su, i pored ispoštovanih procedura, u laboratoriju Bee research laboratory, USDA, Beltsville, Maryland, USA, zbog prezahtjevne kontrolne granične procedure stigli sa deset dana zakašnjenja. Količina suvog leda planirana za uslove normalnog avionskog transporta bila je nedovoljna te su uzorci stigli u režimu čuvanja na +4°C stepena, a ne na temperaturi smrzavanja, kao što je bilo planirano.

Uzorci *Apis mellifera* za ispitivanje prisustva virusa namijenjeni za obradu na Veterinarskom fakultetu u Beču, Austrija

Uzorci pčela sa četrnaest epizootioloških jedinica sa teritorije Bosne i Hercegovine, u najvećem broju sa teritorije Republike Srpske, dostavljani su od strane pčelara ili su su uzorkovani u formi aktivnog nadzora nad virusnim infekcijama direktno od strane istraživača. Uzorci 82 pčelinje zajednica sa 43 pčelinjaka sakupljeni su u periodu april, jul, avgust 2007. godine. Uzorci su bili porijeklom iz klinički zdravih zajednica ili zajednica sa simptomima depopulacije, iznenadnih uginuća, kliničkim simptomima puzajućih pčela. Približno 100 odraslih pčela (radilice i trutovi) sačinjavalo je uzorak koji je adekvatno pakovan i čuvan na temperaturi kućnih zamrzivača (-20°C) do momenta slanja u laboratoriju Veterinarskog instituta. Uzorci su prepakovani (bez mogućnosti međusobne kontaminacije) u namjenske laboratorijske kese i bez dodatka konzervansa čuvani na +4°C. U ovom slučaju, uzorci pčela do Beča transportovani su u vozilu, bez uslova hladnog režima, u periodu ne dužem od dvanaest sati.

Tabela 4. Broj uzoraka, pčelinjaka i epizootioloških jedinica sa kojih su prikupljeni

R. br. uzorka	R. br. pčelinjaka	Vlasnik pčelinjaka	Opština	Broj uzoraka
1–3.	1.	Zoran Vulić	Trebinje	3
4–8.	2.	Radivoje Maksimović	Trebinje	5
9.	3.	Obrad Ninković	Trebinje	1
10–11.	4.	Spasoja Popara	Ljubinje	2
12–13.	5.	Marko Gordić	Ljubinje	2
14–15.	6.	Miladin Bjelogrić	Gacko	2
16–18.	7.	Slobodan Okuka	Berkovići	3
19–20.	8.	Ilija Domazet	Berkovići	2
21–23.	9.	Aleksandar Kundačina	Berkovići	3
24.	10.	Milenko Samardžić	Berkovići	1
25–27.	11.	Željko Brajović	Bileća	3
28–29.	12.	Blažo Vujović	Bileća	2
30–31.	13.	Anđelko Knežević	Banja Luka	2
32.	14.	Jovan Švraka	Gradiška	1
33.	15.	Marko Tepić	Teslić	1
34.	16.	Đorđo Ilić	Srbac	1
35.	17.	Aleksandar Đuričić	Prnjavor	1
36.	18.	Anđelko Banjac	Banja Luka	1
37.	19.	Vujadin Pečić	Banja Luka	1
38.	20.	Vlado Znić	Banja Luka	1
39–41.	21.	Igor Trkulja	BanajLuka	3
42.	22.	Rade Marić	Banja Luka	1
43.	23.	Milan Makivić	Banja Luka	1
44–45.	24.	Vujadin Pečić	Derventa	2
45–48.	25.	Filip Končar	Prijedor	3
49–51.	26.	Rajko Radivojac	Omarska	3
52–54.	27.	Zdravko Pajić	Bos. Brod	3
55.	28.	Zdravko Crnogorac	Gacko	1
56.	29.	Dragan Čolić	Trebinje	1
57.	30.	Goran Plavšić	Banja Luka	1
58–59.	31.	Božo Čutura	Ribnik	2

60.	32.	Ratko Damjanović	Banja Luka	1
61.	33.	Smilja Vujaković	Banja Luka	1
62.	34.	Zdravko Dojčinović	Banja Luka	1
63–67.	35.	Kosana Đurić	Petrovo	5
68–69.	36.	Mirsad Šabanagić	Novi Grad	2
70–74.	37.	Maletić Željko	Prijedor	5
75.	38.	Danko Jović	Drvar	1
76.	39.	M. Mirković	Banja Luka	1
77.	40.	Branislav Pajić	Banja Luka	1
78–79.	41.	Danilo Popržen	Banja Luka	3
81.	42.	Filip Končar	Prijedor	1
82.	43.	Sveto Koldžić	Rudo	1



Slike 18. i 19. Terensko uzorkovanje materijala *Apis mellifera*

Uzorci *Apis mellifera* slučajno odabranih pčelinjaka sa teritorije Bosne i Hercegovine u ispitivanju na moguće prisustvo izraelskog soja virusa akutne paralize pčela (IABPV)

Grupni uzorci pčela radilica iz tri zdrava društva i jedan uzorak uginulih pčela namijenjeni su za dokazivanje prisustva IABP virusa – ukupno četiri pčelinjaka sa tri lokacije iz Republike Srpske. Uzorci su, po preporuci laboratorije, za potrebe očuvanja integriteta nukleinskih kiselina, potapani u specijalan konzervans, tzv. RNA Protector, kako bi se maksimalno zaustavili procesi degradacije nukleinskih kiselina.

Tabela 5. Uzorci u monitoringu na IAPV

R. br.	Pčelar	Lokacija	Anamneza	Transportni medijum
1.	Miloš Kažović	Trebinje	zdrave	da
2.	Danilo Popržen	Banja Luka	zdrave	da
3.	Fillip Končar	Prijedor	zdrave	da
4.	Željko Janjić	Banja Luka	uginule	da

Uzorak za kontrolu prisustva *Varroa destructor*

Za potrebe samo deskriptivne analogije i patološke dinamike *Varroa* destruktivnog značaja u toku virusnih infekcija određen je eksperimentalni pčelinjak, profesionalnog pčelara Filipa Končara iz Kozarca, na kojem su se sprovodile procedure kontrole prirodnog pada *Varroae*, kao i procjena efikasnosti antivaroa uticaja hemijskog sredstva na broj opalih *Varroa*, kao i praćene dužine „terapijskog“ trajanja antivaroa tretmana sa ciljem da se stvori slika o značaju vektora virusnih infekcija medonosne pčele.

Metode rada na dokazu virusa BRL, 2006, USA

Odnose se na molekularni dokaz specifičnog dijela virusne RNK što će se dokazivati kroz postupke RNK ekstrakcija, RT-PCR amplifikacija i sekvencionisanja virusnih genoma. Na osnovu jasnog dogovora sa rukovodiocem Laboratorije za molekularna ispitivanja BRL, J. Chen, napravljen je plan obrade uzoraka za ocjenu kvalitativnog utvrđivanja šest pčelinjih virusa metodom RT-PCR

1. provjeriti sve matice iz svakog uzorka pojedinačno
2. provjeriti deset radilica iz svakog uzorka,
3. koristiti 2 mikrolitra templata po reakcionoj mješavini,
4. napraviti gel elektroforezu,
5. isjeći pozitivne linije i pročistiti PCR fragmente,
6. dobiti sekvence virusa.

Ekstrakcija RNK iz svih uzoraka planirana je tako da se obradi jedna matica kao jedan uzorak ekstrakcije.

Iz svakog kaveza, dvije radilice su obrađene kao jedan uzorak u ekstrakciji, što je značilo pet ekstrakcija za matice pojedinačno i pet ekstrakcija za radilice (pul od dva) za svaki uzgojni pčelinjak. Iz ekstrahovanih uzoraka templat RNK sa jednim parom prajmera redosljedom: BQCV, DWV, SBV, ABPV, KBV, CBPV urađeni su amplifikacijski protokoli za klasičan, *end point*, RT-PCR.

Planirane su ekstrakcije uzoraka iz po dva reprovelekciona centra, što znači ukupno dvadeset ekstrakcija dnevno kako bi se izbjegle eventualne greške kontaminacije uzoraka. Uzorci iz selekcijsko-reproduktivnog centra u Trebinju imali su tri matice tako da su oni ukupno imali osam ekstrakcija, što znači da je na kraju obrađeno 102 uzorka, tj. 102 reakcije RT-PCR amplifikacije.

RNK ekstrakcija trizol metodom

Uputstvo za ekstrakciju uzoraka rađeno je na osnovu uputstva za metodu ispitivanja RNK-trizol ekstrakcija

SOP za ekstrakciju

Homogenizacija:

Zamrznutu pčelu (adult) sa temperature -80°C smrviti u prah.

Odmah homogenizovati ovaj uzorak sa 1 ml TRIzol Reagensa.

Pipetiranjem 10–50 puta homogenizovati uzorak (opciono vorteksovati uzorak).

Faza separacije:

Inkubirati homogenizovan uzorak 3–5 minuta na sobnoj temperaturi da bi se postigla kompletna disocijacija nukleoproteinskog kompleksa.

Dodati 200 ul hloroforma u homogenizovan uzorak.

Zatvoriti epruvetu, tako zaštićen sadržaj epruvete protresti snažno ručno kretnjom gore-dolje, pedeset puta.

Inkubirati uzorak na sobnoj temperaturi 3 minuta.

Centrifugirati uzorak na 10.000 rpm u toku 10 minuta na $+4^{\circ}\text{C}$.

Nakon centrifugiranja sadržaj u epruveti se rasloji na sloj crvekaste boje sasvim dolje (fenol hloroform faza) i na bezbojni sloj vodene gornje faze.

RNK se nalazi u sloju bezbojne vodene faze.

RNK precipitacija i ispiranje RNK:

Otpipetirati sloj vodene faze sadržaja u novu epruvetu.

Dodati 500 ul 100% izopropil-alkohola u istu epruvetu.

Inkubirati uzorke na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta.

Centrifugirati na 12.000 rpm u toku 15 minuta na +4°C.

Dobijeni RNK precipitat poslije centrifugiranja formira rozu peletu bočno na dnu epruvete.

Odliti supernatant, isprati RNK peletu sa 1 ml 75% etanola.

Vorteksujući izmiješati sadržaj epruvete.

Centrifugirati 8 000–10.000 rpm u toku 5 minuta (~9000 rpm).

Odliti supernatant.

Pokupiti višak tečnosti u epruveti sa autoklaviranim trakama filter papira (Waterman filter papir).

Odmah rastvoriti dobijenu RNK u 50 ul (radilice) ili 100 ul (matice) sa RNase-free vodom ili 1X TAE puferom, propuštajući sadržaj kroz nastavak višekratnim pipetiranjem.

Čuvanje RNK:

Uzorak sa radilicama dodaje se 2,5 ul RNase OUT Ribonuclease inhibitora. Za matice se on dodaje u količini 1,25 ul.

Ovako pripremljeni uzorci čuvaju se na temperaturi -80°C.

Metoda amplifikacije ekstrahovanih nukleinskih kiselina

SOP za amplifikaciju

Vršena je na osnovu preporuka Uputstva za amplifikaciju (RT-PCR) korištenjem Access RT-PCR System, Promega.

Priprema reakcione mješavine:

Nuclease-Free voda	27 ul	
AMV/Tfl 5X reakcioni pufer	10 ul	(1X)
dNTP Mix (10 mM)	1 ul	(0,2 mM)
Downstream Primer (20 uM)	2,5 ul	(1 uM)
Upstream Primer (20 uM)	2,5 ul	(1 uM)
25 mM MgSO ₄	4 ul	(1 mM)
AMV reverzne transkriptaze	1 ul	(5 jedinica ukupno)
Tfl DNA polimeraze (5u/ul)	1 ul	(5 jedinica ukupno)

DNA uzoraka 2 ul po uzorku

PCR termički profil:

1 ciklus	48 °C 45 minuta	reverzna transkripcija
1 ciklus	94 °C 2 minuta	RT inaktivacija
40 ciklusa	94 °C 45 sekundi	denaturacija
	55 °C 30 sekundi	aniling
	68 °C 1,5 minuta	ekstenzija
1 ciklus	68 °C 7 minuta	završna ekstenzija
1 ciklus	4 °C do kraja	hlađenje

Čuvati reakcione produkte na temperaturi -20 °C.

Uputstvo za izvođenje elektroforeze

Priprema gela

- Izmiješati 1 g agaroze (prah) sa 100 ml 1X TAE pufera (1% gel).
- Sadržaj zagrijati u mikrotalasnoj do rastvaranja agara.
- Ohladiti rastvor na 60°C.
- Dodati 5 ul etidium bromida.
(Stock rastvor 10 mg/ml), *etidium bromid je kancerogen.*
- Dobro izmiješati sadržaj.
- Pripremiti elektrogoretsku jedinicu i nasuti topao agar.

Analiza PCR produkata

- Izmiješati uzorak amplifikovane DNK sa jednom kapi (4 ul) of DNK *gel-loading buffer*.
- Polagati uzorke sljedećim redoslijedom:
 - 1) mjerilo, ljestve, veličine linija (*Size Ladder ****),
 - 2) H₂O,
 - 3) uzorci S₁
S₂
S₃
S_n,

- 4) H₂O,
- 5) negativna kontrola,
- 6) pozitivna kontrola.

- Priprema ljestvi, mjerača veličine linija (100 bp-DNK ladder) *Invitrogen*.
- 6 ul of DNA gel loading pufera izmiješati sa 7 ul Laddera.
- Uložiti u agar na odgovarajuće mjesto.

Elektroforeza

Rađena je na jedinici Biorad Pover pac 2000, na 100 V u trajanju od jednog sata.

Vizuelizacija i fotografisanje fragmenata uz pomoć iluminacione komore u tamnom polju rađeni su GELCAM sistemom sa polaroid konzervisanim filmovima.

Tabela 6. Prajmer dizajn

Virus	Prajmer	Veličina produkta (bp)	Referenca
ABPV	ABPV-F: (5'-ttatgtgtccagagactgtatcca-3') ABPV-R: (5'-gctcctattgctcggtttttcggt-3')	900	Benjeddou et al. (2001)
CBPV	CBPV-F: (5'-agttgtcatggtaacaggatacagag-3') CBPV-R: (5'-tctaatttagcacgaaagccgag-3')	455	Ribiere et al. (2002)
BQCV	BQCV-F: (5'-tggtcagctcccactaccttaaac-3') BQCV-R: (5'-gcaacaagaagaacgtaaacac-3')	700	Benjeddou et al. (2001)
DWV	DWV-F: (5'-atcagcgcttagtgaggaa-3') DWV-R: (5'-tcgacaatttcggacatca-3')	702	Chen et al. (2004b)
KBV	KBV-F: (5'-gatgaacgtcgacctattga-3') KBV-R: (5'-tgtgggttgctatgagatca-3')	415	Stoltz et al. (1995)
SBV	SBV-F: (5'-gctgaggtaggatctttgcgt-3') SBV-R: (5'-tcatcatcttcaccatccga-3')	824	Chen et al. (2004c)



Slika 20. Ulaganje uzoraka amplifikacije na gel



Slika 21. Izgled fotografija vizueliziranih produkata RT PCR

Kontrola kvaliteta ekstrakcija trizolom

Kvalitet ekstrakcija pojedinih uzoraka kontrolisan je spektrofotometrijski tako što je pravljena kontrola uzorka RNK templata od 2 ul sa 98 ul *Rnase free vode*, što se očitavalo u kivetama na aparatu, mjereći koncentraciju i odnos (ratio 260/280).

Očuvanost nukleinske kiseline kontrolisana je pomoću sistema RNA 6000 Nano Assay protokola od strane tehničkog asistenta Michael Hamilton po opisanoj proceduri proizvođača na Bioanalyzer, Aligent technologies.

Sekvencionisanje

Na osnovu DNK sekvencionisanja najčešće se direktno detektuje mali region hromozoma te se ispitivanje malog dijela takvog mjesta koji potencijalno varira između organizama koristi kao način prepoznavanja. DNK sekvencionisanje utvrđeno je kao zlatni standard u procesu tipizacije virusa.

Sekvencionisanje specifičnih fragmenata dijela virusnog genoma urađeno je uslužno u University Maryland School of Medicine.

Metode rada Beč 2007–2008.

Prisustvo pčelinjih virusa demonstrirano je kroz procedure ekstrakcija nukleinskih kiselina, amplifikacije virus specifičnih nukleinskih kiselina korišćenjem metoda reverzne transkripcije RT-PCR.

Uzorci pčela svakog uzorka u količini od oko 50 radilica su usitnjeni i homogenizovani u sterilnom keramičkom tarioniku uz pomoć sterilnog pijeska. Dobijena kašasta masa se dodatno homogenizovala diethylpyrocarbonatom vodom.



Slike 22. i 23. Homogenizacija materijala i priprema za centrifugiranje

Ovaj homogenizat centrifugovan je na 20 000 x g u trajanju od jednog minuta, a od dobijene količine supernatanta uzeto je 140 μ l za ekstrakciju RNK koristeći QIAamp Viral RNA Minikit (QIAGEN, Hilden, Njemačka) onako kako to proizvođač

zahtijeva standardnom proizvođačkom procedurom; opisano ispod). Uzroci su nakon završene ekstrakcije pohranjeni u označene ependorfe i čuvani na -70°C.

SOP za ekstrakciju nukleinskih kiselina

EKSTRAKCIJA RNK (MINI VIRAL RNA QIAamp[®])

Priprema reagenasa iz kita po priloženoj tabeli

1. Rastvaranje liofiliziranog nosača

(radi se samo u prvom korištenju kita)

- 310 µg RNA nosača (crveni čep) rastvoriti sa
- 310 µl pufera AVE (ljubičasti čep)
- Alikvotirati do potrebnih količina i čuvati na -20 °C

2. Priprema pufera sa nosačem

RNA nosač dodati u zahtijevanom odnosu AVL pufera.

Potrebna količina AVL pufera i nosača RNA-AVE (prikazano u tabeli, str. 16).

3. Priprema AW1 pufera

- 125 ml etanola (96–100%) dodati u bocu sa AW1 puferom.

Označi datum pravljenja ovog pufera. Na gornjoj strani čepa obilježiti da je pufer spreman sa alkoholom. Ovako pripremljen pufer čuva se na sobnoj temperaturi.

4. Priprema AW2 pufera

- 160 ml etanola (96–100%) dodati u bocu sa AW2 puferom.

Označiti datum pravljenja ovog pufera. Na gornjoj strani čepa obilježiti da je pufer spreman sa alkoholom. Ovako pripremljen pufer čuva se na sobnoj temperaturi.

Postupak ekstrakcije

Prema broju uzoraka napraviti pufer AVL sa RNA nosačem

- 560 µl AVL/RNA pipetirati u 1,5 ml eppendorf epruvete

Dodati

- 140 µl uzorka koji se ekstrahuje

Vorteks 15 sekundi

Inkubirati 10 minuta na sobnoj temperaturi (15–25 °C)

Centrifugirati 3 000 rpm 15 sekundi

Dodati

- 560 µl etanola (96–100%)

Vorteks 15 sekundi

Postaviti obilježene MINI SPIN COLUMNNE.

Sadržaj epruvete u ukupnoj količini u dva koraka unijeti u filter (MINI SPIN COLUMNNE).

Centrifugirati 8 000 rpm, 1 min.

Odbaciti kolekcione epruvete (COLECTION TUBE), pri čemu se dijelovi epruvete sa filterom (MINI SPIN COLUMNNE) postavljaju u nove kolekcione epruvete.

Dodati

- 500 µl pufera AW1

Centrifugirati 8 000 rpm, 1 min.

Prebaciti u NOVE COLECTION TUBE

Odbaciti kolekcione epruvete (COLECTION TUBE) pri čemu dio epruvete sa filterom (MINI SPIN COLUMNNE) se postavljaju u nove kolekcione epruvete

Dodati

- 500 µl AW2

Centrifugirati na 13 000 rpm, 3 min.

Dio epruvete sa filterom (MINI SPIN COLUMNNE) postaviti u nove kolekcione epruvete (u ovom koraku ne dodaje se pufer).

Centrifugirati 13 000 rpm 1 min.

Odbaciti kolekcione epruvete.

Prebaciti MINI SPIN COLUMNNE u eppendorf epruvetu.

Dodati

- 60 µl AVE pufera

Zatvoriti poklopac.

Inkubirati 1 minut na sobnoj temp.

Centrifugirati 8 000 rpm 1 minut.

*Postupak se može izvesti kroz dvostruko sukcesivno centrifugiranje sa manjom količinom (30 µl AVE). Ovim se povećava efikasnost ekstrakcije.

Odbaciti MINI SPIN COLUMNU, a sadržaj (ekstrahovani uzorak RNK) ostaje u Eppendorf epruveti.

Ovako ekstrahovane nukleinske kiseline (RNK) mogu se čuvati na temp. od -20°C do -70°C.

(Uzorci su na -70°C stabilni 1 godinu).

Oligonukleotidni prajmeri dizajnirani su na osnovu genomskih sekvenci SBV, CBPV, BQCV, DWV, ABPV i KBV korištenjem Primer Desinger 4 programa za Windows 95 verzija 5.20 (*Scientific and Educational Software*). Sekvenca, orijentacija i lokacija pet parova prajmera pokazana je u tabeli ispod.

Tabela 7. Prajmer dizajn

Prajmeri (5-3 sekvenca)	GenBank accession No.	Veličina produkta
ABPV ABPV-F (5 -TTATGTGTCCAGAGACTGTATCCA-3) ABPV-R (5 -GCTCCTATTGCTCGGTTTTTCGGT-3)	AF150629	900
CBPV CBPV-F (5 -AGTTGTCATGGTTAACAGGATACGAG-3) CBPV-R (5 -TCTAATCTTAGCACGAAAGCCGAG-3)	AF461061	455
BQCV BQCV-F (5 -TGGTCAGCTCCCACTACCTTAAAC-3) BQCV-R (5 -GCAACAAGAAGAAACGTAAACCAC-3)	AF183905	700
DWV DWV-F (5 -ATCAGCGCTTAGTGGAGGAA-3) DWV-R (5 -TCGACAATTTTCGGACATCA-3)	NC-004830	702
SBV SBV-F (5 -GCTGAGGTAGGATCTTTGCGT-3) SBV-R (5 -TCATCATCTTCACCATCCGA-3)	AF092924	824

Amplifikacija

Virusna RNK je reverzno prepisana i amplificirana u proceduri RT-PCR metodom primjenom One step RT-PCR kit (QIAGEN) na sljedeći način.

Amplifikacija je izvršena u GeneAmp PCR System 2400 termalnog sajklera (*thermal cycler Perkin-Elmer*). Termalni profil reakcije optimizovan je na sljedeći način: reverzna transkripcija dešavala se na 50 °C 30 minuta, nakon čega je uslijedila denaturacija i polimerazna aktivacija na 95 °C u trajanju od 15 minuta, nakon čega je uslijedilo 40 ciklusa PCR amplifikacije, od kojih se svaki sastojao od 30 sekundi na 94 °C i 50 sekundi na 55 °C i na kraju proces se završavao u trajanju od 1 minuta na 72 °C reakcije. PCR produkti završeni su u procesu završne elongacije 7 minuta na 72 °C.

Dobijeni PCR produkti podvrgnuti su procesu elektroforeze u 1,2 % Tris Acetatnom EDTA, (TAE) agaroznom gelu, bojeni ethidium bromidom.

Dobijene linije (bands) fotografisane su pod UV svjetlom kamerom sistema Kodak Digital Science 1D Software. Veličina dobijenih fragmenata poređena je u odnosu na 100 bp marker.

O svim obrađenim uzorcima vođeni su elektronski protokoli na standardnom obrascu, kao i prateće fotografije gela i ispitujućih uzoraka pčela pomoću programa Kodak Digital Science 1D™.

Uzorci su vizuelizirani na 1,2 % gelu u 0.5 x TAE, bojeni ethidium bromidom.

Korišteni su prajmeri (F i R) za svaki virus, a za prepoznavanje veličine produkata korišten je 100 bp marker (Ladder, Promega). Svaki pokrenuti ciklus za različit virus ima obrazac kojim se potvrđuje ciklus RT-PCR tako što se može vidjeti termociklični profil, kao i način na kojem se pripremala PCR reakciona mješavina i količina templata koji je korišten za dokaz prisustva nukleinskih kiselina virusa.

U formi obrazaca postoji pregled uzorka koji su obrađivani tokom reakcije, pri čemu za svaki ciklus postoji pozitivna i negativna kontrola.

RT-PCR mix pripreman je u posebno odvojenom mikrobiološkom dijelu u strogim uslovima zaštite nukleinske kontaminacije po jedinstvenoj proceduri propisanog protokola (Berenyi et al., 2006), a svodila se na pripremu mješavine pufera, dNTP, F i R prajmera, Taq polimeraze, dodavanje RNA inhibitora. Dodavanje templata virusnog nukleinskog ekstrahovanog materijala vršeno je u količini od 2,5 µl za svaki ispitujući virus.

Nakon pripreme uzorak se dodaje u PCR reaktivnu mješavinu. U epruvetu svakog uzorka se dodaje loading buffer u količini od 4 μ l. Ukupna količina materijala koja se ulagala u pripremljene prostore na gelu iznosila je 11 μ l.

Dokument ispod prikaz je načina vođenja evidencije u dijelu izvođenja metode koja se odnosi na uprošćen način prikaza izvođenja dijela reakcije vezane za pripremu reakcione mješavine, dodavanja templata i dizajna termičkog profila reakcije. U ovom slučaju radi se o uputstvu za reakciju amplifikacije templata namijenjenog dokazu virusa mješinastog legla.

*Radni protokol za amplifikaciju na primjeru dokumenta RT-PCR. Nr: BUZZ_3_SBV
(isti protokol korišten je i za ostalih pet virusa pčela)*

RT-PCR. Nr.: BUZZ_3_SBV Date: 14.01.2008. Initials: TB

Mix:	Ad 25 µl/reaction	1 × (µl)	(n + 1) × (µl)	RT: 50 °C	30'00"	Thermocycler: Old Applbio
Number of samples (n):			24	95 °C	15'00"	
H ₂ O:		14,25	356,25			
5×Buffer (Qiagen, 25 mM MgCl ₂):		5	125	PCR: 94 °C	0'40"	
dNTPs (10 nM):		1	25			40×
RNasin (Promega):		0,25	6,25	55 °C	0'50"	
Enzyme mix (Qiagen):		1	25	72 °C	1'00"	
Primer F+R mix (40 pmol/µl):		1	25			
Template RNA		2.5	2.5/sample			
				72 °C	7'00"	4 °C ∞

Primjer vođenja jedne radne liste u ovom primjeru za virus mješinstog legla:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Primer F	SBV 1f	SBV 1f	SBV 1f	SBV 1f	SBV 1f	SBV 1f	SBV 1f	SBV 1f	SBV 1f	SBV 1f	SBV 1f	SBV 1f
Primer R	SBV 2r	SBV 2r	SBV 2r	SBV 2r	SBV 2r	SBV 2r	SBV 2r	SBV 2r	SBV 2r	SBV 2r	SBV 2r	SBV 2r
Template RNA	19/08	20/08	21/08	22/08	23/08	24/08	25/08	26/08	27/08	28/08	29/08	30/08
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Primer F	SBV 1f	SBV 1f	SBV 1f	SBV 1f	SBV 1f	SBV 1f	SBV 1f	SBV 1f	SBV 1f	SBV 1f	SBV 1f	SBV 1f
Primer R	SBV 2r	SBV 2r	SBV 2r	SBV 2r	SBV 2r	SBV 2r	SBV 2r	SBV 2r	SBV 2r	SBV 2r	SBV 2r	SBV 2r
Template RNA	31/08	32/08	33/08	34/08	35/08	36/08	37/08	38/08	39/08	40/08	C+, 461/07	C-

U ispisu ispod, dat je primjer jednog radnog protokola koji je pojednostavljen prikaz uputstva metode koji se ispitnoj laboratoriji nije nazivao SOP-om, jer za sada ne postoje standardizovane procedure nego samo optimizovani protokoli prihvaćeni od neke grupe istraživača. Protokol se odnosi na način identifikacije rezultata gel elektrofoteze kroz postupak vizuelizacije gela. U ovom primjeru radi se o dokazu virusa akutne paralize pčela. Za svaki od pet dokazanih virusa postoje ovako definisane radne liste:

AGAROSE-GEL/ ETHIDIUMBROMID STAINING

PCR Nr.: BUZZ_4_ABPV

Date: 17. 01. 2008.

1.2 % gel in 0.5× TAE

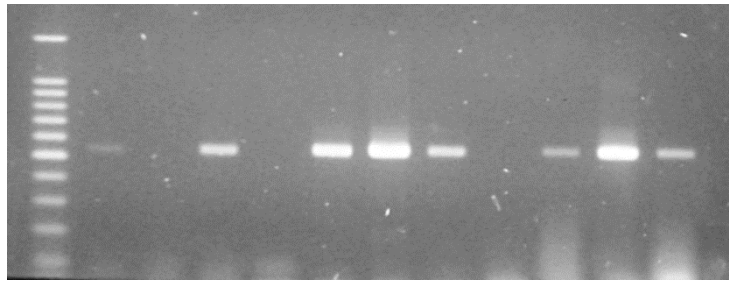
Primer: ABPV 23nf-24nr

Product: 25 µl + loading buffer: 4 µl load: 10 µl

Image: Buzz31.tif

Buzz32.tif

1	–	1	–
2	100 bp Ladder (Promega)	2	–
3	41/08	3	100 bp Ladder (Promega)
4	42/08	4	53/08
5	43/08	5	54/08
6	44/08	6	55/08
7	45/08	7	56/08
8	46/08	8	57/08
9	47/08	9	58/08
10	48/08	10	C+, 19/08
11	49/08	11	C-
12	50/08	12	
13	51/08	13	
14	52/08	14	
15	–	15	



Slika 24. Prisustvo specifičnih linija za virus CBPV

Uzorci su tehnički obrađeni u toku dvije odvojene posjete virusološkoj laboratoriji Veterinarskog fakulteta u Beču pod kontrolom Dr Tamasa Bakonyja i Dr Norberta Nowotnyja.

Dana 13.06.2007. započelo se sa obradom uzoraka pčela koji su sakupljeni tokom aprila i juna 2007. godine sa teritorije opština Hercegovine (Republika Srpska).

Dana 14.01.2008. godine započelo se sa obradom uzoraka pčela koje su takođe sakupljane u avgustu 2007. godine iz različitih uzoraka pčela koje su u anamnezi imale slabljenja i uginuća zajednica sa teritorije Banje Luke, Dervente, Prijedora, Bosanskog Broda, Gacka, Trebinja, Petrova, Teslića i Ribnika.

Kontrola prisutnosti soja IABPV

Uzorci *Apis mellifera* slučajno odabranih pčelinjaka sa teritorije Bosne i Hercegovine ispitani su na moguće prisustvo izraelskog soja virusa akutne paralize pčela (IABPV). Ovaj dio ispitivanja bio je dopuna poznavanju prevalencije ovog virusa, za koji se u vrijeme nadzora planiranog u okviru višenacionalnog učešća projekta COLOSS smatralo da je jedan od najznačajnijih uzročnika CCD sindroma. Analiza ovih uzoraka vršena je u Centre de Biologie et Gestion des Populations, Campus International de Baillarguet, CS 30016, 34988 Montferrier-sur-Lez, France.

Terenska ispitivanja kao primjer ocjene nivoa infestacije

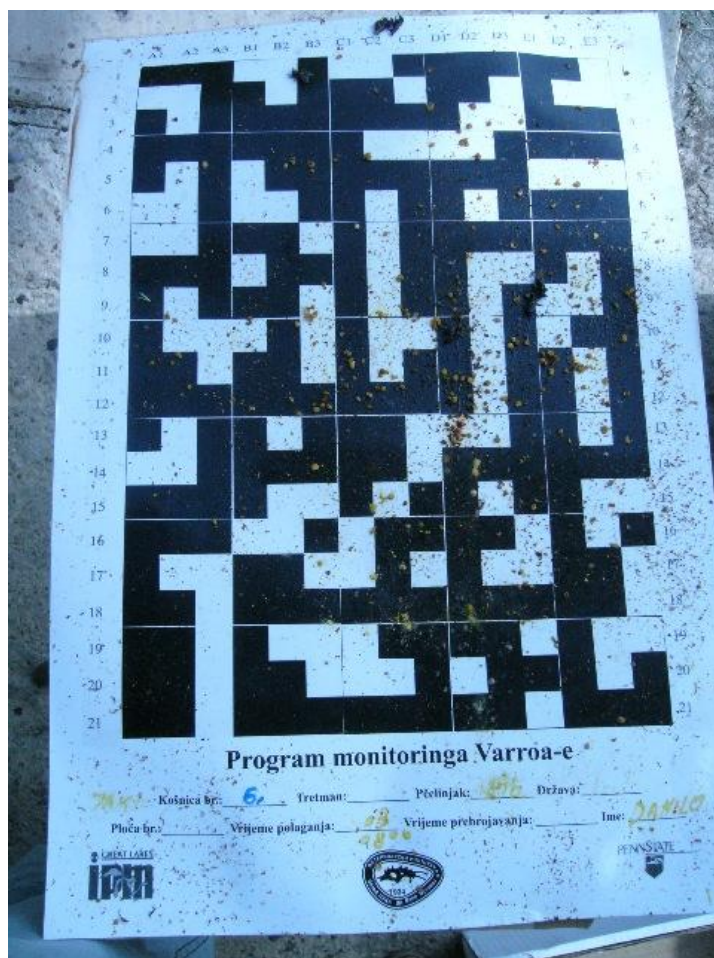
Kontrola dnevnog pada Varroe

Kontrola pada *Varroe* po preporuci Dianne Samaratanno, Univerzitet Pennstate, za potrebe dokaza značaja parazitarno-krpeljskog sindroma vršena je u periodu 23.05.2007. do 14.01.2008. godine na pčelinjaku Filipa Končara iz Prijedora.

Metoda koja je korištena opisana je sa naslovom: „A simplified technique for counting *Varroa jacobsoni* Oud. on sticky boards,” *Apidologie*, 31, November/December 2000, 707-716, DOI <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2000155>

Na osnovu opisanog uputstva (koje je prilagođeno zahtjevu metode), pčelar je pratio kontrolu dnevnog pada *Varroae* bez tretmana antivaroznim sredstvom. Dizajnirana kartonska podloška premazana je vazelinom koji sprečava gubitak palih *Varroa*. To je neka vrsta ljepljive podloške. Crna i bijela polja kartonske podloške statistički su zastupljena na način da daju značaj distribucije *Varroa* i jednostavnost i brzinu brojanja. Rezultate brojanja upisivao je u radne tabele.

Brojanje je rađeno na tzv. tri kontrolne tačke na pčelinjaku koje su po subjektivnoj procjeni u odnosu na snagu zajednice činile jaku, srednje jaku i slabu zajednicu. Istovremeno je mjerena temperature spoljnje sredine na eksperimentalnom pčelinjaku.



Slika 25. Podloška za brojanje *Varroae*

REZULTATI

Na osnovu izvršenih dijagnostičkih procedura dobijeni su sljedeći rezultati:

Rezultati o ispitivanju šest najčešćih virusnih patogena iz uzoraka selekcijsko-reproduktivnih centara u Republici Srpskoj

Virusološke analize metodom RT-PCR na šest najčešćih virusnih patogena vršene su iz uzoraka matica i iz uzoraka radilica sedam uzgojnih centara za matice sa teritorije Republike Srpske. Svi uzorci (68) pregledani su na navedene viruse: 408 pojedinačnih amplifikacija, tj. PCR reakcija, ali se pozitivan odgovor dobio samo u slučaju virusa crnog matičnjaka, BQCV, i iz uzoraka matica, radilica ili jednih i drugih u šest od sedam reprocentara. Ovim istraživanjem dobijeni su prvi podaci o dokazanom prisustvu virusne infekcije kod pčela sa teritorija Republike Srpske, Bosne i Hercegovine.

Negativni odgovori na ostalih pet vrsta virusa nisu dokaz da ti virusi nisu prisutni u pomenutim selekcionim centrima, nego samo dokaz da u uslovima molekularno-dijagnostičkih procedura iz rađenih uzoraka oni nisu utvrđeni. Zbog ove činjenice, virusološka ispitivanja dala su samo djelimičan odgovor na tražena pitanja, potvrdivši prisustvo samo jednog virusa, a ne isključujući pri tom prisustvo ostalih virusa. Ovo je razlog zbog kojeg su se pomenuta virusološka istraživanja nastavila u toku 2007. i 2008. godine.

Tabela 8. Rezultati RT-PCR uzoraka matica i radilica

R. br.	Centar	Uzorak	ABPV	BQCV	CBPV	DWV	KBV	SBV
1.	Banja Luka	matica	-	-	-	-	-	-
		matica	-	-	-	-	-	-
		matica	-	-	-	-	-	-
		matica	-	-	-	-	-	-
		matica	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	+	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
2.	Gradiška	matica	-	+	-	-	-	

		matica	-	+	-	-	-	-
		matica	-	+	-	-	-	-
		matica	-	+	-	-	-	-
		matica	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
3.	Doboj	matica	-	+	-	-	-	-
		matica	-	+	-	-	-	-
		matica	-	+	-	-	-	-
		matica	-	+	-	-	-	-
		matica	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	+	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
4.	Derventa	matica	-	-	-	-	-	-
		matica	-	+	-	-	-	-
		matica	-	+	-	-	-	-
		matica	-	+	-	-	-	-
		matica	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	+	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
5.	Rudo	matica	-	+	-	-	-	-
		matica	-	+	-	-	-	-
		matica	-	+	-	-	-	-
		matica	-	-	-	-	-	-

		matica	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
6.	Prijedor	matica	-	+	-	-	-	-
		matica	-	+	-	-	-	-
		matica	-	+	-	-	-	-
		matica	-	-	-	-	-	-
		matica	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
7.	Trebinje	matica	-	-	-	-	-	-
		matica	-	-	-	-	-	-
		matica	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-
		radilice (2)	-	-	-	-	-	-

Rezultati uzoraka za kontrolu kvaliteta ekstrakcije RNK

U ovom dijelu istraživanja, ekstrakcija RNK vršena je Trizol metodom, te je bilo moguće izmjeriti koncentraciju nukleinskih kiselina (ukupna RNA). Najveći broj uzoraka imao je zadovoljavajuće vrijednosti odnosa (ratio), ali je očigledno da se radilo o visokom prisustvu proteina, što se vidi u vrijednostima koncentracije.

Tabela 9. Rezultati fotometrije ekstrakcija (ekstrakcija 05.09.2006)

R. br.	Ratio	Concentration
1.	1.46	5.59
2.	1.69	4.87
3.	1.62	5.93
4.	1.74	4.49
5.	1.75	5.80
6.	1.80	6.47
7.	2.07	9.19
8.	3.56	5.64
9.	1.95	7.13
10.	3.13	5.64

Rezultati o integritetu ekstrahovanih RNK

Ocjena nivoa očuvanosti dvanaest slučajno odabranih uzoraka RNA ekstrakcija izvršena je mjerenjem integriteta RNA primjenom nanometrijskih sistema. Brojčana ocjena uzoraka na skali vrijednosti od 1 do 10 rangira kvalitet RNK templata s obzirom na oštećenja nukleinskih kiselina, gdje su najveća oštećenja pridružena najmanjim brojčanim vrijednostima. Negativni rezultati na prisustvo još nekog od traženih virusa mogu se objasniti rezultatima prikazanim u tabeli 10.

Tabela 10. Očuvanost integriteta nukleinskih kiselina ekstrahovanih uzoraka

R. br.	Oznaka uzorka RNK ekstrakcije	Ocjena integriteta RNA
1.	2Q2	2.3
2.	2Q3	2.3
3.	2Q4	2.3
4.	4Q2	na
5.	4Q3	2.2
6.	3W4	2.4
7.	5W2	2.4
8.	8W1	na
9.	1W2	2.3
10.	7Q1	2.3
11.	6W5	2.3
12.	4Q4	2.2

Zbog potrebe da se objasni veoma malo detektovanih virusa, bilo brojčano bilo u odnosu na vrstu traženog virusa, urađena je kontrola očuvanosti integriteta nukleinske kiseline iz preostalih dijelova ekstrahovanih zaliha. Iz tabele se jasno vidi da u jednom uzorku upšte nije bilo moguće detektovati kvalitet RNK (uzorak br. 8). Ostali uzorci pokazuju niske vrijednosti očuvanosti strukture RNK na vrlo niskom nivou pa su na skali do deset koja je standard maksimalno dobrog integriteta RNA naši uzorci imali jedva nešto malo više vrijednosti od 2. Ovaj fenomen lošeg kvaliteta ulaznog materijala za proces amplifikacije nije rijedak i zavisi od mnogo faktora, od kojih je najvažniji količina endonukleaza u dostavljenom materijalu. Kvalitet očuvanosti uzoraka ovdje nije dobio prolaznu ocjenu.

Rezultati o dobijenoj sekvenci virusa BQCV

Prvi put dokazano prisustvo jednog virusa pčela sa teritorije Bosne i Hercegovine bilo je potrebno, a i moguće uporediti sa dotad opisanim sekvencama virusa. Dobijena sekvenca BQCV analizirana je na sekvencioneru University of Maryland school of medicine USA. Analiziran je fragment veličine 702 bp u volumenu 30 µl.

Dobijena je sekvenca koja se nalazi na <http://130.14.29.110/BLAST/Blast.cgi>, koja je odgovarala sekvenci BQCV strukturalnog poliproteinskog gena, parcijalno cds dužine 1231 sa identitetom 458/487 što je (94%); gap je bio 6/487 (1%). Drugi odgovarajući pregled na prisustvo BQCV nestrukturalnim poliproteina (orf1) i poliprotein (orf2) gena, dao jekompletan cds dužine 8550.

U vrijeme objavljivanja na stranici Blast.cgi., ovo je bio prvi sekvencioniran virus BQCV iz regiona bivših jugoslovenskih zemalja.

Rezultati ispitivanja pojavnosti pet najčešćih virusnih patogena iz uzoraka pčela slučajno izabranih pčelinjaka u BiH

Ukupno osamdeset dva uzorka pčela porijeklom sa četrnaest opština ispitivano je sa RT-PCR na prisustvo pet najznačajnijih virusa pčela: ABPV, DWV, BQCV, SBV, CBPV.

Svi navedeni virusi dokazani su u ispitivanim uzorcima u različitom procentu i pojavnosti multiplih koinfekcija.

Tabela 11. Prikaz rezultata RT-PCR različitih pčelinjih virusa detektovanih u uzorcima pčela

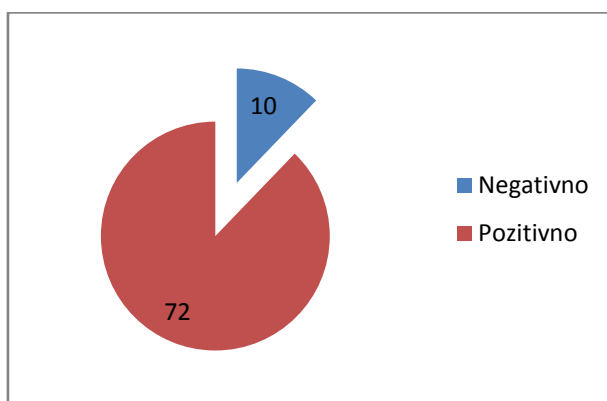
R. br.	R. br. pčelinjaka	Opština	Uzorci	ABPV	DWV	BQCV	SBV	CBPV	Br. različitih virusa u uzorku
1.	1.	Trebinje	1	-	+	-	-	-	1
2.			2	-	+	-	-	-	1
3.			3	-	+	-	-	-	1
4.	2.	Trebinje	1	-	+	+	-	-	2
5.			2	-	+	+	-	-	2
6.			3	-	-	+	-	-	1
7.			4	-	+	-	-	-	1
8.			5	-	-	-	-	-	0
9.	3.	Trebinje	1	-	+	+	-	-	2
10.	4.	Ljubinje	1	-	+	+	-	-	2
11.			2	-	+	+	-	-	2
12.	5.	Ljubinje	1	-	+	-	+	-	2
13.			2	-	-	-	-	-	0
14.	6.	Gacko	1	-	+	-	+	-	2
15.			2	-	+	-	-	-	1
16.	7.	Berkovići	1	-	-	+	-	-	1
17.			2	-	+	-	-	-	1
18.			3	-	+	+	-	-	2
19.	8.	Berkovići	1	-	+	+	-	-	2
20.			2	-	+	+	-	-	2
21.	9.	Berkovići	1	-	+	+	-	-	2
22.			2	-	-	+	-	-	1
23.			3	-	+	+	-	-	2
24.	10.	Berkovići	1	-	+	-	-	-	1
25.	11.	Bileća	1	-	-	-	-	-	0
26.			2	-	-	-	-	-	0
27.			3	-	-	-	-	-	0
28.	12.	Bileća	1	-	+	+	-	-	2
29.			2	-	+	+	-	-	2
30.	13.	Banja Luka	1	-	-	-	-	-	0
31.			2	-	-	-	+	-	1
32.	14.	Gradiška	1	-	+	-	-	-	1
33.	15.	Teslić	1	+	+	-	-	-	2
34.	16.	Srbac	1	-	-	-	-	+	1
35.	17.	Prnjavor	1	+	+	-	-	-	2

36.	18.	Banja Luka	1	-	-	-	-	+	1
37.	19.	Banja Luka	1	+	+	-	+	-	3
38.	20.	Banja Luka	1	-	+	-	+	-	2
39.	21.	Banja Luka	1	-	+	-	-	-	1
40.			2	-	-	-	-	-	0
41.			3	-	-	-	-	-	0
42.	22.	Banja Luka	1	-	-	-	-	-	0
43.	23.	Banja Luka	1	-	+	+	-	-	2
44.	24.	Derventa	1	+	+	+	-	-	3
45.			2	+	+	-	-	-	2
46.	25.	Prijedor	1	-	+	+	-	-	2
47.			2	+	+	+	-	-	3
48.			3	+	+	+	+	+	5
49.	26.	Prijedor	1	+	+	+	-	-	3
50.			2	+	+	+	-	+	4
51.			3	+	+	+	-	-	3
52.	27.	Bosanski Brod	1	+	+	+	-	-	3
53.			2	+	+	+	-	-	3
54.			3	+	+	+	-	-	3
55.	28.	Gacko	1	+	+	+	-	-	3
56.	29.	Trebinje	1	+	+	-	-	-	2
57.	30.	Banja Luka	1	+	+	+	-	-	3
58.	31.	Ribnik	1	+	+	+	-	-	3
59.			2	+	+	-	-	-	2
60.	32.	Banja Luka	1	+	+	+	-	-	3
61.	33.	Banja Luka	1	+	+	-	-	-	2
62.	34.	Banja Luka	1	+	+	+	+	-	4
63.	35.	Petrovo	1	+	+	-	+	-	3
64.			2	+	+	-	-	-	2
65.			3	+	+	+	-	+	4
66.			4	+	+	+	-	+	4
67.			5	+	+	+	-	+	4
68.	36.	Novi Grad	1	+	+	+	+	+	5
69.			2	+	+	+	-	+	4
70.	37.	Prijedor	1	-	-	+	-	-	1
71.			2	-	-	+	-	-	1
72.			3	-	+	+	-	+	3
73.			4	-	-	+	-	-	1
74.			5	-	+	+	-	+	3

75.	38.	Drvar	1	+	-	+	-	-	2
76.	39.	Banja Luka	1	+	+	+	-	+	4
77.	40.	Banja Luka	1	-	-	+	-	-	1
78.	41.	Banja Luka	1	+	-	+	-	-	2
79.			2	-	-	+	-	-	1
80.			3	+	-	-	-	-	1
81.	42.	Prijedor	1	-	-	-	-	-	0
82.	43.	Rudo	1	-	+	-	-	+	2

Zbog relativno malog broja uzoraka (82) i više nego slučajnog plana uzorkovanja može se govoriti jedino o pojavnosti proučavanih virusa, ali ne i o njihovoj stvarnoj prevalenci.

Sve ispitivane zajednice bile su infestirane *Varroa* grinjama. S obzirom na to da su uzorci sakupljeni u toku 2007. godine (maj–juni) od zdravih društava, a da su pčele sa anamnezom uginuća dostavljane tokom cijele pčelarske sezone, teško je napraviti poređenje u odnosu na značajnost infekcija, kao i sezonalne i prostorne varijacije.

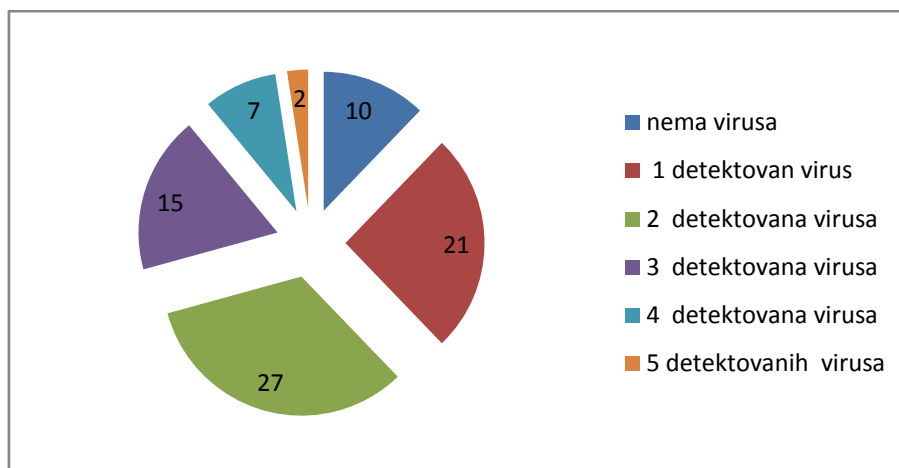


Grafikon 1. Odnos pozitivnih i negativnih dokaza virusnih infekcija u 82 ispitivana uzorka pčela

Najčešće utvrđen virus bio je virus deformisanih krila pčela, DWV koji je je dokazan u 58 uzoraka (70,73%). Za virus crnog matičnjaka, BQCV prosječna prevalenca bila je 56,09% jer je utvrđen u 46 uzoraka pčela. Treći po pojavnosti je virus akutne paralize pčela, ABPV, koji je dokazan u 32 ispitana uzorka, što je 39,02% prevalencie. Virus hronične paralize pčela utvrđen je u 13 uzoraka (15,85%) a najrjeđe detektovan virus je virus mješastog legla, koji je utvrđen u devet slučajeva (10,97%).

Kod ukupnog broja pozitivnih uzoraka (72) imamo sljedeću sliku raznovrsnosti infekcija različitim virusima: 21 uzorak je imao dokazanu infekciju samo jednim

virusom, što je 29,16%; 27 uzoraka imalo je istovremenu infekciju sa dva virusa (37,5%); 15 uzoraka je imalo istovremenu infekciju sa tri virusa (20,83%). Sedam uzoraka je imalo četiri različita virusa (9,72%). Samo dva ispitana uzorka (2,77%) imala su koinfekciju sa svih pet traženih virusa.



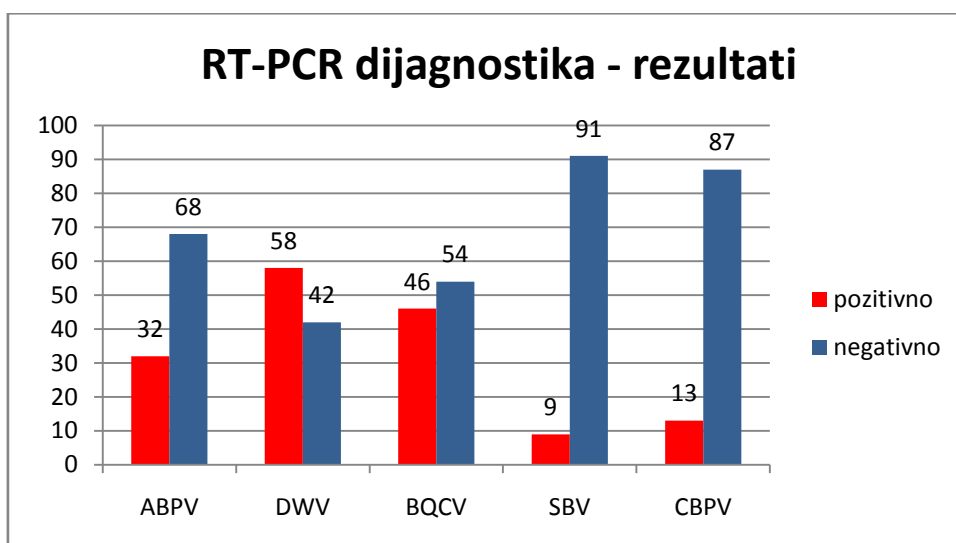
Grafikon 2. Odnos virusnih infekcija i koinfekcija na 82 ispitana uzorka pčela

Tabela 12. Zbirni tabelarni prikaz rezultata RT-PCR

Broj uzoraka	Broj pčelinjaka	Broj opština	ABPV	DWV	BQCV	SBV	CBPV
82	43	14	32	58	46	9	13
			39,02%	70,73%	56,09%	10,97%	15,85%

Tabela 13. Prikazani rezultati pozitivnih nalaza virusa

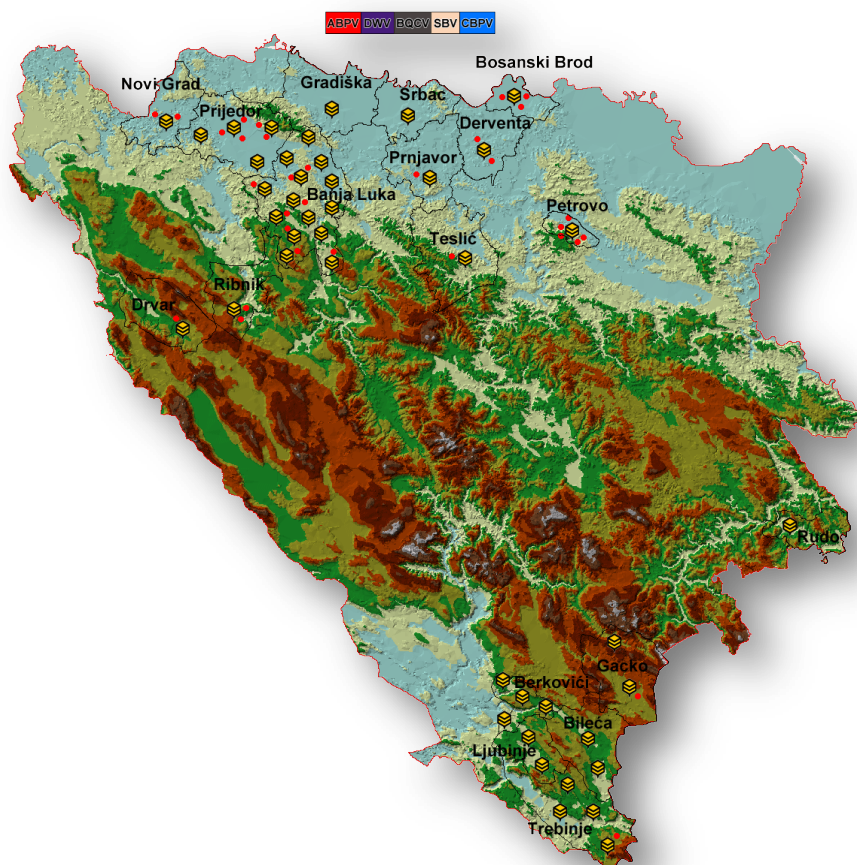
ABPV	DWV	BQCV	SBV	CBPV
32	58	46	9	13
39,02%	70,73%	56,09%	10,97%	15,85%



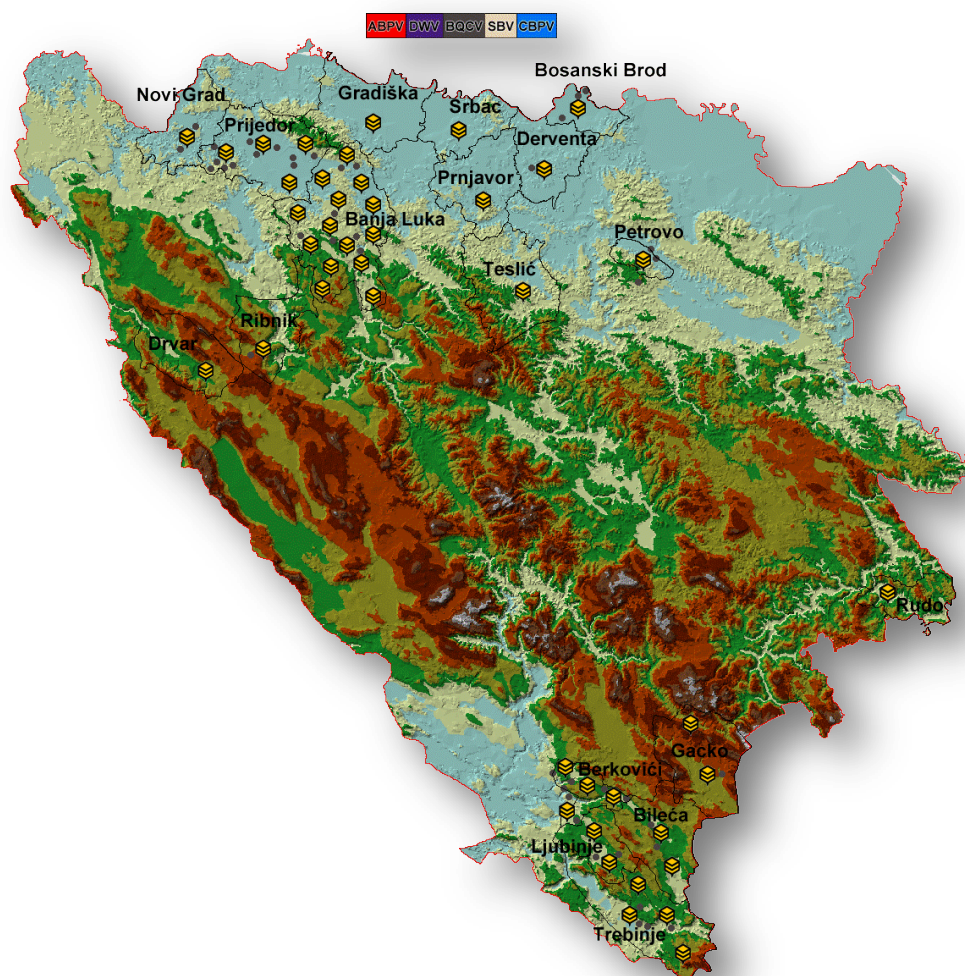
Grafikon 3. Virusni pčela na ispitanim pčelinjacima BiH (izraženo u procentima)

Rezultati Arc GIS 10.0 ESRI obrade podataka

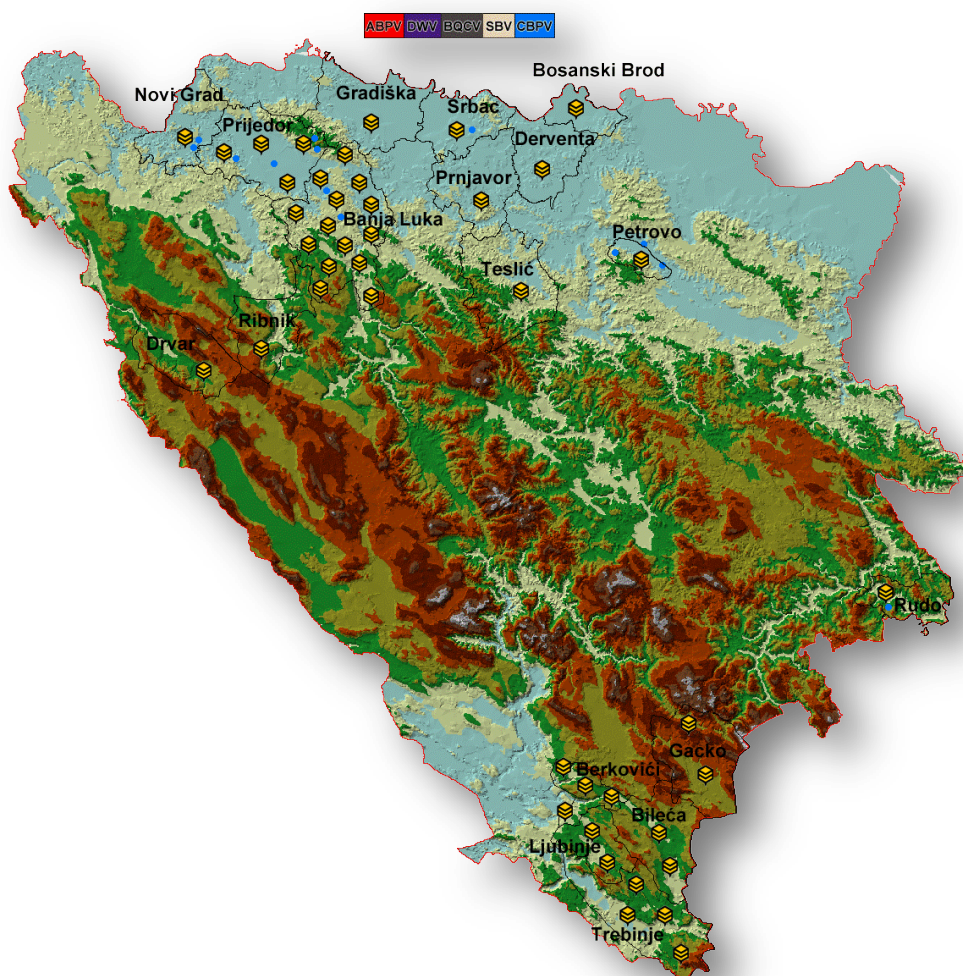
Pojavnost i distribucija pet dokazanih virusa pokazale su interesantnu sliku geografske zastupljenosti.



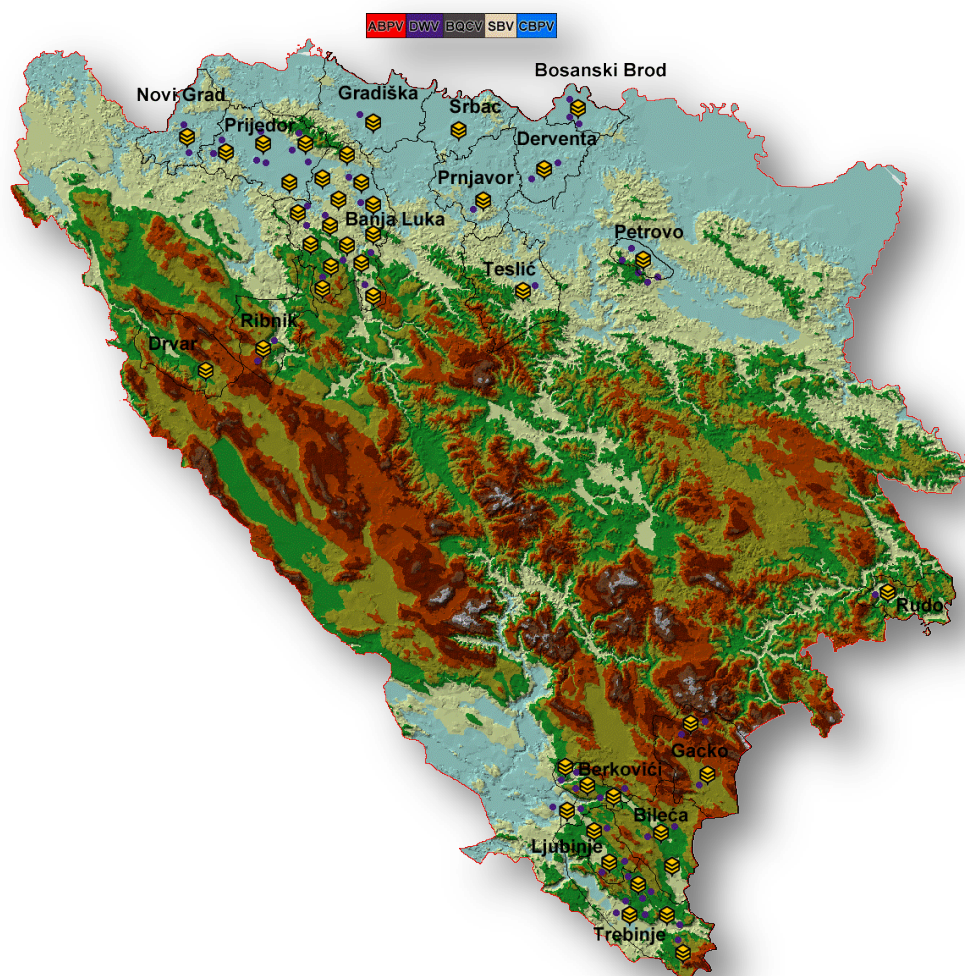
Mapa 1. Dokazano prisustvo virusa ABPV (virus akutne paralize pčela)



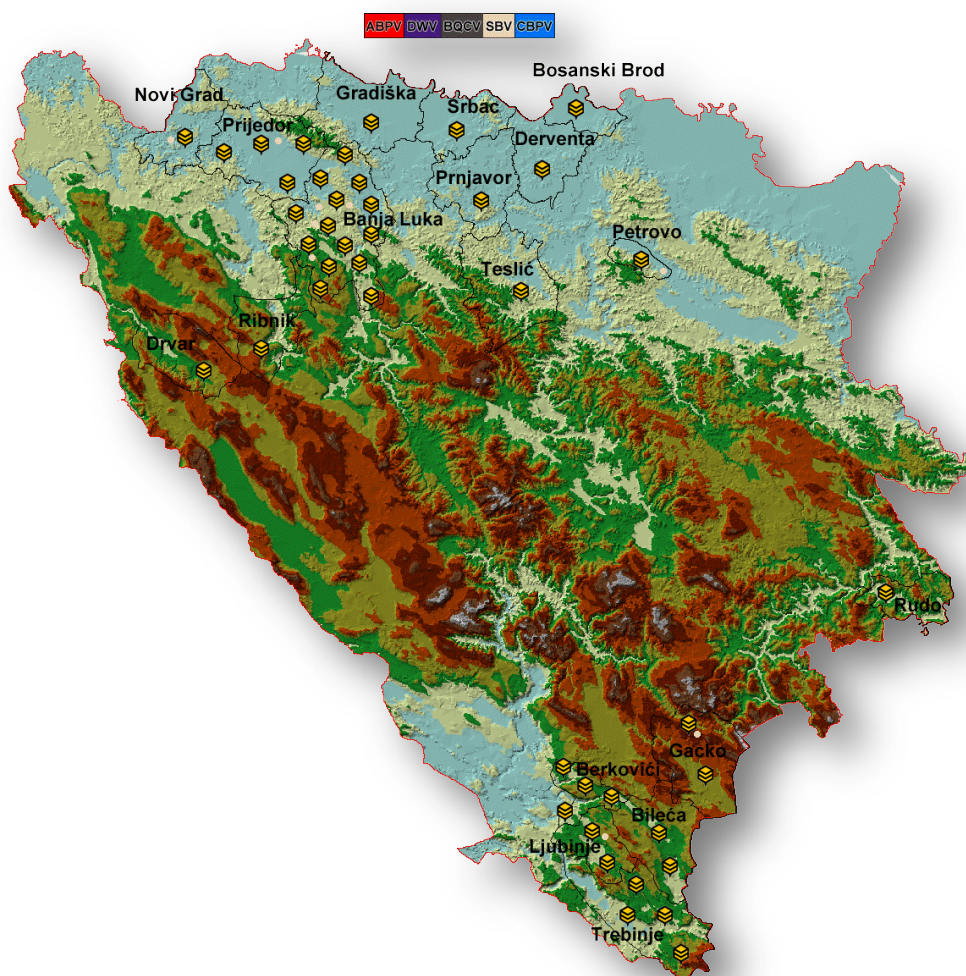
Mapa 2. Dokazano prisustvo virusa BQCV (virus crnog matičnjaka)



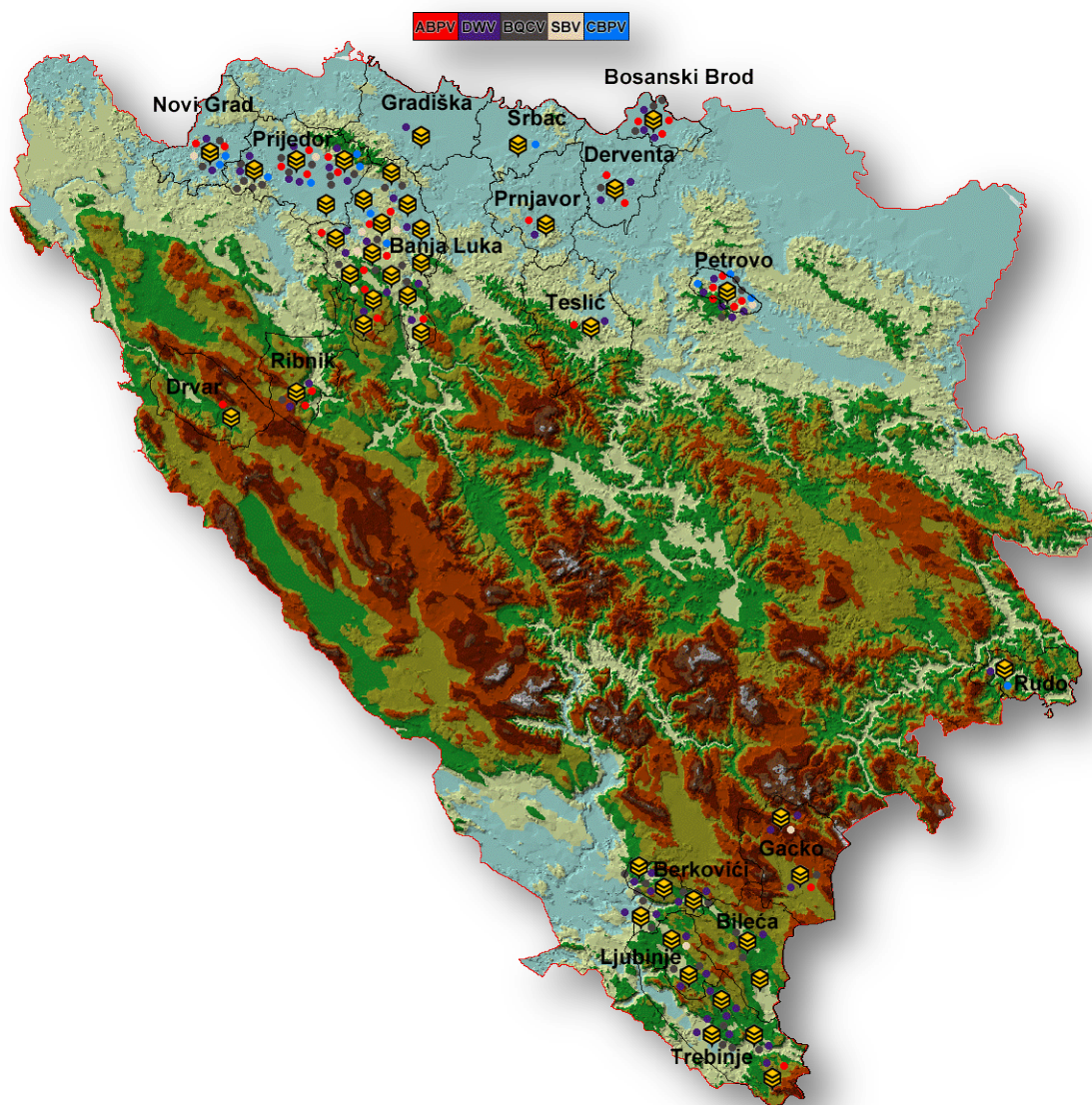
Mapa 3. Dokazano prisustvo virusa CBPV (virus hronične paralize pčela)



Mapa 4. Dokazano prisustvo virusa DWV (virus deformisanih krila)



Mapa 5: Dokazano prisustvo virusa SBV (virus mješinstog legla)



Mapa 6. Dokazano prisustvo svih virusa na svakom od pčelinjaka

Rezultati dokaza IAPV

Aktivan monitoring na prisustvo IAPV (Izraelskog soja virusne paralize pčela) rađen u laboratoriji, pod rukovodstvom Marie Navajas, u Centre de Biologie et Gestion des Populations, Campus International de Baillarguet, CS 30016, 34988 Montferrier-sur-Lez, France, dao je negativan nalaz za slučajno uzete uzorke pčela. To je bio dio istraživanja nacionalnih monitoringa prisustva ovog soja virusa ABPV, u većem broju zemalja učesnica COLOSS projektne grupe.

Tabela 14. Rezultat RT-PCR dijagnostike na prisustvo IAPV

R. br.	Mjesto	Rezultat IAPV
1.	Trebinje	-
2.	Banja Luka	-
3.	Prijedor	-
4.	Banja Luka	-

Iako relativno mali, broj uzoraka pregledan na prisustvo virusa soja izraelske paralize pčela imao bi statistički značaj s obzirom na nepostojanje utvrđene prevalencije ovog virusa uopšte.

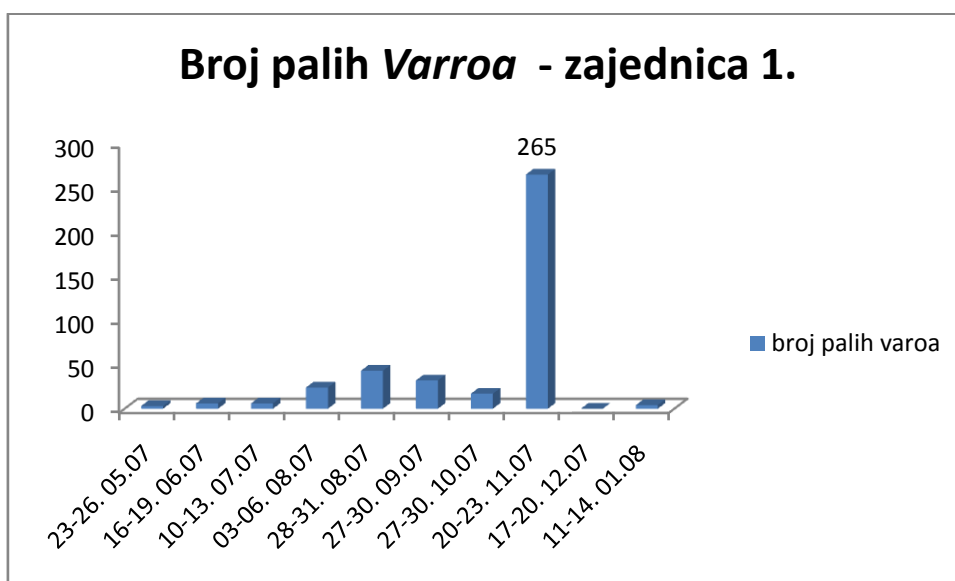
Rezultati terenskih ispitivanja kao primjer ocjene značajnosti nivoa infestacije sa *V. destructor*

Tabela 15. Nivoi infestacije u tri kontrolisane zajednice

Vrijeme kontrole pada	1	2	3	Maksimalna dnevna temperatura po danima °C			
				prvi	drugi	treći	četvrti
	Broj palih <i>Varroa</i>						
23–26. 05.07.	3	1	0	27,9	27,4	29,6	29,5
16–19. 06.07.	6	14	1	29,7	29,6	31	31,6
10–13. 07.07.	6	16	1	23,9	17,2	24,8	28
03–06. 08.07.	24	38	11	29,3	25,4	22,3	30
28–31. 08.07.	43	52	4	34	29,5	22,2	18,8
27–30. 09.07.	32	31	3	16	21,9	23,4	23,6
27–30. 10.07.	17	6	4	10,4	9,8	11,7	9,1
20–23. 11.07.	265	15	31	24,6	3	9,9	13,7
17–20. 12.07.	0	0	0	1,6	0,1	0,7	-2,4
11–14. 01.08.	4	2	5	10,9	15,5	10,9	7,2

Za tretman protiv *Varroae* korištene su organske kiseline na sljedeći način:

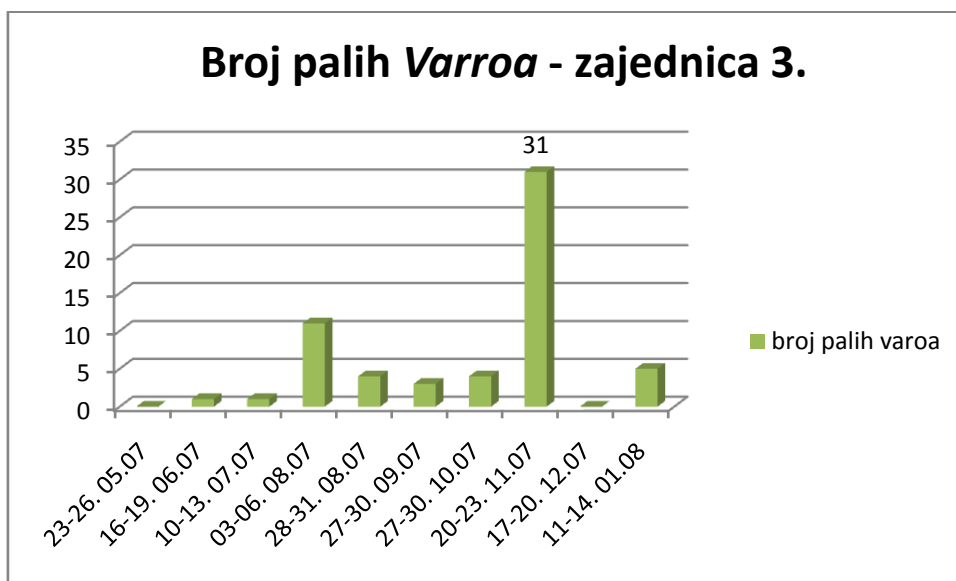
- ✓ Mravlja kiselina 85%, 80 ml po košnici 23.06.2007. i drugo dodavanje 30.06.2007.
- ✓ Oksalna kiselina 3,5% u šećernom sirupu, 5 ml po ulici 20.11.2007.



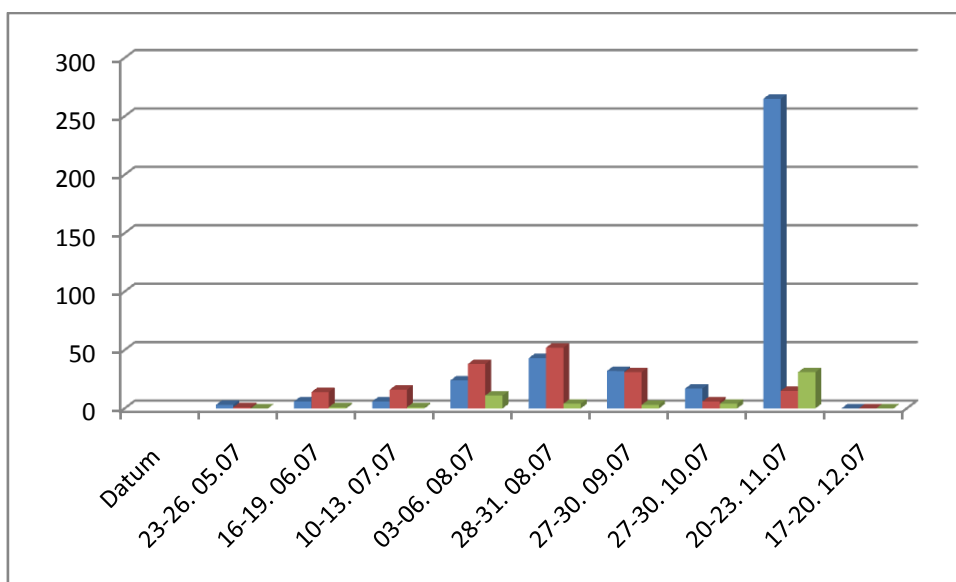
Grafikon 4. Prikaz dinamike pada *Varroa* u zajednici 1, praćeno od 23.05.2007. do 14.01.2008.



Grafikon 5. Prikaz dinamike pada *Varroa* u zajednici 2, praćeno od 23.05.2007. do 14.01.2008.



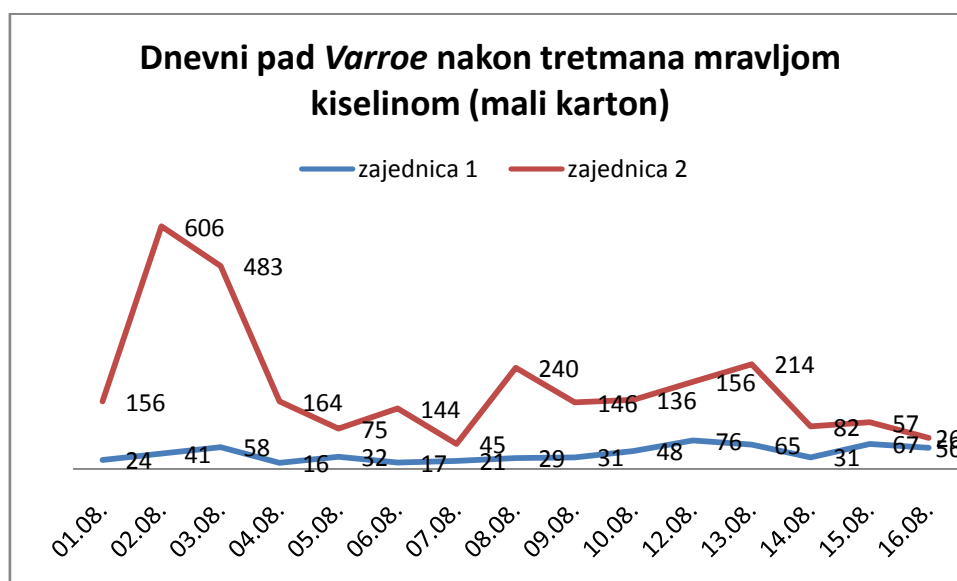
Grafikon 6. Prikaz dinamike pada *Varroa* u zajednici 3, praćeno od 23.05.2007. do 14.01.2008.



Grafikon 7. Zajednički prikaz pada *Varroa* u tri zajednice u periodu od 23.05.2007. do 20.12.2007.

Tabela 16. Praćenje pada *Varroe* u dvije pčelinje zajednice (1 i 2) i primjena mravlje kiseline (mali karton)

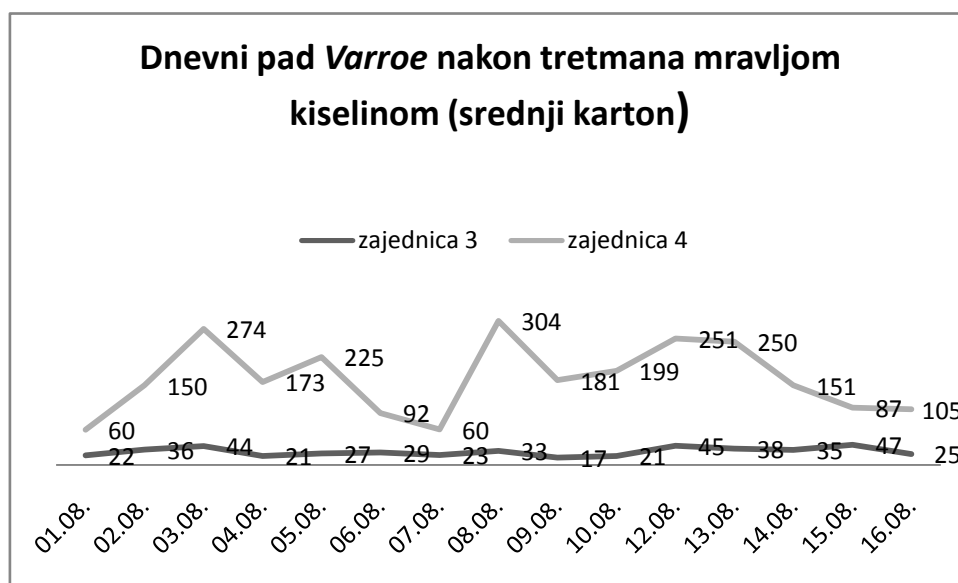
Datum	Zajednica 1.	Zajednica 2.
01.08.	24	156
02.08.	41	606
03.08.	58	483
04.08.	16	164
05.08.	32	75
06.08.	17	144
07.08.	21	45
08.08.	29	240
09.08.	31	146
10.08.	48	136
12.08.	76	156
13.08.	65	214
14.08.	31	82
15.08.	67	57
16.08.	56	26



Grafikon 8. Pad *Varroe* nakon tretmana

Tabela 17. Praćenje pada *Varroe* u dvije pčelinje zajednice (3 i 4) i primjena mravlje kiseline (srednji karton)

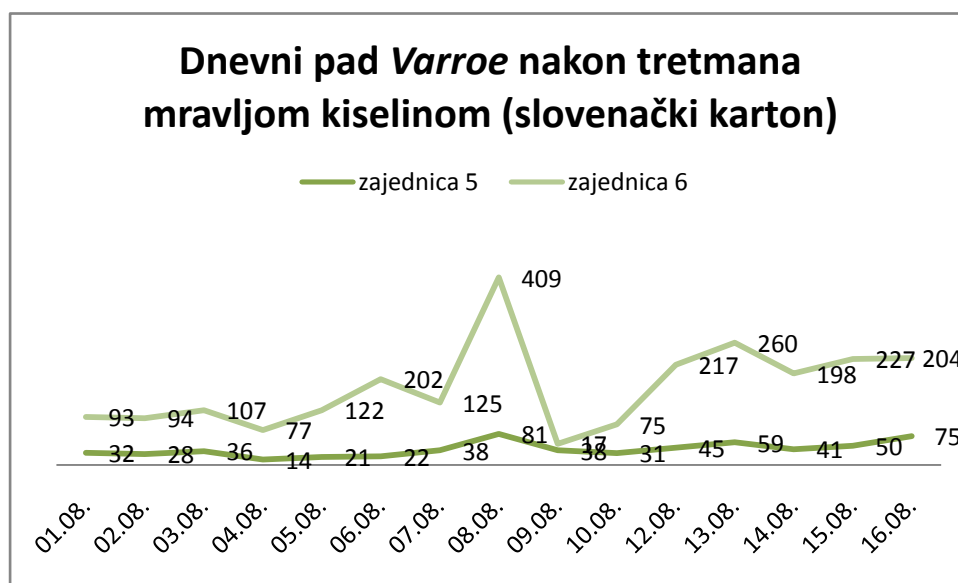
Datum	Zajednica 3.	Zajednica 4.
01.08.	22	60
02.08.	36	150
03.08.	44	274
04.08.	21	173
05.08.	27	225
06.08.	29	92
07.08.	23	60
08.08.	33	304
09.08.	17	181
10.08.	21	199
12.08.	45	251
13.08.	38	250
14.08.	35	151
15.08.	47	87
16.08.	25	105
Ukupno	463	2562



Grafikon 9. Pad *Varroe* nakon tretmana

Tabela 18. Praćenje pada *Varroe* u dvije pčelinje zajednice (5 i 6) i primjena mravlje kiseline (slovenački karton)

Datum	Zajednica 5.	Zajednica 6.
01.08.	32	93
02.08.	28	94
03.08.	36	107
04.08.	14	77
05.08.	21	122
06.08.	22	202
07.08.	38	125
08.08.	81	409
09.08.	38	17
10.08.	31	75
12.08.	45	217
13.08.	59	260
14.08.	41	198
15.08.	50	227
16.08.	75	204
Ukupno	611	2427



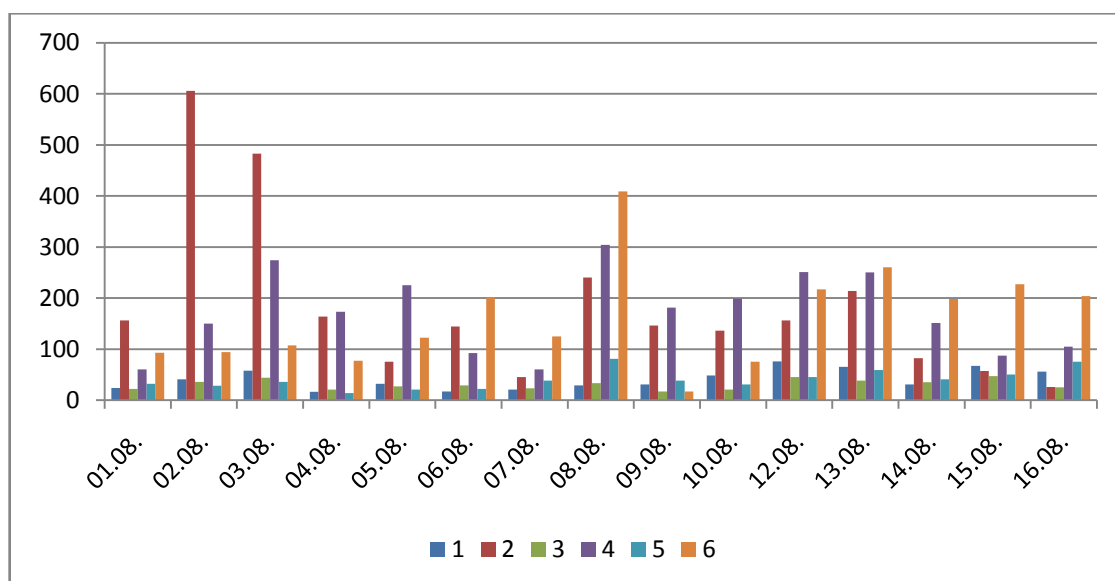
Grafikon 10. Pad *Varroe* nakon tretmana

Efikasnost tretmana i pad *Varroe* sa različitim dispenzerima za primjenu mravlje kiseline u različitim zajednicama tokom 2007.

1. Mravlja kiselina 85%, u količini od 100 ml

*Tabela 19. Prikaz pada *Varroe* i efekata djelovanja primijenjene mravlje kiseline u košnici sa različitim nivoima isparavanja zavisno od površine sa koje se isparavanje odvijalo (mali, srednji i slovenački karton)*

Zbirni prikaz						
Karton	mali		srednji		slovenački	
Datum	1	2	3	4	5	6
01.08.	24	156	22	60	32	93
02.08.	41	606	36	150	28	94
03.08.	58	483	44	274	36	107
04.08.	16	164	21	173	14	77
05.08.	32	75	27	225	21	122
06.08.	17	144	29	92	22	202
07.08.	21	45	23	60	38	125
08.08.	29	240	33	304	81	409
09.08.	31	146	17	181	38	17
10.08.	48	136	21	199	31	75
12.08.	76	156	45	251	45	217
13.08.	65	214	38	250	59	260
14.08.	31	82	35	151	41	198
15.08.	67	57	47	87	50	227
16.08.	56	26	25	105	75	204
Ukupno	612	2730	463	2562	611	2427

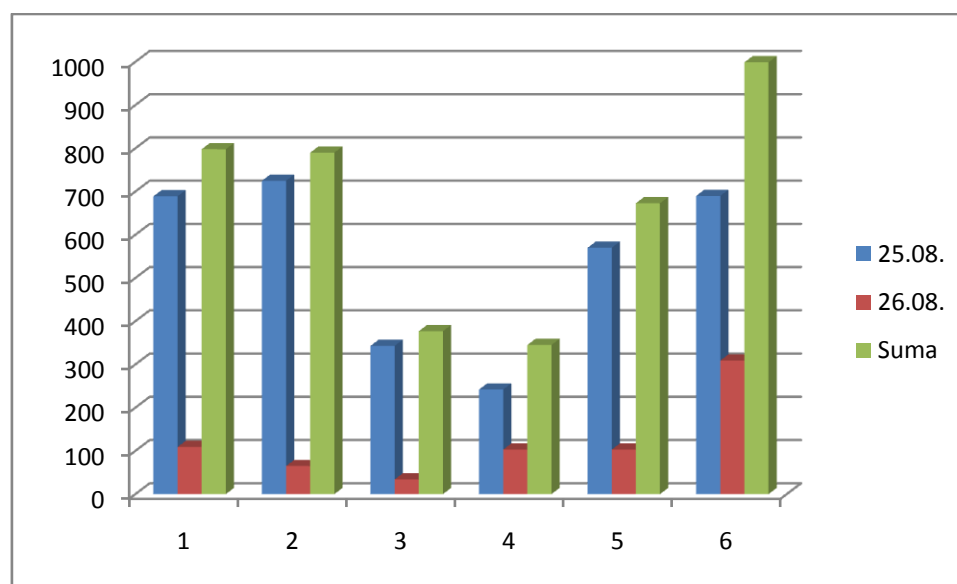


Grafikon 11. Prikaz pada Varroe nakon tretmana u zajednicama (od 1. do 6)

- Tretman amitrazom (Mitak®), pad Varroe, kontrolni tretman za dokaz efikasnosti mravlje kiseline na istim zajednicama

Tabela 20. Rezultati primjene amitraza i pad Varroa u šest praćenih zajednica

Datum	1	2	3	4	5	6
25.08.	689	725	343	242	570	690
26.08.	109	65	34	103	103	309
Suma	798	790	377	345	673	999



Grafikon 12. Pad Varroe nakon tretmana amitrazom praćen na šest zajednica (od 1. do 6)

DISKUSIJA

Medonosna pčela, *Apis mellifera*, od vitalnog je značaja s obzirom na njen uticaj u oprašivanju poljoprivrednih površina. Smatra se da u američkoj ekonomiji prihod od procijenjene vrijednosti polinacijskog servisa pčela iznosi i više od 15 milijardi dolara godišnje (Chen, 2004). Pčelinje zajednice u uslovima savremene pčelarske prakse najznačajnije su komercijalni oprašivači za sve one vrste poljoprivrednih kultura koje su zavisne od oprašivanja i za čiju reprodukciju je potrebno učešće insekata. Ove kulture i njihovi proizvodi čine 35% ukupne poljoprivredne proizvodnje u svijetu (Genersch, 2010). Posljednih nekoliko godina neke evropske zemlje, kao Austrija, Njemačka, Švedska i Švajcarska suočavaju se sa značajnim smanjenjem broja pčelinjih zajednica, dok se u nekih drugim zemljama, kao što su Grčka, Italija, Portugal i Španija, broj pčelinjih zajednica značajno povećava (Van Engelsdorp and Meixner, 2010). Razloge gubitaka treba tražiti među onima koji čine pčelarsku praksu, uslove okoliša u kojima se vrši pčelarenje, kao i one koji su vezani za genetske potencijale same pčelinje zajednice. Zdravstveni status zajednice homeostatski je zavisian od interakcije najrazličitijih faktora od kojih su u prvom redu bolesti i nametnici pčelinje zajednice. Život i zdravlje pčelinjih zajednica izloženi su različitim uticajima patogena, uključujući viruse, bakterije, gljivice, protozoe, grinje, akare.

Patogeni pčela realna su opasnost za opstanak pčelinje zajednice sa stanovišta zdravstvene zaštite pčela.

Zbog toga je i proučavanje virusnih infekcija i njihovog uticaja na zdravstveni status pčelinje zajednice, pčelinjaka, u posljednje vrijeme, dokazalo prisustvo infekcija kod pčela naseljenih u najrazličitijim geografskim nišama. Selekcija pčela na rezistentnost i tolerantnost jedan je od glavnih zadataka uzgojne genetike u pčelarstvu. Detekcija gena koji uslovljavaju higijensko ponašanje unapređuje moguću supresiju *Varroa* infestacija te je stvaranje linija pčela rezistentnih na *Varrou* već ugrađeno u uzgojne programe.

Na teritoriji Republike Srpske registrovano je sedam centara za ugoj matica, od kojih su dva nosioci selekcijskog programa, a ostali su nosioci reproduktivnog programa.

Uzorkovanje matica sa pripadajućim pratljama u posebno obilježenim drvenim kavezima izvršili su odgajivači u periodu avgusta mjeseca 2006. godine.



Slika 26. Distribucija selekcijsko-reprodukcioni centara u RS u 2006. Godini

Šezdeset osam uzoraka (matica i pčela pratljica) pregledani su na šest virusa: ABPV, BQCV, DWV, CBPV, SBV, KBV, što je ukupno bilo 408 pojedinačnih amplifikacija vizueliziranih nakon gel-ektroforeze (end point PCR) postupka u reakciji RT-PCR dijagnostike. Veliki broj pokrenutih ekstrakcija i amplifikacija bio je dobar način laboratorijskog sticanja rutine u ovom dijelu veterinarsko-entomološke molekularne dijagnostike virusa.

Pozitivan odgovor na prisustvo specifičnog dijela virusnih genoma dobijen je samo u slučaju virusa crnog matičnjaka, BQCV. O molekularnom nalazu ovog virusa kod matica metodama RT-PCR, sopštavaju u publikacijama dva značajna autora: na selekcijskim pčelinjacima u jednom istraživanju u Poljskoj, Topolska (2008) je utvrdila BQCV kao faktor uginuća matice u leglu u 66% slučajeva. U jednom radu u SAD (Chen et al., 2005), 86% matica (n=29) bilo je pozitivno na BQCV. Iako naši rezultati pokazuju da se virusi crnog matičnjaka mogu naći kod matica u selekcijskim centrima, oni ne daju više informacija kako ove infekcije mogu uticati na ponašanje ili na fiziologiju matica. Za dobijanje ovakvih informacija biće potrebno izvršiti dodatna ispitivanja o virusnoj ekologiji kako BQCV tako i ostalih virusa utvrđenih kod matica.

Pozitivan nalaz utvrđen je iz uzoraka matica, radilica ili jednih i drugih u šest od sedam kontrolisanih uzoraka centara za selekciju i reprodukciju na teritoriji RS. Ovim istraživanjem dobijeni su prvi epizootiološki i sekvencioni podaci o prisustvu jednog od šest bitnih virusa pčela sa teritorija Republike Srpske, Bosne i Hercegovine.



Slika 27. Matica i radilice *A. mellifera carnica* (Stanišić M. ©)

Negativni odgovori na ostalih pet vrsta virusa (ABPV, CBPV, SBV, KBV, DWV) nisu dokaz da ti virusi nisu prisutni u pomenutim selekcionim centrima, nego samo dokaz da u uslovima molekularno-dijagnostičkih procedura iz rađenih uzoraka oni nisu utvrđeni. Iako do danas virusi pčela nisu specifično uključeni u programe uzgojnih zahtjeva, ima nastojanja da se u budućim reproduktivnim centrima uzgajaju matice rezistentne i na neke viruse.

Prisustvo virusa kod medonosne pčele poznato je još od 1963. godine kada su virus hronične paralize pčela i virus akutne paralize pčela bili izolovani (Bailey et al. 1963). Virusne infekcije smatraju se uzročnicima primarnih oboljevanja kod pčela koja mogu izazvati njihova uginuća u različitim razvojnim stadijumima te se poznavanje pojavljivanja frekvencije raširenosti u odnosu na šest najčešće pominjanih virusa smatra potrebnom informacijom za utvrđivanje zdravstvenog statusa kako jedinke tako i ukupne pčelinje zajednice.

Od svih patogena koji ugrožavaju zdravlje pčele virusi su u posljednje vrijeme najviše proučavani. Mnoge studije su utvrdile širom svijeta virusne infekcije pčela u formi multiplih infekcija koje se šire najčešće inaparentno, a registruje se i u naizgled zdravim pčelinjim zajednicama, pri čemu nema jasnih geografskih korelacija, a registruju se sezonalne varijacije s obzirom na detekciju virusa. Iako je do sada opisano gotovo osamnaest različitih virusa kod pčela, mnogi od njih nisu prepoznati

na osnovu kliničkih manifestacija. Za mnoge viruse ne postoje patološki procesi sa nastankom karakterističnih simptoma na individualnom nivou ili na nivou zajednice. Dosadašnja iskustva pokazala su da šest virusa po svom značaju mogu izazvati teže zdravstvene promjene te se zbog toga oni i najviše proučavaju:

Osnovni cilj našeg istraživanja bio je utvrđivanje praktičnih mogućnosti aplikacije molekularnih metoda baziranih na RT PCR dijagnostičkoj metodologiji i utvrđivanje prisustva nekog od traženih virusa.

Na teritoriji Bosne i Hercegovine pretraživali smo molekularnim metodama, po prvi put, kvalitativno prisustvo šest različitih virusa koji inficiraju zajednice *Apis mellifera*. Radi se o sljedećim virusima: ABPV, BQCV, DWV, CBPV, SBV, KBV.

Metodama molekularne dijagnostike dokazano je prisustvo dijela genoma pet od šest traženih virusa, a to su: ABPV, BQCV, DWV, CBPV, SBV u formama pojedinačnih ili multiplih virusnih infekcija. Tokom 2006. i 2007. godine obrađeno je 82 slučajno odabrana uzoraka. U njima su se nalazili uzorci uzeti sa klinički zdravih pčelinjaka, ali i uzorci porijeklom od onih pčelinjaka koji su u anamnezi imali navode slabljenja zajednica ili njihovog ugibanja. Radilo se o četrdeset tri različita pčelinjaka sa četrnaest epizootioloških područja BiH. Za potrebe dijagnostike ovih uzoraka pokrenuto je ukupno 410 PCR amplifikacija na pet ispitivanih virusa.

Procenat od 87,80% ispitanih uzoraka ($n = 82$) bilo je pozitivno na prisustvo bar jednog od pet dokazivanih virusa. Dokazana pojavnost pojedinih virusa u odnosu na broj uzoraka kretala se u vrijednostima: ABPV 39,02%; DWV 70,73%; BQCV 56,09%; SBV 10%; CBPV 15,85%.

O vrijednostima i navodima iz literature i o svakom nalazu virusa daće se detaljnije obrazloženje tako da se svaki nalaz virusa pčela pojedinačno analizira u kontekstu dobijenih rezultata i dosadašnjih literaturnih podataka.

Nedugo nakon što je *V. destructor* infestirala pčele zapadne hemisfere, uočena je pojava kliničkog simptoma koji je bio prezentovan u formi različitih deformiteta i atrofija krila, otkrivajući incidentno prisustvo virusa DWV. Ove promjene su bile u direktnoj srazmjeri sa stepenom infestacije *Varroama* u razvoju same lutke te je zaključeno da poremećaji nastaju na nivou hemolimfe infestirane lutke na kojoj parazitira *Varroa* (De Jong et al., 1982; Koch and Ritter, 1991). Godine 1989. utvrđeno je da promjene u izgledu krila nisu samo rezultat napada *Varroae* na pčele, nego da se radi o virusom uzrokovanim kliničkim simptomima. Iz tog perioda datira i

naziv samog virusa – DWV (virus deformisanih krila) (Bailey and Ball, 1991; Ball, 1989, 1993). DWV je virus koji je izazivao skrivene, gotovo asimptomatske infekcije. Na pčele se prenosi vertikalno, preko trutova i matica, ili horizontalo, preko hrane za ishranu larvi (Hails et al., 2007). Ovaj vektorski prenos na lutku, osim što je deformisao krila, dovodio je, po mišljenju nekih autora, do skraćivanja i nadutosti abdomena pčele, a u nekim slučajevima i do poremećaja diskoloracije abdomena (De Miranda and Fries, 2008; Yue and Genersch, 2005; Yue et al., 2006, 2007). Pčele sa deformisanim krilima su nedovoljno vitalne i ugibaju u kratkom periodu nakon njihovog izlijeganja. Na ovaj način, zahvaćenost ovim virusom može izazvati značajne štete u zajednici. Ovo je opet u vezi sa različitim stepenom infestacije *Varroa*, koje na ovaj način imaju funkciju vektora (Ball and Allen, 1988; Bowen-Walker et al., 1999; Yang and Cox-Foster, 2007; Yue and Genersch, 2005).

Skorašnja ispitivanja su pokazala da se na mjestu virusne inokulacije u tkivo larve ili lutke detektuje značajna replikacija virusa, što u slučajevima visokih titrova DWV kojeg prenose grinje očigledno dovodi do stvaranja odličnih uslova za razvoj štetnih uticaja DWV virusa u razvojnom obliku pčele (Gisder et al., 2009). Dokazano je da *Varroa* nije samo mehanički nego i biološki vektor za ovaj virus i da će sve posljedične funkcije i disfunkcije pčelinje zajednice biti u srazmjeru sa količinom DWV infekcije. To znači sljedeće: što više grinja u košnici nosi virus koji se u njihovom tijelu dodatno replicira – veće su šanse da će lutka u razvoju razviti fatalnu DWV infekciju i da, posljedično tome, zajednica može kolabirati, tj. nestati (De Miranda and Genersch, 2010).

Gorenavedeno pokazuje da se na nivou mehanizma virus-*Varroa*-pčela na neki način utiče na imunološki sistem pčele, što dovodi do nastanka očigledne kliničke slike DWV infekcije. Posljednja istraživanja ukazuju na mogućnost da *Varroa* može aktivno uticati na aktivaciju endogene DWV infekcije djelujući imunosupresivno na domaćina (Navajas et al., 2008; Yang and Cox-Foster, 2005). Virus koji deformiše krila u asocijaciji sa *V. destructor* može biti proglašen kao emergentni virusni patogen sa teškim efektima ne samo na nivou pojedinične pčele, nego i ukupne pčelinje zajednice. Četvorogodošnji monitoring koji je proučavao razloge i značaj prezimljavanja pčelinje zajednice potvrdio je negativan uticaj DWV virusa. Utvrđivanje virusne sekvence DWV u mozgu asimptomatskih pčela radilica bio je značajan dokaz u posljedičnom zimskom mortalitetu takvih pčelinjih zajednica (Yue and Genersch, 2005; Yue et al., 2007; Genersch et al., 2010).

Incidenca i prevalenca DWV još uvijek se zasniva na molekularnom dokazu više nego na samoj patogenezi DWV. To znači da virusni titrovi nisu neophodni i ne moraju biti dovoljni da bi proizveli očigledne promjene deformisanosti krila.

U ispitanim slučajno odabranim uzorcima pčela ($n = 82$) utvrdili smo prisustvo virusa DWV u 58 uzoraka, što je činilo 70,73% pozitivnih reakcija na ovaj virus.

Literaturni podaci govore o sljedećim nalazima: DWV titar je pronađen u 25% ispitivanih društava u Švajcarskoj (Berthoud et al., 2010); posmatranjem postotaka pozitivnih uzoraka u Austriji su dokazani rezultati za DWV: 25% u maju, 11% u julu i 24% u septembru (Novotny, 2007); u Holandiji DWV 16% pozitivnih uzoraka (Jozef van der Steen, 2008); u Austriji je drugo ispitivanje u periodu 2006–2007. godine dokazalo prisustvo DWV u 65% ispitivanih uzoraka (Rudolf Mossbechofer, 2008); na Tajlandu DWV je utvrđen kod 33% uzoraka pčela; u Sloveniji u periodu između 2006. i 2008. godine, Gregorc Aleš u cilju utvrđivanja virusnih infekcija kod matica utvrdio je infekciju DWV u 65% uzoraka.

Virus hronične paralize pčela (CBPV) izaziva dvije kliničke manifestacije koje se opisuju kao oboljenje pčela koje ne mogu letjeti, pužu i imaju asimetrično položena krila. Ova forma bolesti je praćena teškim dizenterijama u toku nekoliko dana. U drugoj formi klinička slika prepoznaje odrasle pčele koje izgledaju crne jer je kod njih došlo do gubitka dlačnog pokrivača. Zajednica može spontano ozdraviti mada u značajnom postotku oslabljene zajednice mogu i uginuti. U slučajno odabranim uzorcima pčela ($n = 82$) utvrdili smo prisustvo CBPV u 13 uzoraka, što je činilo 15,85% pozitivnih dokaza za taj virus. Literaturno postoje podaci koji govore o sljedećim rezultatima ispitivanja: grupa švajcarskih autora, Hélène Berthoudet et al. (2010), nije utvrdila prisustvo ovog virusa, u Austriji (Novotny, Koglbberger 2007) i Holandiji (Jozef van der Steen, 2008) takođe nije bilo dokazanog prisustva CBPV, a u uzorcima matica virus CBPV je u jednom istraživanju u USA (Chen et al., 2005) dokazan u 14% uzoraka.

Virus mješinstog legla (SBV) izaziva infekciju legla koja za posljedicu ima uginuće larve. Inficirane larve ne mogu preći u fazu lutke, pri čemu se stvara endocistična tečnost oko integumentuma nepreobražene larve, formirajući pri tome mješini sličnu strukturu po kojoj je ova bolest i dobila ime. Virus može inficirati i odrasle pčele i može se propagirati u njima a da pri tome pčele ostaju sasvim zdrave. Infekcija ovim virusom dešava se najčešće u proljeće prilikom intenzivnog razvoja legla. Ovaj virus

se najlakše klinički prepoznaje, jer ima prepoznatljivu sliku mješinsto promijenjene larve.

U uzorcima matica sa selekcijsko-reproduktivnih pčelinjaka ($n = 68$) nije utvrđeno prisustvo ovog virusa. U ispitanim ($n = 82$) slučajno odabranim uzorcima pčela utvrdili smo prisustvo SBV u devet slučajeva, što je činilo 10,97% pozitivnih uzoraka. Literaturno, u uzorcima matica postoje podaci o 87% pozitivnih dokaza na SBV u poljskim pčelinjacima (Topolska, 2008) ili 62% uzoraka matica u USA (Chen et al., 2005), a u Sloveniji (Gregorc A., 2009) 8% pozitivnih matica. Pregledom dostupnih objavljenih epizootioloških podataka komercijalnih pčelinjaka, saopšteni procenat za SBV bio je različit s obzirom na vrijeme i područje ispitivanja: SBV bio je prisutan u austrijskim pčelinjacima posmatrano po mjesecima 44% u maju, 72% julu i 50% u septembru (Novotny, Koglberger, 2007); u Njemačkoj SBV je dokazan u 33% uzoraka (Siede R. et al., 2008); u Holandiji 40% (Jozef van der Steen, 2008); na Tajlandu 4% (Sirikarn Sanpa, Panuwan Chantawannakul, 2009).

Iako je ABPV u početku bio smatran za ekonomski beznačajan virusni patogen pčelinje zajednice, danas u njegovoj asocijaciji sa *V. destructor* on pokazuje znake alarmatnog patogena. ABPV i IAPV su veoma bliski članovi familije *Dicistroviridae*. ABPV je bio otkriven slučajno u toku laboratorijskog rada na dokazu CBPV (Bailey et al., 1963). Za razliku od CBPV, koji izaziva prirodno žarište infekcije opisane kao paraliza pčela (Ribière et al., 2010), ABPV može biti pronađen u istim koncentracijama kao i kod infekcija paralitične forme (izazvanih sa CBPV), kao i kod apsolutno zdravih pčela (Bailey et al., 1963). U slučajevima vještačkih infekcija dokazano je da ABPV postaje visokovirulentan i dovodi do uginuća pčela u roku od 3–5 dana nakon infekcije (Bailey et al., 1963). Ovakav nalaz razlikovao se od dotadašnjih mišljenja da ABPV ima veoma nizak ili nikakav uticaj na zdravstveni status inficiranih zajednica, te je u mogućnosti izazvati hronične latentne infekcije bez pojave simptoma bolesti. ABPV ima geografsku distribuciju sličnu onoj koju ima i *A. mellifera* i posljedično tome je izolovan iz apsolutno zdravih odraslih pčela iz različitih regiona svijeta. Dotadašnje naizgled benigne forme ABPV infekcije dramatično su se promijenile nakon pojave *V. destructor* u Evropi (Allen and Ball, 1996; Anderson, 1988; Bailey, 1965, 1975; Bailey et al., 1981; Hung et al., 1996a; Tentcheva et al., 2004).

U jako infestiranim pčelinjim zajednicama, leglo i odrasle pčele mogu očigledno ugibati zbog posljedica infekcije ABPV (Ball, 1983, 1985; Ball and Allen, 1988;

Bekesi et al., 1999; Berenyi et al., 2006; Hung et al., 1996c; Nordström et al., 1999; Ritter et al., 1984).

Imajući u vidu ekstremnu virulentnost virusa ABPV kada se on injicira u hemolimfu pčele, nije začuđujuće da je taj virus počeo izazivati značajne probleme, posebno zato što je ABPV vektor koji je u stanju prenijeti na larve i odrasle pčele (Ball 1989). Za ABPV *V. destructor* služi kao mehanički vektor (Ball, 1989; Tentcheva et al., 2004; Wieggers 1988). Za razliku od uloge u vektorskoj transmisiji DWV, nema do sada jasnih dokaza da *V. destructor* podržava ili dozvoljava ABPV replikaciju i kao takva teško može da bude biološki vektor za ABPV. Činjenica da se virus ABPV često nalazi kako u klinički zdravim tako i u uginulim uzorcima pčela teško je procijeniti značaj ove infekcije na njegovu ulogu u procjeni zdravstvenog statusa (Bekesi et al., 1999; Berenyi et al., 2006; Tentcheva et al., 2004).

Dvogodišnja studija koja je proučavala značaj ABPV i zimske gubitke pčelinjih zajednica u Njemačkoj (Siede et al., 2008) dokazala je signifikantnu značajnost u odnosu na stepen infekcije prije zime (ABPV) i zimskih uginuća za sezonu 2005/2006, što nije dokazano u periodu 2004/2005. Nakon toga, jedna opsežna njemačka studija koja je trajala četiri godine i u ispitivanje uključila 1200 košnica sa više od 120 pčelinjaka dokazala je visokosignifikantnu relaciju između ABPV infekcije u jesen i gubitka pčelinjih zajednica u toku prezimljavanja (Genersch et al., 2010).

Napadnutost pčelinje zajednice grinjom *V. destructor* i pridruženost infekcija DWV i ABPV očigledno da ima ključnu ulogu u jednom posebnom sindromu koji se naziva *parazitarno-krpeljski sindrom* (Hung et al., 1995, 1996b; Shimanuki et al., 1994). Tačna uloga *Varroa* u povećanju virulentnosti u ABPV nije još uvijek sasvim određena.

U ispitanim slučajno odabranim uzorcima pčela (n = 82) utvrdili smo prisustvo virusa ABPV u 32 ispitana uzorka, što je činilo 39,02% ukupno pozitivnih rezultata na ovaj virus. Literaturni podaci govore o sljedećim nalazima za virus ABPV: u Austriji pozitivnih rezultata je bilo u 2% u maju, 57% u julu 52% u septembru (Nowotny, H. Koglberger 2007); u Njemačkoj ABPV utvrđen je u 34% (Siede R. et al., 2006); u Holandiji (Jozef van der Steen, 2008) na uzorku od 170 slučajno izabranih pčelinjaka širom zemlje nije utvrđeno prisustvo ABPV (0%); u Sloveniji je Gregorc, A. (2009) dokazao kod matica ABPV u 4% slučajeva. Na Tajlandu (Sirikarn Sanpa, Panuwan Chantawannakul, 2009), na 46 zdravih košnica uz primjenu RT-PCR detektovano je 20% ABPV uzoraka pčela.

Izraelski soj virusa akutne paralize pčela otkriven je nedavno, a dokazan je na teritoriji Izraela. Homogenizat virusa samo jedne uginule pčele bio je u vještačkoj

infekciji u stanju izazvati teške forme mortaliteta vještački inficiranih larvi na nivou cijele zajednice (Maori et al., 2007). Mnogobrojna istraživanja koja su proučavala prisustvo IAPV pokazala su da je on bio u populaciji pčela prisutan duže vrijeme (Chen and Evans, 2007; Palacios et al., 2008), ali su se nalazi IAPV, greškom, zbog njihove vrlo bliske genetske srodnosti proglašavali za virus kašmirske bolesti pčela (KBV). Ovo je bio razlog zbog kojeg su nastale mnogobrojne greške u dijagnostici ova dva virusa, koje je čak bilo vrlo teško razlučiti uz pomoć konvencionalnih reverzno-transkripcijskih polimeraza lančanih protokola (De Miranda et al., 2010).

IAPV je ekstemno virulentan kada se injicira u lutke odrasle pčele (Maori et al., 2007). Postoji sumnja da *V. destructor* na isti način utiče na virulentnost IAPV kao što to čini u slučaju DWV i ABPV. Za sada, malo je toga poznato u odnosu na transmisiju i patološke mehanizme IAPV, jer je taj virus nedavno postao fokus virusologa jer se smatralo da je jedan od osnovnih faktora u nastanku CCD, sindroma iznenadnog gubitka pčelinjih zajednica, uglavnom na teritoriji USA (Van Engelsdorp et al. 2007, 2009). Potencijalna virulentnost IAPV, kako za pčelu tako i za zajednicu, neupitna je jer je ovaj virus bio identifikovan kao marker ili sekundarni agens za slučaj CCD (Cox-Foster and VanEngelsdorp, 2009; Cox-Foster et al., 2007), tako da je korišten jedan antivirusni tretman specifičan za IAPV (RNK-I) koji je bio u stanju utihniti IAPV infekciju i umanjiti simptome CCD (Maori et al., 2009).

U vrijeme prikupljanja i obrade uzoraka iz 2007. i 2008. godine sa teritorije BiH, virus IAPV nije bio predmet istraživanja u laboratoriji veterinarskog fakulteta u Beču. Laboratorija u to vrijeme nije posjedovala prajmere za ovaj soj ABPV. Kako bismo dopunili informaciju o eventualnom pristvu ovog soja u BiH, što se moglo vezati za interes istraživanja ovog rada, poslali smo slučajan uzorak zdravih i uginulih pčela po dogovorenoj proceduri sa medijumom za konzervisanje uzoraka. Ispitivanje koje je sprovedeno u Francuskoj u okviru aktivnosti radne grupe za kontrolu patogena nije potvrdilo prisustvo virusa u dostavljenim uzorcima. Kako se radi o visoko pretpostavljenoj prevalenci (više od 50%), u epizotološkom ispitivanju na malom broju uzoraka nije utvrđeno prisustvo IAPV, što ne isključuje mogućnost prisustva virusa sa manjom prevalencom. IAPV je prevalentan na Srednjem Istoku, Australiji i USA (Cox-Foster et al., 2007), ali se mnogo rjeđe nalazi na teritoriji Evrope (De Miranda et al., 2010, Genersch et al., 2010).

Literaturni rezultati u svijetu sugerišu da je IAPV djelomično odgovoran za opisane simptome i uginuća pčelinjih zajednica u toku CCD, mada to nikada nije jasno potvrđeno.

Kašmirski pčelinji virus (KBV) otkriven je kod pčela u različitim dijelovima Azije, ali sada se već zna da je prisutan u dijelovima USA i nekim dijelovima Evrope (Norman Carrec, 2009). Ovaj virus je dokazano fatalan nakon laboratorijskih infekcija pčela, a dokazano je da je *Varroa destructor* u stanju prenijeti KBV. Takođe je dokazan direktan prenos sa pčele na pčelu. Značaj i moguće emergentne forme panzootski prisutnog virusa KBV privukli su najviše istraživačkih radova, ali nema jasnih podataka o njihovoj prevalenci, osim u slučaju holandskih ispitivanja (Jozef van der Steen, 2008) koji nije je u uzorku od 170 slučajno izabranih pčelinjaka širom zemlje utvrdio prisustvo niti jednog nalaza virusa KBV (0%).

U uzorcima matica u jednom ispitivanju dokazano je 21% pozitivnih dokaza za prisustvo KBV (Chen et al., 2005).

U 68 uzoraka iz selekcijsko-reproduktivnih centara iz Republike Srpske nismo uspjeli dokazati prisustvo KBV, a u ispitivanju uzoraka sa pčelinjaka BiH (n = 82) nismo uopšte radili dokaz za ovaj virus.

Virus crnog matičnjaka, BQCV, često je dijagnostikovao virus kod pčela. Klinički virus inficira lutke matice, posebno u sezoni proljeće – rano ljeto. Inficirani matičnjaci zadobijaju specifičan izgled u kojem su zidovi matičnjaka manje ili više crno prebojeni, dok se u njima zatiče uginula i potamnjela lutka matice.

Virus BQCV u istraživanjima u reproseleksijskim centrima u Republici Srpskoj 2006. godine (n = 68 uzoraka) bio je jedini dokazan virus kod radilica i neoplođenih matica u šest od sedam ispitanih lokacija. Istraživanja iz Merilanda (USA) utvrdila su prisustvo ovog virusa kod 100% ispitivanih matica, a u Sloveniji je BQCV dokazan sa procentom infekcije 25% (Gregorc A., 2009).

U ispitanim (n = 82) slučajno odabranim uzorcima pčela utvrdili smo prisustvo BQCV u 46 uzoraka, što je bilo ukupno 56,09% pozitivnih ispitivanja za taj virus. Literaturno postoje podaci koji govore o sljedećim rezultatima ispitivanja: u Njemačkoj BQCV u 46% (Siede R. et al., 2006), u Austriji 67% u maju, 46% u julu i 43% u septembru (Novotny, Koglberger, 2007); a u periodu 2006–2007. BQCV (47%) (Rudolf Mossbechofer et al., 2008), u Holandiji 92% (Jozef van der Steen, 2008).

Iz razloga nepotpunih i subjektivnih anamnestičkih podataka, u slučaju uginulih zajednica, oslabljenih zajednica ili brojčano smanjenih zajednica, nismo uspjeli utvrditi jasne veze sa prisutnim identifikovanim virusima, kao ni neku pravilnost u njihovom pojavljivanju na određenom teritoriju. Od osamdeset dva ispitana uzorka,

njih 87,80% bilo je pozitivno na prisustvo bar jednog virusa. Činjenica je da su se virusi u našem ispitivanju na teritoriji Bosne i Hercegovine detektovali u formama najrazličitijih koinfekcija sa dva, tri, četiri ili čak svih pet virusa u ispitivanom uzorku. Iz izrađenih mapa uz pomoć softvera Arc GIS 10.0 ESRI jasno se vidi prostorna distribucija pojedinačnih virusa i pčelinjaka, kao i zajednički prikaz svih virusa na jednoj mapi. Govoriti o nekoj sljedljivoj prostornoj incidenciji virusa u ovom radu nije moguće zbog vrlo složenih međusobnih korelacija virusa i domaćina, a osobina slučajno izabranog uzorka ne ostavlja mogućnost preciznih epizootioloških podataka. U 10 uzoraka nije utvrđeno prisustvo virusa; 21 uzorak bio je pozitivan na jedan virus; 27 uzoraka imalo je koinfekciju sa dva virusa, 15 uzoraka bilo je pozitivno na tri virusa pčela; sedam uzoraka imalo je četiri različita virusa; u dva uzorka detektovano je prisustvo dijela genoma virusa specifično za svih pet virusa.

Apis mellifera je vrsta koja je zbog velikog ekonomskog značaja koji nosi sa sobom predmet globalnih naučnih istraživanja koja su u posljednjih nekoliko godina popularno nazvana „zlatna era u istraživanju pčela“. Zahvaljujući razvoju molekularne tehnologije, došlo je do izuzetnog napretka u svim oblastima biomedicinskih nauka. Istovremeno su humana, biljna i animalna virusologija profitirale u ovom progresu u okviru kojeg je oblast virusa medonosnih pčela još uvijek novina.

Nakon parazitizma koji je nastao kao posljedica adaptacije *V. destructor* na evropsku pčelu, novu vrstu, evolucijski posmatrano, nastaje nova forma načina opstanka pčelinje zajednice koja do tada nikada ranije nije tako značajno ugrožavala opstanak vrste *Apis mellifera*.

Održivost komercijalnog, kao i hobističkog načina pčelarenja zavisiće u prvom redu od izbora i efikasnosti borbe protiv *Varroe*, a uspješnost odabranih strategija biće u direktnoj srazmjeri efikasnosti kontrole virusnih vektora i smanjenja virulentnih napada tropizmom izmijenjenih virusa pčela. Poznata je činjenica da i na teritoriji Bosne i Hercegovine nema nijedne zdrave pčelinje zajednice (jer ona bez intervencije pčelara u suzbijanju *Varroe* ne bi mogla opstati), stavlja u težak položaj ovu vrstu proizvodnje. Simbiotski odnos između, evolucijski mjereno, tek pridošle *Varroe* i virusa, kao i promjena tropnosti virusa u odnosu na tkivo, razlog je zbog kojeg se u posljednjih dvadesetak godina intenziviralo ispitivanje značaja virusnih infekcija pčela. Razvoj molekularnih tehnika omogućio je jednostavniji uvid u prevalencu virusnih bolesti, što će omogućiti potpunije informacije u razumijevanju zaista dominantnih patogenih faktora i njihov uticaja na homeostazu pčelinje zajednice u nekom ekološkom sistemu.

Mnogobrojne studije do sada su se bavile raširenošću virusnih infekcija u formi inaparnetnih multiplih infekcija, čak u naizgled zdravim pčelinjim zajednicama.

Rezultati koji su dobijeni u oblasti molekularnih ispitivanja na prisustvo virusnih infekcija pčelinjih zajednica *Apis mellifera* u Bosni i Hercegovini pomogla su potpunijem uvidu u vrlo raznoliku „patosferu“. Nedostatak monitoringa u svijetu u odnosu na virusne bolesti pčela, kao i nepostojanje sistema informisanja u slučaju pojave virusnih žarišta u smislu prijavljivanja žarišta, aktuelan je problem. Ne postoji analiza rizika u sistemu procjene opasnosti novih i emergentnih virusnih bolesti pčela. Takođe, nepostojanje zakonskih procedura koje bi bile u stanju na neki način kontrolisati virusne bolesti dio je problema o kom će se vjerovatno u budućnosti OIE više baviti.

U prilog unapređenju znanja u ovoj oblasti istraživanja patogena vrste *Apis mellifera*, koja su se u vremenu izrade teze paralelno po drugim osnovama dešavala na teritoriji Bosne i Hercegovine, a koja se mogu dovesti u vezu sa tumačenjem zdravstvenog statusa zajednice, za potrebe diferencijalne dijagnostike, nekih zahtjeva međunarodne trgovine, kao i selekcijsko-reproduktivnih zahtjeva zdravstvenog statusa zajednica biće dodata u sljedećim epizootiološkim podacima:

1. Monitoring gubitaka pčelinjih zajednica po pravilima međunarodno standardizovanog upitnika koji je trebalo da prikupi i uporedi podatke o gubicima u pčelarstvu koliko je to globalno maksimalno moguće i na taj način objektivno činjenicama potkrijepi mišljenje o povećanim gubicima pčelinjih zajednica u svijetu (Van der Zee et al., 2012; Neumann et al., 2010).

U upitniku COLOSS projekta koji je pratio gubitke pčelinjih zajednica tokom četiri projektne godine dobijeni su sljedeći podaci za Bosnu i Hercegovinu: 2008/2009: 10,23%; 2009/2010: 8,6%; 2010/2011: 13,7%; 2011/2012: 20,23% (Santrač et al., 2012).

Na osnovu zvaničnih izvještaja ministarstava poljoprivrede oba entiteta BiH za sezonu 2009. u sistemu subvencija Bosne i Hercegovine, registrovano je 4115 pčelara koji su imali 262 780 prijavljenih košnica. Dokazani gubici za sezonu 2009/2010. bili su 8,6% pčelinjih zajednica, što je proračunato na ekonomske štete iznosilo 5 303 998 evra. Kada se ovoj vrijednosti doda utvrđen koeficijent vrijednosti oprašivanja, ukupna šteta za izgubljenih 8,6% pčelinjih zajednica iznosi 24 086 680 evra.

Masovni gubici koji se prijavljuju u svijetu prevazilaze okvire proučavanja jedne laboratorije ili istraživačkog centra ili samo jedne zemlje. Potreba da se slika gubitaka

sagleda obuhvatnije dovela je do pokretanja Projekta unutar COST akcije EU, međunarodne mreže COLOSS (prevencija gubitaka pčelinjih zajednica) na način da se kreiranom koordinacijom utvrde i spriječe značajni gubici pčela globalno. Za tu potrebu, 339 naučnika iz 57 participirajućih zemalja u četiri godine planiranog rada pokušali su ostvariti međunarodno prihvaćene standarde u monitoringu i primjeni dijagnostičkih postpaka, kao i poznavanju patogena, vitalnosti, biodiverziteta i genetike medonosne pčele.

Enorman je stres na koji se pčele evolucijski nisu mogle mogućnosti prilagoditi. Etički pristupi ovoj grani proizvodnje se često ne priznaju i ne poštuju. Govoreći o etici danas u svijetu za mnoge životinjske vrste postoji način zaštite nazvan „dobrobit životinja“ (*animal welfare*). Ovo je zakonski propisana oblast djelovanja veterinarske medicine koja ima strogo propisane forme pet minimalnih prava životinja, a samim tim i pčela (mada se o tome do sada nije na takav način razmišljalo):

- pravo na hranu i vodu: slobodan pristup svježoj vodi i hrani, što će omogućiti zdrav razvoj i život;
- pravo na udoban smještaj: život u prikladnoj okolini, osigurani zaklon i mjesto za odmor;
- pravo na život bez boli, ozljeda i bolesti: prevencija ili rano dijagnostikovanje i liječenje bolesti;
- pravo na izražavanje prirodnog ponašanja: život u prikladnom prostoru i uslovima, kao i društvu životinja iste vrste;
- pravo na život bez straha i opasnosti: život u uslovima koji će spriječiti psihičke patnje i stres.

Vlasnici životinja, držaoci kojima su one date na brigu, imaju obavezu da poštuju zahtjeve zakona o dobrobiti životinja. Poznajući postupke pčelarske prakse i razmišljanja o ovih pet životnih prava stiče se utisak kako pčele danas nemaju u najvećem broju slučajeva mnoga od pobrojanih prava, iako proizvode hranu i čine poljoprivredu uspješnijom te iako nisu zagađivači i ne trebaju nikakve ekološke takse. Bilo bi dobro doživjeti priznanje prava pčelama i potrebu njihovog očuvanja kroz zakon o dobrobiti pčela. Kada ova ideja u stručnoj, ali i pčelarskoj javnosti dostigne kritičnu masu interesovanja, moguće je zahtijevati od OIE (Svjetska organizacija za zdravlje životinja) da se i pčele uvrste na listu vrsta koje su pod zaštitom zakona o dobrobiti životinja. Do tada, pčelari u mnogim zemljama imaju na raspolaganju vlastito znanje i podršku države u zaštiti pčela, a glavni pravci ka smanjenju gubitaka

desiće se kroz usvajanja opisanih praksi (dobre pčelarske i dobre veterinarske prakse na pčelinjaku) i optimizacije nacionalnog i međunarodnog zakonodavstva.

2. Ispitivanje prisustva protozooarnog patogena *N. ceranae* koji se koincidentno pominje kao jedan od značajnih patogena koji utiče na preživljavanje pčelinjih zajednica na teritoriji BiH po prvi put je rađeno 2009. godine (Santrač et al., 2009). U uzorcima pčela sa različitih teritorija Bosne i Hercegovine molekularno-biološkim metodama u svim ispitanim uzorcima dokazana je infekcija sa *N. ceranae*, što dodatno komplikuje razlučivanje kliničke slike oboljenja i koincidentnih nalaza različitih patogena u slučaju dijagnostičke forenzike, a što se može dovesti u vezu i sa tumačenjem značaja virusnih infekcija. U svim pretraženim uzorcima nije bilo ustanovljeno prisustvo *N. apis*, što ukazuje na mogućnost da je na teritoriji Bosne i Hercegovine došlo do kompletne zamjene „stare“ *N. apis* novom vrstom *N. ceranae*. Nozemoza pčela je enzootska parazitoza, ali je unos novog patogena, emergentnog takođe, *Nosema ceranae*, umnogome promijenio kliničku sliku bolesti, kao i mjere u kontroli ovog patogena.

3. Na osnovu podataka protokola, parazitoloških pregleda uginulih pčela u dijagnostičkoj laboratoriji Veterinarskog instituta praćeno od 1994. godine nije bilo dokaza traheale grinje *Acarapis Woodi*, te tako, s obzirom na to da nema ni drugih literaturnih podataka o prisustvu trahealne grinje u BiH, ona nije od značaja u procjeni rizika zdravstvenog statusa pčelinjih zajednica.

4. Utvrđivanje prisustva uzročnika američke i evropske gnjiloće pčelinjeg legla iz uzoraka meda iz plodišnog dijela medišta pčelinjih zajednica u aktivnom monitoringu izvršena su ispitivanja tokom 2010. godine na teritoriji Republike Srpske, u projektu koji je imao za cilj ranu dijagnostiku bolesti legla. U ovom ispitivanju utvrđeno je da je uzročnik američke gnjiloće utvrđen iz uzoraka meda u 6,7% slučajeva, a da je *B. alvei* (sekundarni patogen, pratilac infekcija evropske truleži) u istim uzorcima imao 11,2% pozitivnih izolacija. Saznanja iz ovog projekta (Santrač V., 2011) značajna su i u kontekstu ove teze, zbog činjenice da se prisustvo i ovih bakterijskih patogena može navesti kao jedan od mogućih rizika stresa u pčelinjim zajednicama koji mogu potencirati efekte virusnih infekcija i obrnuto.

5. Značajan aspekt ispitivanja prisustva virusa odnosi se i na istovremeno kontrolisanje stepena infestacije *Varroa* (Martin et al., 1995; Korpela et al., 1993;

Fuchs et al., 1990), što smo za potrebe opservacija o značaju *Varroe* i u BiH, dokazali i u ovom radu na primjeru samo jednog pčelinjaka. Dobijeni rezultati daju vrlo slikovit prikaz realnog dinamičkog statusa parazita u košnici. Dinamika dnevnog pada *Varroe*, praćena u periodu sa leglom i bez legla u zajednici, izbor ljekovitog sredstva i njegova efikasnost na nekoliko zajednica jasno pokazuju kako je nemoguće virusne infekcije pčela posmatrati bez osvrta na prisustvio vektora *V. destructor*. Pitanje o zdravlju ili vitalnosti zajednice danas više nije teoretsko nego jasno u određenju preživljavanja pčelinjih zajednica. Visoka infestacija *Varroom* jednako je (=) bolesna zajednica koja bez pomoći pčelara ne može opstati (Rosenkranz et al., 2010). Na primjeru naših rezultata, a radilo se o pčelinjaku sa dobrom pčelarskom praksom i činjenicom da je evidencija pada *Varroe* kontrolisana po međunarodno prihvaćenom preporukama, značaj odnosa krpeljsko-parazitarnog sindroma je jasan.

U aktivnom načinu borbe protiv *Varroe* različitim preparatima, ranijih godina na ispitnom pčelinjaku, uočava se značajno visoka infestacija grinjama, što, kada se ima u vidu značaj vektorskog širenja virusa, te mulifaktorijalnosti efekata u ovom virus–grinja–pčela odnosu čini više kompleksnim. Postavlja se pitanje koliki to infestacijski pritisak *Varroom* zajednica može podnijeti, a da pri tome ne dođe da njenog uginuća. Zvanično postavljen limit od 5 *Varroa* na 100 pčela, 5% infestacije, (Generch et al., 2010) treba uzeti kao eksperimentalno dokazanu vrijednost za određene geografsko-klimatske regione. Za iste kriterijume, nažalost, u Bosni i Hercegovini nisu rađena ispitivanja stepena infestacije računatog na broj pčela. Naša ispitivanja broja *Varroa* odnosila su se na kontrolu prirodnog i terapijski uzazvanog pada *Varroe*, pri čemu nije vršena ocjena jačine i brojnosti pčelinjih zajednica. Praćen je i pad *Varroe* nakon primjene dva najčešće primjenjivana antivarroa tretmana: amitraza i mravlje kiseline. Predstavljeni rezultati imaju čisto deskriptivan epizootiološki značaj bez potrebe iskazivanja statistički komplikovanim formulama. Svakako da dalja ispitivanja stepena infestacije *Varroom* treba uraditi kao bi i analiza rizika u ulozi *Varroe* u budžetu nestanka i gubitaka pčelinjih zajednica bila potpunija. *Varroa destructor* narušava homeostazu pčelinje zajednice, a u prisustvu virusnih infekcija štete od ovog parazitizma su još drastičnije. Ovo je opisano u slučajevima kada je došlo do potpunog uginuća *Varroom* infestiranih zajednica kod kojih je istovremeno utvrđeno prisustvo jedne ili više vrsta virusa, te se ovakvo uginuće naziva posebnim imenom „bee parasitic mite syndrome“. U prilog tome, iako do sada najmanje proučavani, virusi će, posljedično, mnogobrojnim naučnim istraživanjima, dati odgovor na veliki broj nerazjašnjenih uginuća za koja se pravi uzrok nije mogao pronaći ili za čije uzroke su se optuživali neki drugi patogeni koji su samo koincidirali

mjestu i vremenu fatalne infekcije. Većina od osamnaest poznatih virusa pčela mogu egzistirati unutar pčelinje zajednice, a da pri tome ne izazivaju nikakve simptome infekcije, ne utičući na zdravstveni status zajednice (Gauthier et al., 2007; Tentcheva et al., 2004).

Nejasan status odnosa između virusnih infekcija i stepena izraženosti „specifičnih simptoma“ vezanih za virusne infekcije nije ostavio mjesta za tvrdnje o realnom patološkom učinku izolovanih virusa. Multiple virusne infekcije usložavaju razumijevanje učešća virusa koji se po današnjem prihvatanju patološkog učinka smatraju emergentnim, što je dokazano za DWV i APBV infekcije.

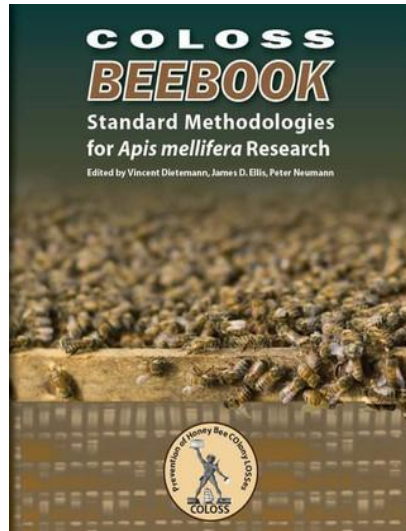
Kvalitet uzorka tokom postupka sakupljanja i njegovog procesuiranja način „konzervacije“ virusa u toku dostave, veličina uzorka i način ekstrakcije virusnih infekcija za PCR dijagnostiku ostaje da se standardizuje, ali opet trenutno samo za nivo istraživanja virusnih infekcija, ali ne i za moguće preporuke uvođenja metode po OIE standardima.

Buduća ispitivanja u dokazu virusnih bolesti u pogledu epidemioloških ispitivanja trebalo bi dopuniti, pored kvantitativnog, i kvalitativnim ispitivanjem u real time PCR proceduri dokaza molekularnih patogena. Bilo bi idealno kada bi se kreirao dobar protokol za multipleks PCR, što bi pojednostavilo i pojeftinilo ovu neophodnu dijagnostiku, što u vrijeme izrade ove teze u dijelu laboratorijskih dokaza nije bilo moguće.

Takođe, potrebno bi bilo izvršiti evaluaciju upotrebljivosti uzorka s obzirom na vrijeme, način, količinu i njegovo čuvanje jer je utvrđeno da se zbog neadekvatnog procesuiranja uzorka dešavaju degradacije nukleinskih kiselina virusa te nastali nukleinski isječci nemaju potreban integritet kojim se može detektovati tražena veličina sekvence. To se naročito odnosi i na dio rezultata ove teze koji su dobijeni u postupku ekstrakcija nukleinskih kiselina metodom trizol ekstrakcije. Mnogo bolji izbor s obzirom na kvalitet (i znatno skuplji) jeste ekstrakcija gotovim komercijalnim kitovima sa silicijumskim membranama u kojim postoji dodat specifičan nosač za RNK materijal, tako da je ukupna količina ekstrahovane RNK u tom slučaju veća, a kvalitet nukleinskih kiselina bolje očuvan.

Na putu laboratorijskih standardizacija je i rad međunarodne pčelarske naučne javnosti koja je kao glavni „proizvod“ projekta o prevencijama gubitaka pčelinjih zajednica, COLOSS, FA0803, COST akcije Evropske unije, izradila vodič, Priručnik za standardizaciju istraživanja u pčelarstvu sa naslovom „COLOSS BEEBOOK –

standard methods in *Apis mellifera* research”, u čijem se jednom dijelu obrađuju i virusne infekcije, kao i njihova dijagnostika.



Slika 28. Naslovna strana Priručnika

Priručnik će biti publikovan on-line, sa otvorenim pristupom i u specijalnom izdanju časopisa *Journal of Apicultural Research*, u decembru 2012, a biće, u aprilu 2013, štampan i kao knjiga (Williams et al., 2012).

Koliko će ove procedure dijagnostike virusnih infekcija pčela uticati na proširivanje OIE dijagnostičkih metoda bolesti pčela – ostaje da se vidi. Što se tiče promjena nacionalne legislative koja reguliše ovu oblast u Pravilniku zdravstvene zaštite pčela, sigurno je da promjene neće ići tako brzo.

Mogući pristupi u kontroli virusnih infekcija bili bi utvrđivanje prevalence, kategorizacija simptomatologije virusnih infekcija, poboljšanje dobre pčelarske prakse na pčelinjaku, selekcija pčela na otpornost virusnim infekcijama, proizvodnja SPF virusnih zapata matica, efikasna kontrola infestacija sa *Varroa destructor* i primjena endonukleaznih preventivnih i terapijskih tretmana.

U organizovanju i kontroli zdravstvenog statusa selekcijsko-reproduktivnih centara bilo bi poželjno uspostaviti sistem i kvalitativne i kvantitativne dijagnostike patogena, kako onih klasičnih tako i novih, virusnih. Potrebno bi bilo revidirati standardne procedure i protokole koji su do sada služili kao vodič u procjenjivanju uzroka zdravlja ili bolesti pčelinjih zajednica. Uvođenje redovne kontrole pčelinjaka na prisustvo virusnih infekcija omogućilo bi i opravdalo potpunije postupanje dijagnostičkih laboratorija u dodjeljivanju definitivnih dijagnoza kako zdravstvenog tako i patogenog stanja pčelinje zajednice. Dosadašnji selekcijski kriterijumi nisu

definisali status virusnih infekcija kod matica jer se pogrešno smatralo da su virusi pčela bezopasni, a da glavni gubici nastaju kao posljedica velike infestacije sa *Varroa destructor*. U današnje vrijeme, nakon niza dokaza *Varroa*–virus vektorskog odnosa smatra se da značanju ulogu u izazivanju uginuća pčelinjih zajednica imaju virusi, toliko da se danas za potrebe kupovine zdravih matica i rojeva pokreću programi i projekti za tzv. proizvodnju SPF matica metodama embriotransfera u proizvodnji matica.

Moguće prevencije u suzbijanju virusnih infekcija pčela idu u dva pravca: smanjivanje rizika od prenosa virusa i smanjenje virusnih titrova unutar pčelinjih zajednica. Bez ikakve sumnje, savremeno pčelarstvo sa pokretnim ramovima, globalno kretanje i trgovina pčelama i pčelinjim proizvodima značajni su faktori za nastanak i širenje virusnih bolesti pčela. Mnoge pčelarske prakse mogu smanjiti rizik od nastanka i širenja virusnih bolesti. Najefikasniji put za to je odvajanje inficiranih od neinficiranih materijala. Proizvodnja i prodaja paketnih rojeva, matica, sperme, košnica i cijelih pčelinjaka, kao i njihovih proizvoda namijenjenih za hranjenje (polen i matična mliječ) najčešći su načini širenja asimptomatskih formi bolesti. Jedna od preporuka jeste da bi se na jednoj lokaciji trebalo nalaziti od 5 do 20 zajednica, a ne više od toga. Unos novih zajednica na lokaciju pčelinjaka trebalo bi da bude podvrgnut uslovima prirodnog karantina i najmanje jednog kilometra distance u odnosu na susjedni pčelinjak. Ovo je veoma značajno za slučaj kontrole virusnih infekcija u toku masovnih migracija pčelinjaka u potrazi za dostupnom hranom. Smještaj i gustina pčelinjaka je najznačajniji element u kontroli bolesti pčelinje zajednice. Pribor koji se koristi na pčelinjaku, kao i oprema za ekstrakciju meda rizik su širenju bolesti, pogotovo što se najčešće razmjenjuju između različitih vlasnika. Bolje nacionalne i regionalne zakonske regulative kojim se definišu rase pčela koje se uzgajaju pomogle bi efikasnijoj kontroli i virusnih infekcija.

Virusi su ultimativno-opportunistički patogeni koji za svoj razvoj trebaju koefekte različitih spoljnih stresora kako bi se na nivou pčelinjaka pojavili epidemijski. To znači da je prva mjera za smanjenje virusnog pritiska unutar pčelinje zajednice potreba da se one čuvaju zdrave, jake i da se maksimalno umanje svi stres-faktori.

Tragovi virusnog prisustva detektuju se u vosku, drvetu košnica, medu, pergi, koji mogu sadržavati velike količine virusa te se napominje da je na inficiranom pčelinjaku mnogo bolje vršiti kompletnu zamjenu nastavaka da bi se maksimalno izbjeglo inficiranje čistih ramova sa starim, potencijalno inficiranim ramovima.

Možda će se u budućnosti antivirusne terapije na nivou interferentih RNA-tehnologija (Maori et al., 2009) pokazati kao efikasan način borbe protiv virusnih infekcija, ali i dalje neće biti bez značaja potreba za razvijanjem genetski rezistentnih pčela na *V. destructor* i na različite virusne infekcije.

Kako je još davno rečeno, da bismo se sa nekom bolešću borili na najefikasniji način, uzročnik i načini na koje on izaziva infekciju moraju biti identifikovani, a putevi širenja, isto kao i uslovi sredine koji mu omogućavaju da se ispolji u formi epidemije, jasno prepoznati (White, 1906). Očigledno je da se ispitivanje prirodne evolucije virusa pčela nastavlja. Proučavanje dinamike, kinetike, patognomonike virusnih infekcija jedan je od neophodnih koraka koji će se morati napraviti na putu ka razaznavanju i upoznavanju infekcija virusima pčela. Molekularne metode u dijagnostici virusnih bolesti pčela danas ne spadaju u procedure „state of art“. Radi se o procedurama koje će u budućnosti biti značajno pojednostavljene (multiplex PCR), aplikativne, dostupne, ekonomski opravdane i suštinski neophodne.

Oblast tzv. molekularne patologije samo je dio informacija koje treba uvesti u postavku Kohovih postulata i kada su virusne infekcije u pitanju. Komplikovanost, nesenzitivnost i nedovoljna specifičnost u serološkoj dijagnostici virusnih infekcija vjerovatno neće ići u prilog ovoj vrsti dijagnostike u budućnosti. Poboljšanje se može očekivati u uvođenju serološke dijagnostike virusa primjenom monoklonski pripremljenih imunohromatografskih brzih testova, tzv. *Lateral Flow Immunochromatographic Assays*.

Nepostojanje efikasnih virusnih tkivnih kultura u klasičnoj virusološkoj dijagnostici u budućnosti će možda biti prevaziđeno, ali zbog prekomplikovanosti metoda i zahtjeva, takve laboratorije ovu dijagnostiku neće učiniti metodom izbora.

Praktično kliničko prosuđivanje značaja virusnih infekcija danas su samo dio ukupne patologije pčela i teško je izbjeći mogućnost koincidentnog sinergističkog djelovanja više patogena. Vitalnost pčelinjih zajednica, genetski resursi, apitehnologija, gustina pčelinjih zajednica, prisustvo različitih fizičkih i hemijskih noksi treba uklopiti u teško prepoznatu sliku mozaične strukture nečega što se zove homeostaza pčelinje zajednice.

Veterinarsko zakonodavstvo i veterinarske inspeksijske procedure moraće se modifikovati na način da će ubuduće više biti uključeni u sprovođenje efikasnih mjera kontrole bolesti i nametnika pčela, od kojih je i nadalje najznačajnija borba u kontroli *Varroa destructor*.

I još jednom ostaje u diskusiji Hajzenbergovo viđenje naučnih istraživanja koje kaže: „da priroda nije ono što ona u stvari jeste, nego je to stanje prirode tumačeno dostupnim metodama ispitivanja“.

ZAKLJUČCI

1. Na teritoriji Bosne i Hercegovine utvrđeno je po prvi put kvalitativno prisustvo pet različitih virusa koji inficiraju zajednice *Apis mellifera*.
2. Metodama molekularne dijagnostike dokazano je prisustvo dijela genoma slijedećih virusa: ABPV, BQCV, DWV, CBPV, SBV u formama pojedinačnih ili multiplih virusnih infekcija.
3. Dobijena je sekvenca virusa BQCV (virus crnog matičnjaka).
4. 87,80% ispitanih uzoraka bilo je pozitivno na prisustvo virusa. Dokazana prevalenca pojedinih virusa u odnosu na broj uzoraka kretala se u vrijednostima: ABPV 39,02%; DWV 70,73%; BQCV 56,09%, SBV 10%; CBPV; 15,85%.
5. U Bosni i Hercegovini u ispitanim uzorcima nije utvrđeno prisustvo izraelskog soja virusa akutne paralize pčela (IAPV), kao ni virusa Kašmirske bolesti pčela (KV).
6. Infekcije su se detektovale u različitim kombinacijama multiplih koinfekcija bez posebnih karakteristika vezanih za geografsku distribuciju ili sezonsko koreliranje.
7. Prisustvo parazitske grinje *Varroa destructor* u formama različitih nivoa infestacija na medonosnoj pčeli doprinosi činjenici da se virusne infekcije, a pogotovo one sa DWV mogu smatrati emergentnim patogenom.
8. Standardizacija metoda molekularne dijagnostike kvalitativnih i kvantitativnih dokaza još nije moguća. Postoje mnogobrojni protokoli različitih ekstrakcija i amplifikacijskih protokola, ali su oni još uvijek dio istraživačkih procedura koje nisu uvrštene niti u jedan dijagnostički protokol OIE Manuala.
9. Za pravilno donošenje suda o uzroku ugibanja pčelinjih zajednica, pored postojećih zahtjeva kontrole patogena pčela definisanih procedurama dijagnostičkog Manuala i Koda OIE-a, bilo bi potrebno imati i rezultate kojim bi se dokazalo kvalitativno i kvantitativno prisustvo virusa kod vrste *Apis mellifera*.

10. Dobijeni rezultati opravdavaju potrebu edukacije veterinarskog servisa o značaju infekcija virusa na ukupan sistem nadzora i zaštite zdravstvenog statusa vrste *Apis mellifera*.

LITERATURA

1. Allen, M., Ball, B.V. (1996) *The incidence and world distribution of honey bee viruses*. Bee World 77, 141–162.
2. Anderson, D. L. (1988) *Pathologist report*. N Z Beekeep 199: 12–15.
3. Apimondia 41st Congress; Scientific programme oral presentation abstracts and poster list; France, Montpellier, 15–20 September 2009.
4. Apimondia XXXVII International Apicultural Congress, Ljubljana, Slovenia, 24–29 August, 2003, Final Program and Book of Abstracts.
5. Bailey, L. and A. J. Gibbs (1964) *Acute infection of bees with paralysis virus*. J. Insect Pathol. 6: 395th 07. vol.72, 2006.
6. Bailey, L. (1975) *Recent research on honey bee viruses*. Bee World 56: 55–64.
7. Bailey, L., Ball, B.V. (1991) *Honey bee pathology*. Academic Press, New York.
8. Bailey, L., Ball, B.V., Perry, J.N. (1981) *The prevalence of viruses of honey bees in Britain*. Ann Appl Biol 97: 109–118.
9. Bailey, L., Gibbs, A.J., Woods, R.D. (1963) *Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus)*. Virol 21: 390–395.
10. Bailey, L. (1976) *Viruses attacking the honey bee*. Adv. Virus Res. 20, 271–304.
11. Bailey, L., Ball, B.V. (1991) *Honey Bee Pathology*, second ed. Academic Press, London.
12. Bailey, L. (1967) *The incidence of virus diseases in the honey bee*. Appl Biol 60: 43–8.
13. Bakonyi, T., Farkas, R., Szendroi, A., Dobos-Kovacs, M., Rusvai, M. (2002) *Detection of acute bee paralysis virus by RT-PCR in honey bee and Varroa destructor field samples: rapid screening of representative Hungarian apiaries*. Apidologie 33, 63–74.
14. Ball, B. V. (1983) *The association of Varroa jacobsoni with virus diseases of honey bees*. Exp Appl Acarol 19: 607–613.
15. Ball, B.V. (1985) *Acute paralysis virus isolates from honeybee, Apis mellifera, colonies infested with Varroa jacobsoni*. J Apicult Res 24: 115–119.

16. Ball, B.V. (1989) *Varroa jacobsoni* as a virus vector. In: Cavalloro R (ed) Present status of varroaosis in Europe and progress in the varroa mite control. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
17. Ball, B.V. (1993) *The damaging effects of Varroa jacobsoni*. In: Matheson A (Ed) Living with Varroa. International Bee Research.
18. Ball, B.V., Allen, M.E. (1988) *The prevalence of pathogens in honey bee (Apis mellifera) colonies infested with the parasitic mite Varroa jacobsoni*. Annals Appl Biol 113: 237–244.
19. Bekesi, L., Ball, B.V., Dobos-Kovacs, M., Bakonyi, T., Rusvai, M. (1999) *Occurrence of acute paralysis virus of the honey bee (Apis mellifera) in a Hungarian apiary infested with the parasitic mite Varroa jacobsoni*. Acta Vet Hung 47: 319–324.
20. Benjeddou, M., Leat, N., Allsopp, M., Davison, S. (2001) *Detection of acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase PCR*. Appl. Environ. Microbiol. 67, 2384–2387.
21. Berenyi, O., Bakonyi, T., Derakhshifar, I., Köglberger, H., Nowotny, N. (2006) *Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries*. Appl Environ Microbiol 72: 2414–2420.
22. Berthoud, H., Imdorf, A., Haueter, M., Radloff, S., Neumann, P. (2010) *Virus infections and winter losses of honey bee colonies (Apis mellifera)*. J Apic Res 49: 60–65.
23. Berthoud, D.H. Imdorf, A., Haueter, M., Radloff, S., Neumann, P. (2010) *Virus infections and winter losses of honey bee colonies (Apis mellifera)*. Journal of Apicultural Research 49: 60–65.
24. Bowen-Walker, P. L., S. J. Martin, and A. Gunn (1999) *The transmission of deformed wing virus between honey bees (Apis mellifera L.) by the ectoparasitic mite Varroa jacobsoni* Oud. J. Invertebr. Pathol. 73: 101–106.
25. Broomer, J. J., Henderson, C. B., Wick, C. B., Standford, M. F., Zulich, A. W., Jabbour, R. E., Dechpande, S. V., Mccubbin, P. E., Seccomb, R. A., Welch, P. M., Williamson, T., Firth, D. R., Skowronski, E., Lehmann, M. M., Bilimoria, T. L., Gress, J., Wanner, K. W., Cramer, R. A. (2010) *Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline*. PLoS-ONE 5: e 13181 DOI : 10.1371/journal.pone.0013181

26. Carreck, N. L., Ball, B. V., Martin, C. (2010) *Honey beecolony collapse and changes in viral prevalence associated with Varroa destructor*. Journal of Apicultural Research 49: 93–94. DOI:10.3896/IBRA .1.49.1.13
27. Carreck, N.L. (2009) Can studies of Kashmir bee virus and *Varroa destructor* aid our understanding of “Colony Collapse Disorder”? In *Proceedings of XXXXIst International Apicultural Congress, Montpellier, France, 15th–20th September 2009*, 146.
28. Chantawannakul, P., Ward, L., Boonham, N., Brown, M. (2006) *A scientific note on the detection of honey bee viruses using real-time PCR (TaqMan) in varroa mites collected from a Thai honey bee (Apis mellifera) apiary*. Journal of Invertebrate Pathology 91: 69–73 DOI:10.1016/j.jip.2005.11.001
29. Chen, Y.P., Evans, J.D. (2007) *Historical presence of Israeli acute paralysis virus in the United States*. Am. Bee 147:1027-1028.
30. Chen Y.P., Siede, R. (2007) *Honey bee viruses*. Adv Virus Res 70: 33–80.
31. Chen, Y. P., Higgins, J. P., Feldlaufer, M. F. (2005) *Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honey bee (Apis mellifera L.)* Applied and Environmental Microbiology 71: 436–441. DOI :10.1128/AEM.71.1.436-441.2005.
32. Chen, Y. P., Siede, R. (2007) *Honey bee viruses*. Advances in virus Research 70: 33–80. DOI: 10.1016/S 0065- 3527(07) 7002-7.
33. Chen, Y. P., Pettis, J. S., Collins, A., Feldlaufer, M. F. (2006) *Prevalence and transmission of honey bee viruses*. Applied and environmental Microbiology 72: 606–611. DOI: 10.1128/AEM.21.1.606-611.2006
34. Chen, Y. P., Pettis, J. S., Evans, J. D., Kramer, M., Feldlaufer, M. F. (2004) *Transmission of Kashmir bee virus in honey bee colonies by ectoparasitic mite, Varroa destructor*. Apidologie 35: 441–448 DOI: 10.1051/apido:2004031
35. Chen, Y. P., B. Smith, A. M. Collins, J. S. Pettis, and M. F. Feldlaufer (2004) *Detection of deformed wing virus infection in honey bees, Apis mellifera L., in the United States*. Am. Bee J. 144: 557–559.
36. Chen, Y. P., J. A. Higgins, and M. F. Feldlaufer (2005) *Quantitative analysis by real-time reverse transcription-PCR of deformed wing virus infection in the honeybee (Apis mellifera L.)*. Appl. Environ. Microbiol. 71: 436–441.
37. Chen, Y. P., J. S. Pettis, J. D. Evans, M. Kramer, and M. F. Feldlaufer (2004) *Molecular evidence for transmission of Kashmir bee virus in honey bee colonies by ectoparasitic mite, Varroa destructor*. Apidologie 35: 441–448.

38. Chen, Y. P., V. Zhao, J. Hammond, H.-T. Hsu, J. D. Evans, and M. F. Feldlaufer (2004) *Mutiple virus infections in the honey bee and genuine divergence of honey bee viruses*. J. Invertebr. Pathol. 87: 84–93.
39. Chen, Y. P., Higgins, J. A., Feldlaufer, M. F. (2005) Quantitative analysis of deformed wing viurs infection in the honey beee, *Apis mellifera* L. by real-time RT-PCR. Appl. Environ. microbiol. 71, 436–441.
40. Clark, T. B. (1978) *A filamentous virus of the honey bee*. Juornal of Invertebrate Pathology 32: 332–340. DOI: 10.1016/0022-2011(78)90197-0
41. C. M. Fauquetand, D. Fargette: *International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species* Virol J. 2005; 2: 64, Published online 2005 August 16. doi: 10.1186/1743-422X-2-64
42. Cox-Foster, D., VanEngelsdorp, D. (2009) *Saving the honeybee*. Sci Am 300: 40–47.
43. Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.-L., Briese, S., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., vanEngelsdorp, D., Kalkseitn, A.L., Drysdale, L., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S., Lipkin, W.I. (2007) *A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder*. Science 318: 283–287.
44. De Jong, D., De Jong, P.H., Gonçaves, L.S. (1982) *Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with V. jacobsoni*. J Apicult Res 21: 165–216.
45. De Miranda, J., Cordoni, G., Budge, G. (2010) *The acute bee paralysis virus – Kashmir bee virus – Israeli acute paralysis virus complex*. J Invertebr Pathol 103: S30–S47.
46. De Miranda, J.R., Fries, I. (2008) *Venereal and vertical transmission of deformed wing virus in honeybees (Apis mellifera L.)*. J Invertebr Pathol 98: 184–189.
47. De Miranda, J.R., Genersch, E. (2010) *Deformed wing virus*. J Invertebr Pathol 103: S48–S61.
48. De Miranda, J. R. (2008) *Diagnostic techniques for virus detecion in honey bees*. Virology and the Honey Bee. European Commission Publications; Brussel, pp 121–232.
49. Dohm, D. J., M. R. Sardelis, and M. J. Turell (2002) *Experimental vertical transmission of West Nile virus by Culacipiens (Diptera: Culicidae)*. J. Med. Entomol. 39: 640–644.

50. Dr. S. Devanesan (2006), *Thai sacbrood virus disease of honeybees*, Kerala Agricultural University, India.
51. Elke Genersch, *Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping*, Appl Microbiol Biotechnol (2010) 87: 87–97.
52. Evans, J. D. (2001) *Genetic evidence for coinfection of honey bees by acute bee paralysis and Kashmir bee viruses*. J. Invert. Pathol. 78, 189–193.
53. Fievet, J., Tentcheva, D., Gauthier, L., De Miranda, Jr., Cousserans, F., Colin, M., Bergoin, M. (2006) *Localization of deformed wing virus infection in queen and drone Apis mellifera L.* Virology Journal 3:e16. DOI : 10.1186/1743-422X-3-16
54. Fries, I., Camazine, S, (2001) *Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology*. Apidologie 32: 199–214.
55. Fries, I. and S. Camazine (2001) *Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology*. Apidologie 32: 1–16.
56. Fries, I., Camazine, S., Sneyd, J. (1994) *Population dynamics of Varroa jacobsoni: a model and a review*. Bee Wld. 75, 5–28.
57. Fuchs, S. (1990) *Preference for drone brood cells by Varroa jacobsoni Oud in colonies of Apis mellifera carnica*. Apidologie 21, 193–199.
58. Fusa, J. R. and A. R. Richter (1992) *Virulence and multigenerational passage of a nuclear polyhedrosis virus selected for an increased rate of vertical transmission*. Biol. Control 2: 171–175.
59. G. Palacios, J., Hui P. L., Quan, A., Kalkstein, K., S. Honkavuori, A. V. Bussetti, *Genetic analysis of Israel acute paralysis virus: distinct clusters are circulating in the United States*. J Virol 82: 6209–6217, vi.asm.org/content/82/13/6209
60. Gauthier, L., Ravallec, M., Tournaire, M., Cousserans, F., Bergoin M., et al. (2011) *Viruses Associated with Ovarian Degeneration in Apis mellifera L. Queens*. PLoS ONE 6(1): e16217. doi:10.1371/journal.pone.0016217
61. Gauthier, L., Tentcheva, D., Tournaire, M., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M.E., Bergoin, M. (2007) *Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique*. Apidologie 38: 426–435.
62. Gauthier, L., Ravallec, M., Tournaire, M., Cousserans, F., Bergoin, M., Dainat, B., De Miranda, J. R. (2011) *Viruses associated with ovarian degeneration in Apis mellifera L. queens*. PLoS ONE 6:e16217. DOI : 10.1371/journal.pone.0016217
63. Gauthier, L., Tentcheva, D., Tournaire, M., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M., Bergoin, M. (2007) *Viral load estimation in asymptomatic honey bee*

- colonies using the quantitative RT-PCR technique.* Apidologie 38: 426-436.
 DOI:10.1051/APIDO:2007026
64. Genersch, E. (2010) *American Foulbrood in honeybees and its causative agent, Paenibacillus larvae.* J Invertebr Pathol 103: S10–S19.
65. Genersch Elke, Werner von der Ohe, Hannes Kaatz, Annette Schroeder, Christoph Otten, Ralph Bächler, Stefan Berg, Wolfgang Ritter, Werner Mühlen, Sebastian Gisder, Marina Meixner, Gerhard Liebig and Peter Rosenkranz, *The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies,* Apidologie Volume 41, Number 3, May–June 2010 Honey bee health.
66. Genersch, E. (2005) *Development of a rapid and sensitive RT-PCR method for the detection of deformed wing virus, a pathogen of the honeybee (Apis mellifera).* Vet. J. 169, 121–123.
67. Gisder, S., Aumeier, P., Genersch, E. (2009) *Deformed wing virus (DWV): viral load and replication in mites (Varroa destructor).* J Gen Virol 90: 463–467.
68. Grabenstiner, E., Ritter, W., Carter, M. J., Davison, S., Pechhacker, H., Kolodziejek, J., Boeching, O., Derakhshifar, I., Moosbechofer, R., Licek, E., Nowotny, N. (2001) *Sacbrood virus of the honeybee (Apis mellifera): rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription-PCR.* Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8, 93–104.
69. Grazyna Topolska, *Genetic analysis and phylogenetic comparison of Black queen cell virus genotypes,* Original Research Article Veterinary Microbiology, Volume 139, Issues 3–4, 18 November 2009, Pages 227–234.
70. Grazyna Topolska, *Virus infection of queen bees in ten queen rearing apiaries in Poland,* 2008, Warszawa, Publications of WARSAW University of Life Sciences, SGGW.
71. Gregorc Ales, *COLLOS workshop new molecular tools – Bern, Switzerland,* 12–21 May, 2009 <http://www.coloss.org/documents/COLOSS-Proceedings-Work-Shop-New-Molecular-Tools-Bern-2009.pdf>
72. Hélène Berthoud, Anton Imdorf, Monika Haueter, Sarah Radloff, Peter Neumann, *Virus infections and winter losses of honey bee colonies (Apis mellifera),* Journal of Apicultural Research, Vol 49 (1) pp. 60–65, January 2010.
73. Higfield, A. C., El Nagar, A., Mackinder, L. C. M., Noel, L. M. L. J., Hall, M. J., Martin, S. J., Schroeder, D. C. (2009) *Defromed wing virus implicated in overwintering honey bee colony losses.* Applied and Environmental Microbiology 75:7212-7220.DOI 10.1128/AEM.02227-09

74. *Honey Bee Pests, Predators & Diseases*, Third Edition, Edited by Roger A. Morse and Kim Flottum, Third edition, ROOT.
75. Hung, A. C., Shimanuki, H., Knox, D. A. (1996a) *Inapparent infection of acute paralysis virus and Kashmir bee virus in the U.S. honey bees*. *Am Bee J* 136: 874–876.
76. Hung, A. C., Shimanuki, H., Knox, D. V. (1996b) *The role of viruses in bee parasitic mite syndrome*. *Am Bee J* 136: 731–732.
77. Hung, A.C.F., Adams, J.R., Shimanuki, H. (1995) *Bee parasitic mite syndrome: II. The role of Varroa mite and viruses*. *Am Bee J* 135: 702.
78. Hung, A.C.F., Ball, B. V., Adams, J.R., Shimanuki, H., Knox, D.A. (1996c) *A scientific note on the detection of American strains of acute paralysis virus and Kashmir bee virus in dead bees in one US honey bee (Apis mellifera L.) colony*. *Apidologie* 27: 55–56.
79. Hung, A. C. F. (2000) *PCR detection of Kashmir bee virus in honey bee excreta*. *J. Apic. Res.* 39: 103–106.
80. Hung, A.C.F, Ball, B.V., Adams, J.R., Shimanuki, H., Knox, D.A. (1996) *A scientific note on the detection of American strain of acute paralysis virus and Kashmir bee virus in dead bees in one US honey bee (Apis mellifera L) colony*. *Apidologie* 27, 55–56.
81. Julie Fievet et al. *Localization of deformed wing virus infection in queen and drone Apis mellifera L* *Virology Journal* 2006, 3: 16
<http://www.virologyj.com/content/3/1/16>
82. Karan, S. Shah et al. (2009) *Localization of deformed wing virus (DWW) in the brains of the honeybee, Apis mellifera Linnaeus* *Virology Journal* 2009, 6: 182
<http://www.virologyj.com/content/6/1/182>
83. Koch, W., Ritter, W. (1991) *Experimental examinations concerning the problem of deformed emerging bees after infestation with Varroa jacobsoni*. *J Vet Med B* 38: 337–344.
84. Kulinčević, J., Ball B.V., Mladjan, V. (1990) *Viruses in honey bee colonies infested with Varroa jacobsoni: first finding in Yugoslavia*. *Acta veterinaria* 40: 37–42.
85. Le Gall, O., Christian, P., Fauquet, C. M., King, A. M. Q., Knowels, N. J., Nakashima, N., Stanway, G., Grobalenya, A. E. (2008) *Picornavirales a proposed order of positive-sense single- stranded RNA viruses with a pseudo-T =3 virion architecture*. *Archives of Virology* 153: 715–727. DOI:10.1007/s00705-008-0041-X

86. Le Gall, O., Christian, P., Fauquet, C. M., King, A. M. Q., Knowles, N. J., Nakashima, N., Stanway, G., Gorbalenya, A. E. (2008) *Picornavirales, a proposed order of positive-sense single stranded RNA viruses with a pseudo-T=3 virion architecture*. Archives of Virology 153: 715–727. DOI :10.1007/s00284-010-9633-2
87. Licek, E., Nowotny, N. (2001) *Sacbrood virus of the honeybee (Apis mellifera): rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription-PCR*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8, 93–104.
88. M. Ribiere, Violaine Olivier, Philippe Blanchard, *Chronic bee paralysis: A disease and a virus like no other?* www.science direct.com
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.013>.
89. Magali Ribière, Violaine Olivier, Philippe Blanchard, *Chronic bee paralysis: a disease and a virus like no other?* Journal of invertebrate pathology 2010; 103 Suppl 1: S120–31.
90. Maori, E., Lavi, S., Mozes-Koch, R., Gantman, Y., Edelbaum, O., Tanne, E., Sela, I. (2007) *Isolation and characterization of IAPV, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for intra and inter-species recombination*. J Gen Virol 88: 3428–3438.
91. Martin, S. J. (2001) *The role of varroa and viral pathogens in the collapse of honey bee colonies: a modelling approach*. Journal of Applied Ecology 38: 1082–1093. DOI:10.1046/J.1365-2664.2001.0062.X
92. Martin, S. J., Ball, B. V., Carreck, N. L. (2010) *Prevalence and persistence of deformed wing virus (dww) in untreated or acaricide-treated Varroa destructor infested honey bees (Apis mellifera) colonies*. Journal of Apicultural Research 49: 72–79. DOI :10.3896-IBRA.149.1.10
93. Martin, S. (1995) *Ontogenesis of the mite Varroa jacobsoni Oud. in drone brood of the honey bee Apis mellifera L. under natural conditions*. Exp. Appl. Acarol. 19, 199–210.
94. Martin, S.J., Ball, B.V., Carreck, N.L. (2010) *Prevalence and persistence of deformed wing virus (DWV) in untreated or acaricide treated Varroa destructor infested honey bee (Apis mellifera) colonies*. Journal of Apicultural Research 49, 72–79. doi: 10.3896/IBRA.1.49.1.10
95. Mims, C. A. (1981) *Vertical transmission of viruses*. Microbiol. Rev. 45: 267–286.

96. Moore, J., Jironkin, A., Chandeler, D., Burroughs, N., Evans, D. J., Raybov, E. V. (2011) *Recombinants between deformed wing virus and Varroa destructor virus-1 may prevail in Varroa destructor infested honey bee colonies*. Journal of General Virology 92: 156–161. DOI 10.1099/vir0.025965-0
97. Morse, R. A. and N. W. Calderone (2000) *The value of honey bee pollination in the United States*. Bee Cult. 128: 1–15.
98. N. Berthoud, A. Imdorf, M. Haueter and Jean-Daniel C. Swiss Bee Research Centre, Agroscope Liebefeld-Posieux, Schwarzenburgstrasse 161, 3003 Bern, Switzerland [DOC] Honey bee viruses - Congress Praguelib.congressprague.cz/eurbee2006/Honey%20bee%20viruses.doc
99. Navajas, M., Migeon, A., Alaux, C., Martin-Magniette, M.L., Robinson, G.E., Evans, J.D., Cros-Arteil, S., Crauser, D., Le Conte, Y. (2008). *Differential gene expression of the honey bee Apis mellifera associated with Varroa destructor infection*. BMC Genomics 9: 301.
100. Neumann, P., Carreck, N.L. (2010) *Honey bee colony losses*. J Apic Res 49: 1–6.
101. Nordström, S., Fries, I., Aarhus, A., Hansen, H., Korpela, S. (1999) *Virus infections in Nordic honey bee colonies with no, low or severe Varroa jacobsoni infestations*. Apidologie 30: 475–484.
102. Palacios, G., Hui, J., Quan, P.L., Kalkstein, A., Honkavuori, K.S., Bussetti, A.V., Conlan, S., Evans, J., Chen, Y. P., van Engelsdorp, D., Efrat, H., Pettis, J., Cox-Foster, D., Holmes, E.C., Briese, T., Lipkin, W.I. (2008) *Genetic Analysis of Israel Acute Paralysis Virus: Distinct Clusters Are Circulating in the United States* Journal of Virology; jvi.asm.org/content/82/13/6209.short
103. Siede, R., König, M., Büchler, R., Thiel, H.J. (2006) *A real time based survey on acute bee paralysis virus in german bee colonies*. Edited by V. Veselý and D. Titera. *Proceeding of the second european conference of apidology*, EurBee, Prague, Czech Republic. pp. 19–20.
104. Ribiere, M., C. Triboulot, L. Mathieu, C. Aurieres, J. P. Faucon, and M. Pepin (2002) *Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection*. Apidologie 33: 339–351.
105. Ribiere, M., Ball, B. V., Aubert, M. F. A. (2008) *Natural history and geographic distribution of honey bee viruses*. In *Virology and the Honey Bee*. European Commission Publications; Brussels. pp. 15–84.

106. Ritter, W., Leclercq, E., Koch, W. (1984) *Observation des populations d'abeilles et de Varroa dans les colonies à différents niveaux d'infestation*. Apidologie 15: 389–400.
107. Ritter, W. (1996) *Diagnostic und Bekämpfung von Bienenkrankheiten*, p. 104–114. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, Germany.
108. Rosenkranz, P. (2010) *The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies*. Apidologie. doi:10.1051/apido/2010014
109. Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B. (2010) *Biology and control of Varroa destructor*. J. Invertebr. Pathol. 103, S96–S119.
110. Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, P. (2010) *Biology and control Varroa destructor*. Journal of Insect Pathology 103: S96–S119. DOI:10.1016/j.jip.2009.07.016
111. Salonen, A., Ahola, T., Kaariainen, L. (2005) *Viral RNA replication in association with cellular membranes*. Current Topics in Microbiology and Immunology 285: 139–173. DOI :10.1007/3-540-26764-6-5
112. Santrac, V. *AFB and EFB early detection bee brood disease, monitoring survey 2010 in Republic of Srpska, BiH*, In Proceedings of 7th COLOSS Conference – Prevention of Honey bee COLony LOSSes, Belgrade, Serbia, 25th–28th August 2011, 16.
113. Santrac Violeta, Granato, Anna, Mutinelli, Franco (2010) *Detection of Nosema ceranae in Apis mellifera from Bosnia and Herzegovina*, Journal of Apicultural research and Bee World 49 (1): 100–101. DOI: 10.3896/IBRA.1.49.1.16
114. Shen et al. (2005) *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. Virol. 86: 2281–2289.
115. Shimanuki, H., Calderone, N.W., Knox, D.A. (1994) *Parasitic mite syndrome: the symptoms*. Am Bee J 134: 827–828.
116. Stephen Martin, Brenda Ball, Norman Carreck: *The role of Deformed wing virus in the Congress Ljubljana, Slovenia, August 24–29, 2003, Book Of Abstracts*.
117. Stoltz, D., Shen, X.-R., Boggis, C., Sisson, G. (1995) *Molecular diagnosis of Kashmir bee viruses infection*. J. Api. Res. 34, 153–160.
118. Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M. E., Bergoin, M. (2004) *Prevalence and seasonal variations of six bee viruses*

- in Apis mellifera L. and Varroa destructor mite populations in France. Appl Environ Microbiol* 70: 7185–7191.
119. Tentcheva, D., Gauthier, L., Jouve, S., Canabady-Rochelle, L., Dainat, B., Cousserants, F., Colin, M.E., Ball, V.B., Bergoin, M. (2004) *Polymerase chain reaction detection of deformed wing virus (DWV) in Apis mellifera and Varroa destructor. Apidologie* 35, 431–439.
120. Valles, S.M., Strong, C.A., Dang, P.M., Hunter, W.B., Pereira, R.M., Oi, D.H., Shapiro, A.M., Williams, D.F. (2004) *A picorna-like virus from the red imported fire ant, Solenopsis invicta: initial discovery, genome sequence, and characterization. Virology* 328, 151–157.
121. Van der Zee et al. (2012) *Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for winters of 2008-09 and 2009-10. Journal of Apicultural Research* 51(1): 100–114.
122. Van Engelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpy, D.R., Pettis, J.S. (2009) *Colony collapse disorder: a descriptive study. PLoS One* 4(8):e6481
123. Van Engelsdorp, D., Meixner, M.D. (2010) *A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. J Invertebr Pathol* 103: S80–S95.
124. Van Engelsdorp, D., Underwood, R., Caron, D., Hayes, J. (2007) *An estimate of managed colony losses in the winter of 2006–2007: a report commissioned by the apiary inspectors of America. Am Bee J* 147: 599–603.
125. Violeta Santrac, Zlatko Tomljanovic, Ivana Tlak Gajger, Radivoje Maksimovic: *Colony losses and Good veterinary practice in apiary*, In Proceedings of 8th COLOSS Conference – Prevention of Honey bee Colony Losses, Halle-Salle, Germany, 1–3 September, 2012.
126. Wieggers, F. P. (1988) *Transmission of honeybee viruses by Varroa jacobsoni Oud.* In: Cavalloro R (ed.) *European research on varroa control.* Balkema Publishers, Rotterdam, pp 99–104.
127. Williams, G. R., Dietemann, V., Ellis, J. D., Neumann, P. (2012) *An update on the COLOSS network and the “BEEBOOK: standard methodologies for Apis mellifera research”.* *Journal of Apicultural Research* 51(2): 151–153. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.51.2.01>

128. Yañez, O., Jaffé, R., Jarosch, A., Fries, I., Moritz, R.F.A., Paxton, R. and De Miranda, J. (2012) *Deformed wing virus and drone mating flights in the honey bee (Apis mellifera): implications for sexual transmission of a major honey bee virus*. *Apidologie* 43(1): 17–30.
129. Yang, X., Cox-Foster, D. (2007) *Effects of parasitization by Varroa destructor on survivorship and physiological traits of Apis mellifera in correlation with viral incidence and microbial challenge*. *Parasitology* 134: 405–412.
130. Yang, X., Cox-Foster, D.L. (2005) *Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 7470–7475.
131. Yue, C., Genersch, E. (2005) *RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (Apis mellifera) and mites (Varroa destructor)*. *J Gen Virol* 86: 3419–3424.
132. Yue, C., Schröder, M., Bienefeld, K., Genersch, E. (2006) *Detection of viral sequences in semen of honeybees (Apis mellifera): evidence for vertical transmission of viruses through drones*. *J Invertebr Pathol* 92: 93–96.
133. Yue, C., Schröder, M., Gisder, S., Genersch, E. (2007) *Vertical transmission routes for deformed wing virus of honeybees (Apis mellifera)*. *J Gen Virol* 88: 2329–2336.

*Slika sa stranice br. 2: akvarel, autor Anita M. Collins.