Artykuł przeglądowy *Review*

Budowa, klasyfikacja i metody identyfikacji wirusów pszczoły miodnej

SYLWIA KASPRZAK, GRAŻYNA TOPOLSKA

Katedra Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159c, 02-787 Warszawa

Kasprzak S., Topolska G.

Structure, classification and methods of identification of honey bee viruses

Summary

The beginning of bee virology dates back to 1963, when the chronic bee paralysis virus (CBPV) was discovered. To date about 15 viruses of honey bee Apis mellifera have been identified. Those viruses persist in bee populations usually as unapparent infections, but under some conditions, e.g. severe Varroa infestation, they can cause adult bee and brood mortality. Some of the viruses can occur on their own, others together with another pathogen. Almost all bee viruses contain positive stranded RNA, only filamentous virus has DNA. On the basis of recent studies some of these viruses were classified in the newly created family Dicistroviridae, which includes the single genus Cripavirus, and in the floating genus Iflavirus unassigned to any family. However, most bee viruses are not classified yet. Agar gell immunodiffusion test (AGID) is a very convenient method for the diagnosis of bee virus infections. This technique is easy to use but has low sensitivity and requires the production of specific antisera. In research into bee viruses other techniques are also employed, e.g. ELISA, western blotting, and RT-PCR.

Keywords: honey bee, Apis mellifera

Początki wirusologii pszczelej datuje się na połowę dwudziestego wieku, kiedy w 1963 r. wyizolowano z pszczoły miodnej *Apis mellifera*, pierwszy wirus, którym był wirus chronicznego paraliżu pszczół (CBPV). Obecnie znanych jest kilkanaście wirusów pszczoły miodnej *Apis mellifera* (tab. 1). Ostatnie dwa wirusy: wirus roztocza *Varroa destructor* (*VDV*-1) (22) i wirus Kakugo (KV) (13) wyizolowano w 2004 r., jednakże nie ma jeszcze zgodności co do tego, czy są to odrębne wirusy (6), czy warianty wirusa zdeformowanych skrzydeł (DWV).

Niektóre wirusy pszczele występują samodzielnie, inne w powiązaniu z inwazją innego patogenu. Wywołują one przeważnie zakażenia bezobjawowe. W piśmiennictwie czasem określa się je jako zakażenia latentne, jednakże brak jest dowodów na istnienie zjawiska latencji u wirusów pszczelich. Na pierwszej w historii patologii pszczół konferencji poświęconej wirusom pszczelim naukowcy przyjęli stanowisko, że chodzi tu raczej o zakażenia przetrwałe (9). W okolicznościach prowadzących do naruszenia mechanizmów odporności przeciwzakaźnej w rodzinie pszczelej (17), np. przy inwazji roztocza *Varroa destructor*, zaburzeniu w podziale pracy u pszczół robotnic, przepszczeleniu terenu może dojść do aktywacji zakażenia i pojawienia się objawów klinicznych.

Nazwy wirusów pszczelich pochodzą często od objawów, jakie zakażenie może wywoływać w warunkach naturalnych bądź w badaniach laboratoryjnych (wirus chronicznego paraliżu pszczół, wirus choroby czarnych mateczników), miejsca wykrycia wirusa po raz pierwszy (kaszmirski wirus pszczół) lub od cech związanych z wyglądem czy budową wirusa (wirus włókienkowy). Ogólnie przyjęte skróty pochodzą od nazw angielskich (tab. 1.).

Budowa wirusów pszczelich

Wszystkie wirusy pszczoły miodnej *Apis mellifera*, z wyjątkiem wirusa włókienkowego (FV), są wirusami bezosłonkowymi. Wielkość ich cząstek (tab. 1) waha się od 17 nm (cząsteczka towarzysząca wirusowi chronicznego paraliżu pszczół – CPVA, wirus mętnych skrzydeł – CWV) do 450 nm (wirus włókienkowy – FV) (2). Kształt wirionu bywa różny, od pałeczkowatego, jak w przypadku FV, poprzez anizometryczny (wirus chronicznego paraliżu pszczół – CBPV) do izometrycznego (sferycznego) – pozostałe wirusy (1). Tylko wirus włókienkowy zawiera kwas DNA (3). Pozostałe wirusy zawierają jednoniciowy RNA o dodatniej polarności (ssRNA+) (10).

Kilka spośród wirusów pszczelich ma znaną całkowitą sekwencję genomu. Są to: wirus ostrego paraliżu pszczół – ABPV (18), wirus choroby czarnych mateczników – BQCV (19), wirus zdeformowanych skrzydeł – DWV (15), kaszmirski wirus pszczół – KBV (20), wirus choroby woreczkowej czerwiu – SBV (16), wirus Kakugo – KV (13, 14), wirus *Varroa destructor*-1 – *VDV*-1 (22). W przypadku wirusa chronicznego paraliżu pszczół opublikowane są sekwencje dwóch fragmentów RNA (23), jednakże w doniesieniach konferencyjnych można już znaleźć informację o poznaniu 81% jego genomu (21). W banku genów znajduje się też sekwencja kodująca RNA polimerazę wirusa mętnych skrzydeł CWV (AF034543).

Tab. 1. Nazwy i cechy cząstek wirusów pszczelich

Nazwa wirusa	Nazwa angielska	Skrót	Rodzaj kwasu nukleinowego	Kształt cząstki	Wielkość cząstki (nm)	Długość genomu różnych izolatów (bp)
Wirus włókienkowy	filamentous virus	FV	DNA	pałeczkowaty	150 × 450	
Wirus chronicznego paraliżu pszczół	chronic bee paralisis virus	CBPV	RNA	anizometryczny	20 × 30-60	
Cząsteczka towarzysząca wirusowi chronicznego paraliżu	chronic paralysis virus associate	CPVA	RNA	izometryczny	17	
Wirus ostrego paraliżu pszczół	acute bee paralysis virus	ABPV	RNA	izometryczny	30	9459, 9463, 9491
Wirus choroby woreczkowej czerwiu	sacbrood virus	SBV	RNA	izometryczny	30	8874, 8832
Wirus choroby czarnych mateczników	black queen cell virus	BQCV	RNA	izometryczny	30	8550
Wirus zdeformowanych skrzydeł	deformed wing virus	DWV	RNA	izometryczny	30	10131, 10166
Kaszmirski wirus pszczół	Kashmir bee virus	KBV	RNA	izometryczny	30	414
Wirus powolnego paraliżu pszczół	slow bee paralysis virus	SPBV	RNA	izometryczny	30	
Wirus mętnych skrzydeł	cloudy wing virus	CWV	RNA	izometryczny	17	
Egipski wirus pszczół	Egipt bee virus	EBV	RNA	izometryczny	30	
Wirus Arkansas	Arkansas bee virus	ABV	RNA	izometryczny	30	
Wirus X pszczół	bee virus X	BVX	RNA	izometryczny	35	
Wirus Y pszczół	bee virus Y	BVY	RNA	izometryczny	35	
Wirus *Varroa destructor*-1	*Varroa destructor* virus-1	VDV-1	RNA	izometryczny	27	10112
Wirus Kakugo	Kakugo virus	KV	RNA	izometryczny	27	10152

Klasyfikacja

Do niedawna uważano, że większość wirusów pszczelich należy do tzw. picorna-like wirusów, ze względu na duże podobieństwo do pikornawirusów kręgowców. Obecnie część z nich, na podstawie budowy genomu, umieszczono w nowo utworzonej rodzinie *Dicistroviridae* i w przynależnym do niej rodzaju *Cripavirus* oraz w niezaklasyfikowanym do żadnej rodziny rodzaju *Iflavirus* (ICTVdb). Genom wirusów *Dicistroviridae* jest dicistronowy oraz nieco dłuższy od genomu *Picornaviridae* i składa się z 8,5 do 9,5 nt. Zawiera oddzielne ramki odczytu (ORF) dla białek strukturalnych i niestrukturalnych. Sekwencje kodujące białka strukturalne znajdują się na końcu 3' genomu, zaś białka niestrukturalne na końcu 5' (10) – czyli odwrotnie niż u wirusów z rodziny *Picornaviridae*. Modelowym wirusem rodzaju *Cripavirus* jest wirus paraliżu świerszcza (cricket paralysis virus – CrPV). Do rodzaju tego należy BQCV. Do *Dicistroviridae* należą prawdopodobnie także: ABPV i KBV. Genom wirusów z rodzaju *Iflavirus* ma wielkość 9-10 tys. nt. i zawiera pojedynczą ramkę odczytu. Kolejność kodowania białek strukturalnych i funkcjonalnych jest tu podobna jak u pikornawirusów. Modelowym gatunkiem jest wirus flaszeriozy jedwabników (infectious flacherie virus – IFV). Do rodzaju *Iflavirus* należy SBV i prawdopodobnie DWV oraz ostatnio odkryte KV, VDV-1. Większość wirusów pszczelich nie jest jeszcze sklasyfikowana.

Techniki używane w badaniach nad wirusami pszczelimi

Prace nad wirusami pszczelimi są skomplikowane, nie można bowiem zastosować pszczelich ciągłych linii komórkowych, gdyż nie udało się ich, jak dotychczas, uzyskać. Do diagnostyki wirusów pszczelich stosowane są: mikroskopia elektronowa, metody serologiczne (AGID, ELISA, western blotting), RT-PCR (również Real-Time PCR). W niektórych przypadkach przydatna może być próba biologiczna.

Mikroskopia elektronowa

Większość wirusów pszczelich ma wielkość około 30 nm oraz podobny – sferyczny kształt, dlatego przy pomocy mikroskopii elektronowej można potwierdzić obecność tych wirusów w materiale badanym, ale nie można dokonać rozpoznania rodzaju zakażenia. Wirus chronicznego paraliżu pszczół ma różnej wielkości cząstki, na podstawie obrazu mikroskopowego można z dużym prawdopodobieństwem potwierdzić obecność CBPV w pszczole. Jednakże w materiale słabo oczyszczonym jego cząstki jest trudno dostrzec, dlatego wynik negatywny badania nie świadczy o braku wirusa w próbce (1). Mikroskopia elektronowa stosowana jest jako bardzo czuła metoda do wykrywania zakażenia wirusem włókienkowym, którego wygląd różni się bardzo od wyglądu innych wirusów pszczelich (3).

Próba biologiczna

Próba polega na iniekcyjnym podawaniu podejrzanego, wstępnie oczyszczonego materiału poczwarkom pszczelim lub pszczołom wolnym od zakażeń wirusowych. Metoda po raz pierwszy została opisana przez Baileya i wsp. w 1963 r. (4) – uznaje się, że był to początek wirusologii pszczelej. W przypadku niektórych wirusów stosowane jest zakażanie doustne świeżo wygryzionych pszczół. Poczwarki lub pszczoły zakażane są 1 µl zawiesiny wirusa (w różnych rozcieńczeniach). W zależności od rodzaju wirusa, temperatury oraz wilgotności powietrza w cieplarce namnożenie wirusa, a co za tym idzie – objawy kliniczne, występują po różnej liczbie dni. Jest to

metoda bardzo czuła i wykrywa także nie mające praktycznego znaczenia, niewielkie zakażenia. Jest pracoi czasochłonna, a namnożony wirus często musi być zidentyfikowany za pomocą innych metod.

Techniki serologiczne

Ponieważ pszczoły nie wytwarzają przeciwciał, w technikach serologicznych stosowane są surowice diagnostyczne wyprodukowane na królikach lub szczurach. Nie są one dostępne komercyjnie i należy je przygotować we własnym zakresie. Aby otrzymać antygeny wirusowe niezbędne do immunizacji zwierząt wytwarzających przeciwciała, namnażanie wirusów pszczelich prowadzi się przeważnie poprzez iniekcyjne zakażanie setek poczwarek pszczelich. Namnożone wirusy oczyszcza się przez ekstrahowanie i wirowanie naprzemienne przy dużym i małym przyspieszeniu oraz wirowanie w gradiencie sacharozy i chlorku cezu (4). Cała procedura jest bardzo pracochłonna i czasochłonna. Jak do tej pory, do namnażania wirusów pszczelich nie jest możliwe zastosowanie hodowli komórkowych czy tkankowych. Ostatnio uzyskano linie komórkowe embrionów pszczelich, które przeżywają *in vitro* ponad trzy miesiące (7), jednakże brak jest jeszcze danych na temat zastosowania takich linii w badaniach wirusologicznych. Produkując surowicę poliklonalną zawsze należy brać pod uwagę możliwość uzyskania przeciwciał dla więcej niż jednego wirusa. Obecnie już kilka ośrodków badawczych dysponuje przeciwciałami monoklonalnymi (12) uzyskanymi poprzez użycie do immunizacji antygenów wirusowych uzyskanych technikami biologii molekularnej.

Immunodyfuzja w żelu agarozowym (AGID – agar immunodiffusion test). Metoda ma zastoso-wanie przy diagnostyce zakażeń wirusowych próbek pszczelich nadsyłanych z terenu. Zaletą tej metody jest łatwość wykonania i stosunkowo niskie koszty. Czułość metody AGID nie jest duża, w przypadku ABPV metoda wykrywa 3 μg wirusa w 1 ml ekstraktu próbki, jednak wystarczająca, aby zidentyfikować zakażenie na tyle silne, by doprowadzić do śmierci poszczególnych osobników pszczelich. Wadą AGID jest konieczność produkcji surowicy. Poza tym w przypadku zastosowania surowicy otrzymanej przy użyciu zbyt słabo oczyszczonej zawiesiny wirusa bądź zawierającej domieszkę innych wirusów, mogą powstawać reakcje niespecyficzne.

ELISA. Metoda stosowana jest głównie do badań laboratoryjnych nad wirusami pszczelimi (20). Czułość tej metody wynosi 3 ng/ml. Do ELISA stosuje się najczęściej przeciwciała monoklonalne, ponieważ surowice poliklonalne mogą dawać fałszywe wyniki dodatnie. Nie ma komercyjnie dostępnych testów ELISA do diagnostyki zakażeń wirusowych pszczół.

Western blotting. Służy do wykrywania bardzo małych ilości antygenu. Metoda ta jest bardzo czuła, nie jest więc polecana do rutynowej diagnostyki. Stosuje się ją w badaniach molekularnych nad wirusami pszczelimi (15).

Techniki nieserologiczne

RT-PCR. Ponieważ większość wirusów pszczelich zawiera RNA, w ich identyfikacji stosuje się odmianę: RT-PCR (reakcja łańcuchowej polimeryzacji poprzedzona odwrotną transkrypcją). Metoda jest bardzo czuła i wykrywa także wszystkie niewielkie, bezobjawowe zakażenia, w praktyce nie mające znaczenia. Stosowana jest często w pracach badawczych do potwierdzenia, czy kwas nukleinowy interesującego nas wirusa znajduje się w całych owadach (5), w poszczególnych częściach ich ciała lub w poszczególnych narządach (12, 23, 24). Przy pomocy tej techniki testuje się również próbki roztocza atakującego pszczoły – *Varroa destructor* na obecność wirusów pszczelich (22).

Real-Time PCR. Reakcja PCR z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym stosowana jest do pomiaru ilościowego kopii genomów wirusowych czy poziomu ekspresji RNA w komórkach i tkankach (11, 27). Jest to metoda szybka, lecz kosztochłonna. W celu zastosowania jej do diagnostyki należy określić poziom zakażenia, który może być już niebezpieczny dla rodziny. Na konferencji EurBee w 2006 r. przedstawiono pierwsze doniesienia na ten temat (8, 25).

W Polsce do tej pory wykryto obecność ośmiu wirusów pszczelich: wirusa chronicznego paraliżu pszczół, cząsteczki towarzyszącej wirusowi chronicznego paraliżu pszczół, wirusa ostrego paraliżu pszczół, wirusa choroby woreczkowej czerwiu, wirusa choroby czarnych mateczników, wirusa zdeformowanych skrzydeł, wirusa włókienkowego, wirusa Y pszczół (1, 26).

Piśmiennictwo

1. *Allen M., Ball B. V.*: The incidence and world distribution of honey bee viruses. Bee World 1996, 77, 141-162.
2. *Bailey L.*: Viruses of honeybees. Bee World 1982, 63, 165-173.
3. *Bailey L., Carpenter J. M., Woods R.*: Properties of a filamentous virus of the honey bee (Apis mellifera). Virology 1981, 114, 1-7.
4. *Bailey L., Gibbs A. J., Woods R.*: Two viruses from the adult honey bee (Apis mellifera Linnaeus). Virology 1963, 3, 390-395.
5. *Bakonyi T., Grabensteiner E., Kolodziejek J., Rusvai M., Topolska G., Ritter W., Nowotny N.*: Phylogenetic Analysis of Acute Bee Paralysis Virus Strains. Appl. Environ. Microbiol. 2002, 68, 6446-6450.
6. *Berenyi O., Bakonyi T., Derakhshifar I., Köglberger H., Topolska G., Ritter W., Pechhacker H., Novotny N.*: Phylogenetic analysis of deformed wing virus genotypes from diverse geographic origins indicates recent global distribution of the virus. Appl. Environ. Microbiol. 2007, 73, 3605-3611.
7. *Bergem M., Norberg K., Aamodt R. M.*: Long-term maintenance of in vitro cultured honeybee (Apis mellifera) embryonic cells. BMC. Dev. Biol. 2006, 6, 17.
8. *Blanchard P., Ribiere M., Celle O., Schurr F., Lallemand P., Oliver V., Faucon J. P.*: Development of a TaqMan Real-Time RT-PCR assay for quantification of chronic bee paralysis virus (CBPV) genome. Proc. Second Europ. Conf. Apidology, Prague 10-14 September 2006, s. 23.
9. *Burden J. P., Possee R. D., Bonsall M. B., Sait S. M., King L. A., Nixon C. P., Hails R. S.*: Covert infection strategies of insect viruses. Proc. Meeting in Sophia-Antipolis (France) 24-26 April 2005, s. 217-237.
10. *Carter M. J.*: Positive strand RNA viruses of bees. Proc. Meeting in Sophia--Antipolis (France) 24-26 April 2005, s. 45-63.
11. *Chen Y. P., Higgins J. A., Feldlaufe A. F.*: Quantitative Real-Time Reverse Transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (Apis mellifera L.). Appl. Environ. Microbiol. 2005, 71, 436-441.
12. *Fievet J., Tentcheva D., Gauthier L., de Miranda J., Cousserans F., Colin M. E., Bergoin M.*: Localization of deformed wing virus infection in queen and drone Apis mellifera L. Virol. J. 2006, 3, 16.
13. *Fujiyuki T., Takeuchi H., Ono M., Ohka S., Sasaki T., Nomoto A., Kubo T.*: Novel insect picorna-like virus identified in the brains of aggressive worker honeybees J. Virol. 2004, 78, 1093-1100.
14. *Fujiyuki T., Takeuchi H., Ono M., Ohka S., Sasaki T., Nomoto A., Kubo T.*: Kakugo virus from brains of aggressive worker honeybees Adv. Virus. Res. 2005, 65, 1-27.
15. *Gaetana L., de Miranda J. R., Boniotti M. B., Cameron C. E., Lavazza A., Lorenzo C., Camazine S. M., Rossi C.*: Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (Apis mellifera L.) J. Virol. 2006, 80, 4998-5009.
16. *Ghosh R. C., Ball B. V., Willcocks M. M., Carter M. J.*: The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-like virus. J. Gen. Virol. 1999, 80, 1541-1549.
17. *Gliński Z., Jarosz J.*: Naturalna i nabyta odporność przeciwzakaźna pszczoły miodnej. Medycyna Wet. 1994, 50, 472-476.

18. *Govan V. A., Leat N., Allsopp M., Davison S.*: Analysis of complete genome sequence of acute bee paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect – infecting RNA viruses. Virology 2000, 277, 457-463.
19. *Leat N., Ball B., Govan V., Davison S.*: Analysis of complete genome sequence of black queen-cell virus, a picorna-like virus of honey bee. J. Gen. Virol. 2000, 81, 2111-2119.
20. *Miranda J. R. de, Drebot M., Tyler S., Shen M., Cameron C. E., Stoltz D. B. Camazine S. M.*: Complete nucleotide sequence of Kashmir bee virus and comparison with acute bee paralysis virus. J. Gen. Virol. 2004, 85, 2263--2270.
21. *Oliver V., Blanchard P., Chaouch S., Lallemand P., Schurr F., Celle O., Faucon J. P., Ribiere M.*: The chronic bee paralysis virus: a virus like no other; genomic and phylogenetic comparison with other bee viruses. Proc. Second Europ. Conf. Apidology, Prague 10-14 September 2006, s. 24.
22. *Ongus J. R., Peters D., Bonmatin J. M., Bengsch E., Vlak J. M., van Oers M. M.*: Complete sequence of a picorna-like virus of genus Iflavirus replicating in the mite Varroa destructor. J. Gen. Virol. 2004, 85, 3747-3755.
23. *Ribiere M., Lallemand P., Iscache A. L., Schurr F., Celle O., Blanchard P., Oliver V., Faucon J. P.*: Infectious chronic bee paralysis virus (CBPV) excretion in honey bee (Apis mellifera L.) feaces: a way of spread. Proc. Second Europ. Conf. Apidology, Prague 10-14 September 2006, s. 21.
24. *Ribiere M., Tiboulot C., Mathieu L., Aurieres C., Faucon J. P., Pepin M.*: Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. Apidologie 2002, 33, 339-351.
25. *Siede R., Köning M., Bűchler R., Thiel H. J.*: Proc. Second Europ. Conf. Apidology, Prague 10-14 September 2006, s. 19.
26. *Topolska G., Ball B. V., Allen M.*: Identyfikacja wirusów u pszczół z dwóch warszawskich pasiek. Medycyna Wet. 1995, 51, 145-147.
27. *Ward L., Waite R., Boonham N., Fisher T., Pescod P., Thompson H., Chantawannakul P., Brown M.*: First detection of Kashmir bee virus in the UK using real-time PCR. Apidologie 2007, 38, 181-190.

Adres autora: lek. wet. Sylwia Kasprzak, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: grazyna_topolska@sggw.pl