



## CERTIFIKOVANÁ METODIKA

---

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

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

# CERTIFIKOVANÁ METODIKA č. 78

## VIRY A VČELY

### METODICKÝ POSTUP PRO DEKONTAMINACI CHOVATELSKÉHO ZAŘÍZENÍ A VČELAŘSKÝCH POMŮCEK

Autoři:

RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.

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

Ing. Dalibor Titěra, CSc.

(Výzkumný ústav včelařský, s.r.o.)

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. NAZV QJ1510113.

#### AUTOŘI

RNDr. Jana Prodělalová, Ph.D.

Ing. Dalibor Titěra, CSc.

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

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

*Vydalo: Ministerstvo zemědělství ČR*

ISBN 978-80-86895-11-6

2017

#### OPONENTI CERTIFIKOVANÉ METODIKY

doc. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D.

Biomedicínské centrum, Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta UK v Plzni

Ing. Petr Krejčík

Ministerstvo zemědělství ČR

## Předmluva

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

### I. Cíl metodiky

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

## II. Popis metodiky

### 1. Úvod

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

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

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

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

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

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

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

### 2.1 Předmět působnosti a podstata metody

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

#### Potřeby a pomůcky

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

### 2.2 Postup

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

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

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

#### 3.1 Předmět působnosti a podstata metody

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

#### 3.2 Potřeby a pomůcky

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

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

### 3.3 Postup

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

#### III. Srovnání novosti postupů

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

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

#### IV. Popis uplatnění metodiky a ekonomické aspekty

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

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

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

#### V. Seznam použité literatury

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



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

## VI. Seznam publikací předcházejících metodice

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



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.  
Hudcova 296/70  
621 00 Brno  
Czech Republic  
Tel.: +420 5 3333 1111; [www.vri.cz](http://www.vri.cz); e-mail: [vri@vri.cz](mailto:vri@vri.cz)