



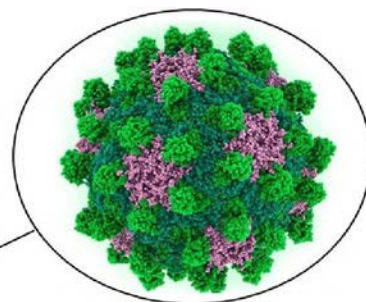
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Τεχνολογίας, Τμήμα Περιβάλλοντος



Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
ΠΜΣ «Διαχείριση Περιβάλλοντος»

Ανάπτυξη πρωτοκόλλου για μοριακή ανίχνευση και τυποποίηση του ιού των παραμορφωμένων φτερών (DWV) της μέλισσας *Apis mellifera*.

ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΔΕΣΠΟΙΝΑ



Επιβλέπων Καθηγητής: Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα.

Λάρισα, Ιούνιος 2025

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1. Η <i>Apis mellifera</i>	9
1.2. ΤΟ ΑΚΑΡΙ <i>Varroa destructor</i>	11
1.3. Ο ΙΟΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΜΟΡΦΩΜΕΝΩΝ ΦΤΕΡΩΝ (<i>Deformed Wing Virus – DWV</i>)	12
1.3.1. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗ	13
1.3.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ	15
1.3.3. ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΙΟΥ	15
1.3.4. Ο ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ	24
1.3.5. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	25
1.3.5.1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΑΚΑΡΕΟΣ <i>Varroa destructor</i>	26
1.3.5.3. ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ	28
1.3.6 ΦΥΛΛΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ	30
1.3.7. ΕΠΟΧΙΚΟΤΗΤΑ	33
1.3.8. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ	35
1.3.8.1. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction, PCR)	35
1.3.8.2. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)	37
1.3.8.3. IN SITU ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ	37
2. ΣΚΟΠΟΣ	39
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	40
3.1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΜΕΛΙΣΣΩΝ	40
3.2. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕΛΙΣΣΩΝ	41
3.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA	41
3.4. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ	41
3.5. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ DWV ΣΤΗΝ RdRp ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ	42
3.5.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ	42
3.5.2. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ DWV ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕΛΙΣΣΩΝ.	44
3.6. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ DWV ΣΤΗ VP1 ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ	44
3.7. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR	45

3.8. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ DWV ΣΤΗ VP1 ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ.	45
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	51
4.1. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΤΗΝ RdRp ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ.....	51
4.2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΤΗ VP1 ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ.	53
4.2.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ VP1.	53
4.2.2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ DWV ΣΤΗ VP1 ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ.....	55
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	60
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	64

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό θα ήθελα πρωτίστως να ευχαριστώ τη καθηγήτρια μου Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα, Καθηγήτρια Περιβαλλοντικής και Μοριακής Ιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ανάθεση του θέματος της διπλωματικής μου εργασίας «Ανάπτυξη πρωτοκόλλου για τη μοριακή ανίχνευση και τυποποίηση του ιού των παραμορφωμένων φτερών (DWV) της *Apis mellifera*», η οποία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Ιολογίας, αλλά και για όλη της τη στάση από την ημέρα μηδέν μέχρι τέλους. Ως χημικός, στόχος μου ήταν από την αρχή να βρω ένα εργαστήριο για τη διπλωματική μου εργασία γύρω από το προσωπικό μου ενδιαφέρον, που δεν είναι άλλο από τη προστασία της βιοποικιλότητας των ζώων και των φυσικών οικοσυστημάτων. Δίνοντας μου σαφέστατες οδηγίες και πληροφορίες, κατάφερα να ξεκλειδώσω έναν καινούργιο κόσμο στο μικρόκοσμο και να αποκτήσω πάρα πολλές γνώσεις γύρω από τους ιούς και τη μοριακή οικολογία τους. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω επίσης θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλον αυτόν τον καιρό, αλλά κυρίως για την ευγενέστατη συμπεριφορά και την υπομονή της, καθώς και για τη παροχή των γνώσεων που μου παρείχε αβίαστα καθημερινά. Οφείλω επίσης ένα ευχαριστώ στον κ.Γκόρα Γεώργιο, Επίκουρο Καθηγητή Εργαστήριο Σηροτροφίας και Μελισσοκομίας του ΓΠΑ για τη παροχή των δειγμάτων των μελισσών, καθώς και στην κ. Κοτταρίδη Χριστίνα, Επίκουρη Καθηγήτρια Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Τμήμα Βιολογίας του ΑΠΘ, για τη συνεργασία. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Τέση και Βαγγέλη και τις αδερφές μου Ροδιάννα και Δήμητρα, για την πολύτιμη οικονομική τους συνεισφορά, αλλά και για το όλο το ενδιαφέρον τους γύρω από το θέμα μου, όπου σε συνδυασμό με την πλήρη άγνοια τους γύρω από τον επιστημονικό τομέα και τη συνεχή επεξήγηση των πραγμάτων, μπόρεσα να διεκπεραιώσω το στόχο μου και να ολοκληρώσω την εργασία μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μέλισσα *Apis mellifera* αποτελεί τον πιο σημαντικό επικονιαστή στο ζωικό βασίλειο και το κυρίαρχο είδος μέλισσας στην Ελλάδα και στην υπόλοιπη Ευρώπη, κυρίως λόγω της αυξημένης παραγωγής μελιού. Ένας από τους σημαντικότερους ιούς των μελισσών είναι ο ιός των παραμορφωμένων φτερών (*Deformed Wing Virus* – DWV). Η *A. mellifera* μολύνεται συχνά από τον DWV ο οποίος συχνά προκαλεί σοβαρά συμπτώματα όπως παραμόρφωση φτερών και πρόωρη θνησιμότητα. Ο DWV είναι ένας RNA ιός θετικής πολικότητας, με τουλάχιστον τρεις διακριτούς γονότυπους, DWV-A, DWV-B και DWV-C. Μέχρι σήμερα ο ιός μεταλλάσσεται και εμφανίζει μεγάλη γονιδιακή ποικιλομορφία ανάμεσα στα στελέχη του, ενώ παράλληλα παρατηρούνται ανασυνδυασμοί μεταξύ των υποτύπων. Στα ελληνικά μελισσοκομεία, ο DWV ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά το 2010, ενώ μέχρι σήμερα δεν υπάρχει καμία αναφορά για τον γονότυπο του ιού που επικρατεί σε διάφορες περιοχές της χώρας.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μοριακού πρωτοκόλλου για την ανίχνευση του DWV, καθώς και για την τυποποίησή του. Αρχικά, αναπτύχθηκε πρωτόκολλο ανίχνευσης χρησιμοποιώντας εκκινητικά μόρια ενίσχυσης συντηρημένων περιοχών της RNA εξαρτώμενης πολυμεράσης (RdRp) και εφαρμόστηκε σε 26 δείγματα μελισσών, από τα οποία, τα 25 βρέθηκαν θετικά στον ιό. Σε επόμενο βήμα, εφαρμόστηκε πρωτόκολλο ανίχνευσης μέσω της καψιδιακής γενωμικής περιοχής VP1, χρησιμοποιώντας εκκινητικά μόρια από τη βιβλιογραφία. Το πρωτόκολλο εφαρμόστηκε στα 25 θετικά στον ιό δείγματα, από τα οποία, μόνο τα 6 ενισχύθηκαν στη συγκεκριμένη περιοχή. Ως εκ τούτου στην παρούσα εργασία σχεδιάστηκαν εκ νέου εκκινητές για την ανίχνευση και τυποποίηση του ιού στοχεύοντας την συντηρημένα τμήματα της VP1 καψιδιακής περιοχής του γενώματος των στελεχών Α και Β. Επιπλέον, σχεδιάστηκαν εκκινητές ξεχωριστά για την ταυτοποίηση των τύπων Α και Β, με παράλληλο στόχο τη δημιουργία PCR προϊόντων με διαφορετικά μοριακά βάρη, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα για την ανίχνευση και τυποποίηση των τύπων του ιού σε μια αντίδραση.

Λέξεις κλειδιά: Ιός Παραμορφωμένων Φτερών, μοριακή ανίχνευση, μοριακή τυποποίηση, *A. mellifera*

ABSTRACT

The honey bee *Apis mellifera* is the most important pollinator in the animal kingdom and the dominant bee species in Greece and the rest of Europe, mainly due to its high honey production. One of the most significant honey bee viruses is the Deformed Wing Virus (DWV). *A. mellifera* is frequently infected by DWV, which often causes severe symptoms such as wing deformities and premature mortality. DWV is a positive-sense RNA virus with at least three distinct genotypes: DWV-A, DWV-B, and DWV-C. To date, the virus continues to mutate and exhibits considerable genetic variability among its strains, while recombination events between subtypes are also observed. In Greek apiaries, DWV was first detected in 2010. However, there has been no report so far on the prevailing viral genotype in different regions of country.

The aim of the present study was the development of a molecular protocol for DWV detection, as well as its genotyping. Initially, a detection protocol was developed using primers targeting conserved regions of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), and it was applied to 26 bee samples, 25 of which tested positive for the virus. In the next step, a detection protocol targeting the capsid genomic region VP1 was applied, using primers sourced from the literature. This protocol was applied to the 25 virus-positive samples, from which only 6 yielded amplification in this region. Therefore, in the current study, new primers were designed for the detection and genotyping of the virus, targeting conserved segments of the VP1 capsid region of genotypes A and B. Additionally, primers were separately designed for the specific identification of types A and B, with the parallel aim of generating PCR products of different molecular weights, so they can be used simultaneously for the detection and genotyping of the viral types in a single reaction.

Keywords: Deformed Wing Virus, molecular detection, molecular genotyping, *A. mellifera*

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Δείγματα Μελισσών.	Σελ. 39
Πίνακας 2. Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης PCR.	Σελ. 42
Πίνακας 3. Συνθήκες Gradient PCR.	Σελ. 42
Πίνακας 4. Πειραματικές δοκιμές για αντίδραση PCR.	Σελ. 42
Πίνακας 5. Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της RdRp.	Σελ. 43
Πίνακας 6. Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του ιού μέσω της VP1 γενωμικής περιοχής.	Σελ. 44
Πίνακας 7. Συνθήκες αντίδρασης PCR για την ενίσχυση τμήματος της VP1 γενωμικής περιοχής.	Σελ. 44
Πίνακας 8. Στελέχη που επιλέχθηκαν για το σχεδιασμό εκκινητών για την ανίχνευση στελεχών DWV τύπων Α και Β.	Σελ. 46
Πίνακας 9. Στελέχη που επιλέχθηκαν για το σχεδιασμό εκκινητών για τυποποίηση στελεχών DWV τύπου Α.	Σελ. 47
Πίνακας 10. Στελέχη που επιλέχθηκαν για το σχεδιασμό εκκινητών για τυποποίηση στελεχών DWV τύπου Β.	Σελ. 48
Πίνακας 11. Ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση για την ανίχνευση του DWV μέσω της RdRp περιοχής.	Σελ. 51
Πίνακας 12. Συνθήκες αντίδρασης για την ανίχνευση μέσω της RdRp.	Σελ. 51
Πίνακας 13. Αποτελέσματα PCR για την RdRp στα δείγματα μελισσών της παρούσας εργασίας.	Σελ. 52
Πίνακας 14. Αποτελέσματα PCR με τα ζεύγη εκκινητών DWV-VP1 F/R και DWV7F/7R	Σελ. 53
Πίνακας 15. Συντηρημένες περιοχές μεταξύ DWV-A και DWV-B.	Σελ. 55
Πίνακας 16. Συντηρημένες περιοχές μεταξύ Α στελεχών για τη περιοχή με βάση το πρότυπο στέλεχος Α.	Σελ. 55
Πίνακας 17. Συντηρημένες περιοχές μεταξύ Β στελεχών.	Σελ. 56
Πίνακας 18. Εκκινητές που σχεδιάστηκαν στην παρούσα εργασία.	Σελ. 57

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα1. Η <i>Apis mellifera</i> .	Σελ. 9
Εικόνα2. Η ροή των σημαντικότερων ιών των μελισσών ανάμεσα στα διαφορετικά συγγενικά είδη μέλισσας.	Σελ. 10
Εικόνα3. Το άκαρι <i>Varroa destructor</i> .	Σελ.11
Εικόνα 4. Το άκαρι προσκολλημένο στη μέλισσα.	Σελ. 12
Εικόνα 5. Ο ιός των παραμορφωμένων φτερών DWV.	Σελ 12
Εικόνα 6. Συμπτώματα της μέλισσας παρουσία και απουσία του ακάρεος.	Σελ. 13
Εικόνα 7. Κλινική εικόνα μεταξύ υγείων μελισσών και ύστερα από μόλυνση με τα στελέχη DWV-A και DWV-B.	Σελ. 14
Εικόνα 8. Στα Α, Β απεικονίζεται η καψιδιακή επιφάνεια του DWV..	Σελ. 15
Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση της καψιδιακής περιοχής.	Σελ. 18
Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση του γονιδιώματος του DWV.	Σελ. 18
Εικόνα 11. Τα τρία διαφορετικά μοτίβα της καψιδιακής περιοχής.	Σελ. 21
Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση της αναδίπλωσης των καψιδιακών πρωτεϊνών του DWV.	Σελ. 23
Εικόνα 13. Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής του DWV.	Σελ. 25
Εικόνα 14. Επικράτηση στελεχών DWV-A και DWV-B.	Σελ. 28
Εικόνα 15. Στην εικόνα απεικονίζεται ο καταμερισμός των τύπων DWV-A και DWV-B ανάμεσα σε ομαδοποιημένα στελέχη διαφόρων χωρών.	Σελ. 29
Εικόνα 16. Φυλογενετικά δέντρα μεταξύ των γονοτύπων του DWV A,B,C και D, βάσει τεσσάρων γενωμικών περιοχών.	Σελ. 30
Εικόνα 17. Φυλογενετικό δέντρο της RdRp γενωμικής περιοχής.	Σελ. 32
Εικόνα 18. Φυλλογενετικό δέντρο της καψιδιακής γενωμικής περιοχής VP1, μεταξύ στελεχών του τύπου DWV-A και DWV-B	Σελ. 33
Εικόνα 19. Κατανομή των DWV-A και DWV-B στα νησιά της Χαβάης, για τις περιόδους του Γενάρη, του Μαΐου και του Σεπτεμβρίου.	Σελ. 34
Εικόνα 20. Εικόνες οπτικοποίησης του γενετικού υλικού του DWV σε κύτταρα και ιστούς μελισσών.	Σελ. 37
Εικόνα 21. Πήκτωμα αгарόζης της ηλεκτροφόρησης των αποτελεσμάτων της Gradient PCR.	Σελ. 50
Εικόνα 22. Πήκτωμα αгарόζης της ηλεκτροφόρησης των αποτελεσμάτων PCR.	Σελ. 52
Εικόνα 23. Στοιχισή αλληλουχιών στελεχών DWV-A και DWV-B και αναγνώριση των συντηρημένων περιοχών.	Σελ. 54
Εικόνα 24. Έλεγχος συμπληρωματικότητας DWV-3151F, μεταξύ των χαρακτηρισμένων αλληλουχιών Α και Β.	Σελ. 58
Εικόνα 25. Έλεγχος συμπληρωματικότητας του εκκινητή DWV-4021R.	Σελ. 58

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Η *Apis mellifera*

Οι μέλισσες είναι οι πιο αποτελεσματικοί επικονιαστές του πλανήτη μας. Περισσότερο από το 50% της παγκόσμιας παραγωγής λιπών και ελαίων προέρχεται από φυτά τα οποία απαιτούν επικονίαση (φοινικέλαιο, ηλιέλαιο, ελαιοκράμβη κ.α.), με το 84% των καλλιεργειών της ΕΕ να ευνοείται από επικονίαση που γίνεται κυρίως από μέλισσες. Μεταφέροντας γύρη από το ένα λουλούδι στο άλλο, οι μέλισσες βοηθούν τα φυτά να αναπαραχθούν, επιτελώντας την ονομαζόμενη διαδικασία της επικονίασης. Η διαδικασία αυτή, είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση πολλών φυτών, σε βαθμό όπου χωρίς αυτή, πολλά είδη θα εξαφανίζονταν. Οι μέλισσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην οικολογική ισορροπία, καθώς χάρη στην επικονιάσή τους, ενισχύονται τα δάση και τα λιβάδια, τα οποία με τη σειρά τους παράγουν οξυγόνο και απορροφούν διοξείδιο του άνθρακα (Michener, et al, 2007). Το επικρατέστερο είδος στην Ελλάδα και στην Ευρώπη αποτελεί η *Apis mellifera* (εικόνα 1) (Ruttner, 1988).



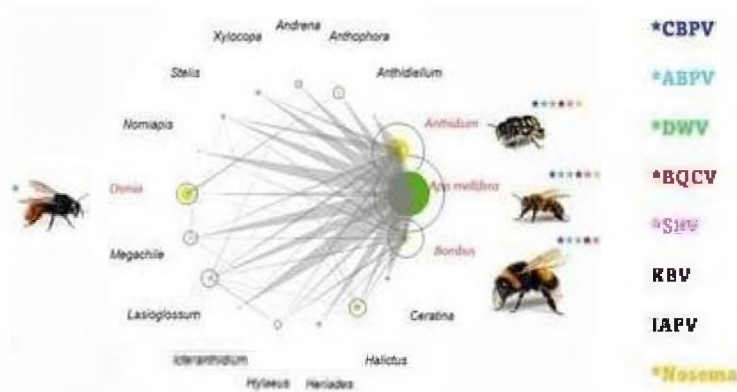
Εικόνα 1. Η *Apis mellifera* (National Geographic, 2023).

Η μέλισσα *Apis mellifera* (μέλισσα ή μελιτοφόρος) αποτελεί τον πιο σημαντικό επικονιαστή στο ζωικό βασίλειο (Schoch, et al, 2020), ενώ αποτελεί το κυρίαρχο είδος μέλισσας στην Ελλάδα αλλά και στην υπόλοιπη Ευρώπη (Moore, 2018). Όπως αναφέρεται, η *Apis mellifera*, ή αλλιώς «ευρωπαϊκή» ή «δυτική» μέλισσα, είναι ένα από τα πιο γνωστά και σημαντικά είδη μελισσών και ταυτόχρονα κατατάσσεται στον πιο διαδεδομένο τύπο που χρησιμοποιείται στην μελισσοκομία παγκοσμίως, λόγω της αυξημένης παραγωγής μελιού ως προϊόν των κυψελών (Moore, 2018). Πιο αναλυτικά, το συγκεκριμένο είδος μέλισσας, έχει την ικανότητα να επικονιάζει φυτά συλλέγοντας ταυτόχρονα νέκταρ και γύρη από τα άνθη, προκειμένου στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν ως τροφή για την αποικία. Το νέκταρ μετατρέπεται σε μέλι, ενώ η γύρη προσφέρει πρωτεΐνες και άλλα θρεπτικά συστατικά στις μέλισσες (Michener, et al, 2007). Η *Apis mellifera* είναι μοναδική για την ικανότητά της να παράγει μεγάλες ποσότητες μελιού και κεριού, καθιστώντας την εξαιρετικά πολύτιμη για τους ανθρώπους (Schoch, et al, 2020). Στην Ελλάδα υπάρχουν περίπου 22.500 μελισσοκόμοι το μεγαλύτερο ποσοστό των οποίων είναι επαγγελματίες, ενώ η χώρα μας κατέχει την 3η θέση της Ευρωπαϊκής Ένωσης σε αριθμό μελισσιών, καθώς σύμφωνα με τα στοιχεία του 2023, στην Ελλάδα υπάρχουν περίπου 2.250.000 μέλισσια, με το μέσο όρο στην Ευρώπη να έχει τη τιμή των 700.000 μελισσιών

(https://agriculture.ec.europa.eu/media/news/beekeeping-sector-results-pilot-study-honey-bee-selection-2022-03-15_en?wt-search=yes).

Σύμφωνα με τα διαθέσιμα δημοσιευμένα αποτελέσματα, τα τελευταία 15 χρόνια έχουν αναφερθεί συχνές δραματικές απώλειες αποικιών ιδιαίτερα τους χειμερινούς μήνες, σε διάφορες περιοχές του κόσμου. Η μέλισσα αντιμετωπίζει μια παγκόσμια ύφεση με τις σημαντικότερες αιτίες θνησιμότητας των αποικιών των μελισσιών, να αποδίδεται στο άκαρι βαρρόα (*Varroa destructor*) (Wilfert, et al, 2016). Πιο αναλυτικά, στη δεκαετία του 1950, το εκτοπαράσιτο άκαρι βαρρόα, πέρασε από τον εγγενή ξενιστή του την ασιατική μέλισσα, *Apis cerana* στην ευρωπαϊκή μέλισσα, *Apis mellifera* (Oldroyd, 1999), το πιο συχνά διαχειριζόμενο είδος μέλισσας σε όλο τον κόσμο. Η ευρεία γεωγραφική κατανομή και η εκτεταμένη παγκόσμια εμπορική μετακίνηση αυτού του είδους, σήμαινε ότι το άκαρι μπόρεσε να εγκατασταθεί γρήγορα σε πληθυσμούς μελισσών σε όλη την υδρόγειο, ενώ ήταν υπεύθυνο για μεγάλης κλίμακας απώλειες αποικιών, λόγω της αποτελεσματικότητάς του ως φορέας ιών που σχετίζονται με τις μέλισσες (Wilfert, et al, 2016).

Πιο συγκεκριμένα, η υγεία των αποικιών των μελισσών απειλείται από πολλούς παρασιτικούς και παθογόνους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των ιών, με κυριότερο τον ιό των παραμορφωμένων φτερών (*Deformed Wing Virus* - DWV), που αρχικά θεωρούνταν ένας ήπιος στρεσογόνος παράγοντας για τις μέλισσες, ενώ πλέον αναγνωρίζεται ως μία από τις κύριες ιογενείς απειλές που ευθύνονται για τις χειμερινές απώλειες αποικιών παγκοσμίως. Συγκεκριμένα, όπως απεικονίζεται στην εικόνα 2, ο DWV έχει ανιχνευτεί στα βασικότερα είδη μελισσών (Sircoulomb, et al, 2025).



Εικόνα 2. Η ροή των σημαντικότερων ιών των μελισσών ανάμεσα στα διαφορετικά συγγενικά είδη μέλισσας (Sorvillo, et al, 2025).

1.2. TO AKAPI *Varroa destructor*

Το άκαρι *Varroa destructor* (εικόνα 3) επιλέγει τη μέλισσα ως ξενιστή για το παρασιτισμό του και δρα ως πολύ ισχυρός φορέας πολλαπλών ιών (Beaurepaire, et al, 2020). Τρέφεται από το λίπος των ενήλικων μελισσών και τις προνύμφες, αδυνατίζοντας τα έντομα και μεταφέροντάς τους λοιμογόνους παράγοντες. Η μόλυνση από το άκαρι *V. destructor*, οδηγεί σε βαρροάτωση ή αλλιώς βαρροϊκή ακαρίαση, όπου είναι η κύρια παρασιτική πάθηση που ευθύνεται για τις περισσότερες περιπτώσεις κατάρρευσης μελισσιών, με το γένος *Varroa* να περιλαμβάνει αποκλειστικά υποχρεωτικά εξωπαρασίτα των μελισσών (O'Shea-Wheller, et al, 2025). Παλαιότερα πιστευόταν ότι το είδος το οποίο παρασιτούσε αποκλειστικά στην ασιατική μέλισσα *Apis cerana*, ενώ πριν από 40 περίπου χρόνια ξεκίνησε να παρασιτεί και στην ευρωπαϊκή *Apis mellifera*. Μελέτη του 2000 έδειξε ότι το άκαρι που προσβάλλει την ευρωπαϊκή μέλισσα είναι το *Varroa destructor* και πιθανολογείται ότι είναι ασιατικής προέλευσης (Anderson and Trueman, 2000), ωστόσο δεν είναι ακόμα γνωστό πως εμφανίστηκε το παράσιτο στην Ευρώπη (O'Shea-Wheller et al, 2025).



Εικόνα 3. Το άκαρι *Varroa destructor* (O'Shea-Wheller et al, 2025).

Επιπλέον, έχει φανεί πως σε περιπτώσεις ισχυρής προσβολής από το άκαρι, η παραγωγή μελιού μπορεί να μειωθεί μέχρι και 10 κιλά ανά μέλισσι (Emsenetal, 2014). Η παθογόνος δράση του εν λόγω ακάρεος, έγκειται στην αγκίστρωση του ακάρεος στο σώμα των μελισσών (εικόνα 4), των τραυματισμό αυτών, στην αφαίμαξη της αιμολέμφου και του λιπώδους ιστού, καθώς και στην ταυτόχρονη έγχυση τοξινών και τη μετάδοση ιών (Anderson and Trueman, 2000). Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι το *Varroa destructor* ελαττώνει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν αντιμικροβιακά πεπτίδια στη μέλισσα, όπως είναι οι ντεφενσίνες, ενώ παράλληλα συντελεί στην εξάπλωση και την ανάπτυξη ιικών μολύνσεων. Έτσι, η μείωση του προσδόκιμου ζωής των μελισσών οφείλεται στην ολική εξασθένηση του ανοσοποιητικού τους συστήματος (O'Shea-Wheller, et al, 2025).

Ακόμη, είναι γνωστό ότι το *V. destructor* είναι φορέας μια πληθώρας ιών που προσβάλλουν τη μέλισσα, ενώ παράλληλα σε αρκετές μελέτες αναφέρεται η στενή σχέση που υπάρχει μεταξύ των ιικών μολύνσεων με το επίπεδο προσβολής από το άκαρι (κυρίως για τον ιό των παραμορφωμένων φτερών DWV). Μάλιστα, φαίνεται πως σε κάποιες περιπτώσεις η συσχέτιση του επιπέδου μόλυνσης κάποιου ιού με το επίπεδα προσβολής από το παράσιτο να είναι τόσο στενή, ώστε η ανίχνευση του ιού

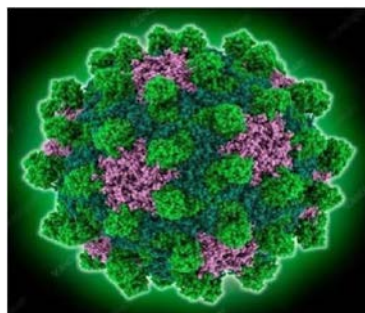
να αποτελεί αξιόπιστο δείκτη προσβολής με βαρρόα (Piu, et al, 2024). Τέλος, οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται στη διαγνωστική των ιώσεων έχουν εξαιρετική ευαισθησία σε σχέση με τις μεθόδους που εφαρμόζονται για την διάγνωση του βαθμού προσβολής από βαρρόα, ενώ ταυτόχρονα σε έρευνα του 2025 φαίνεται πως στην Ελλάδα σημειώνονται μεγάλα ποσοστά του ακάρεος (Sircoulomb, et al, 2025).



Εικόνα 4. Το άκαρι προσκολλημένο στη μέλισσα (Boretti, et al, 2024).

1.3. Ο ΙΟΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΜΟΡΦΩΜΕΝΩΝ ΦΤΕΡΩΝ (*Deformed Wing Virus – DWV*)

Ο ιός των παραμορφωμένων φτερών (*Deformed Wing Virus – DWV*) (εικόνα 5), εξελίχθηκε από ένα μικρό παθογόνο, σε έναν από τους σοβαρότερους εχθρούς της μελισσοκομίας, κυρίως εξαιτίας της εμφάνισης του προαναφερθέντος ακάρεος. Το άκαρι επιλέγει τη μέλισσα ως ξενιστή για το παρασιτισμό του και δρα ως πολύ ισχυρός φορέας του DWV (Martin, et al, 2012).



Εικόνα 5. Ο ιός των παραμορφωμένων φτερών DWV (Science Library, 2024).

Αν και έχει συσχετιστεί στενά με την απώλεια εκατομμυρίων μελισσιών παγκοσμίως, δεν είναι ένας καλά μελετημένος ιός (Schroeder and Martin, 2012). Ο DWV έχει ανιχνευθεί σε περισσότερα από 20 είδη μελισσών και υπάρχουν ενδείξεις ότι αναπαράγεται σε αρκετά από αυτά τα είδη και προκαλεί βλαβερές συνέπειες σε δύο είδη βομβίνων (*Bombus terrestris* και *Bombus pascuorum*), καθώς και στην *A. mellifera* (Sorvillo, et al, 2025).

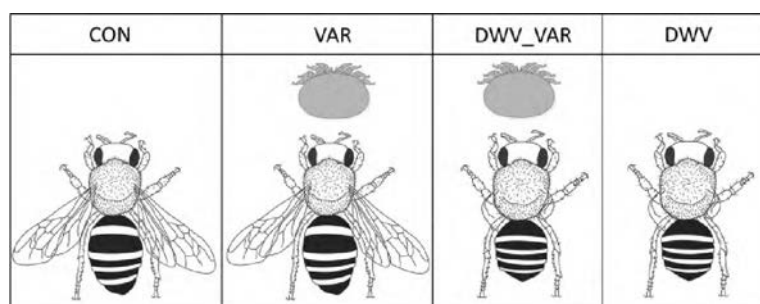
Σε παγκόσμια κλίμακα ο ιός κατανέμεται κυρίως σε τρία διαφορετικά στελέχη, DWV-A, DWV-B, DWV-C, ενώ μια πρόσφατη μελέτη δείχνει την εμφάνιση ενός τέταρτου στελέχους, του DWV-D. Στην Ελλάδα ο DWV εντοπίστηκε πρώτη φορά σε μελίτσια το 2010 (Bacandritsos, et al, 2010), αλλά μέχρι σήμερα παραμένει άγνωστος ο τρόπος κατανομής των τύπων του ιού στη χώρα. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε

το 2025, οι ερευνητές αναφέρουν πως ανίχνευσαν τέσσερα στελέχη του ιού στη Βόρεια Ελλάδα τα οποία αναγνωρίστηκαν ως τύπου B (Sircoulomb, et al, 2025).

1.3.1. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗ

Η *A. mellifera* μολύνεται συχνά από τον DWV, ο οποίος μπορεί να διατηρηθεί ως ασυμπτωματική μόλυνση ή να προκαλέσει αλλαγές στη συμπεριφορά (μειωμένη δραστηριότητα και απόδοση εργασιών στην κυψέλη), παραμόρφωση των φτερών και πρόωρη θνησιμότητα (Sircoulomb, et al, 2025). Η κλινική επίδραση του DWV στην υγεία των μελισσών ξεκίνησε μετά την εισαγωγή του ακάρεος *Varroa destructor* στην Ευρώπη και την Αμερική, κατά το δεύτερο μισό του 20ού αιώνα (εικόνα 6). Δεν είναι σαφές εάν ο DWV είχε ήδη μολύνει τη δυτική μέλισσα πριν το *V. destructor* αλλάξει ξενιστή από την *Apis cerana* (ανατολική μέλισσα) στην *Apis mellifera* (δυτική μέλισσα) (Sircoulomb, et al, 2025). Τα βασικότερα συμπτώματα του ιού αφορούν τη παραμόρφωση των φτερών, τους αποχρωματισμούς του εντόμου και την ατροφία του σώματος (Erban, et al, 2019).

Ακόμη, ο DWV μπορεί να μεταδοθεί κάθετα ή οριζόντια και να παραμείνει ως λανθάνουσα λοίμωξη ακόμα και χωρίς την παρουσία του ακάρεος (Erban, et al, 2019). Συγκεκριμένα, η οριζόντια μετάδοση του ιού υλοποιείται μέσω άμεσης επαφής μεταξύ των εντόμων και ιδιαίτερα μέσω της μετακίνησης των παρασίτων όπως το άκαρι, ενώ η κάθετη μετάδοση πραγματοποιείται από τη μητέρα στο αυγό (Liu, et al, 2016). Πιο αναλυτικά, η οριζόντια μετάδοση μέσω του *V. destructor* έχει συσχετιστεί με μορφολογικά συμπτώματα, όπως παραμορφωμένα φτερά, κοντή κοιλιά και νευρολογικές διαταραχές όπως, πρόωμη αναζήτηση τροφής, μειωμένη ικανότητα πτήσης και μάθησης, καθώς και μικρότερη διάρκεια ζωής (Sircoulomb, et al, 2025). Ακόμη, η εισαγωγή του DWV απευθείας στην αιμολέμφο κατά τη διάρκεια της διατροφής του ακάρεος, έχει συσχετιστεί στενά με τον θάνατο εκατομμυρίων αποικιών και έχει αλλάξει πλήρως το ιογενές τοπίο των μελισσών και άλλων σχετικών εντόμων. Αυτή η τριμερής σχέση μεταξύ της μέλισσας (ξενιστή), του ακάρεος (φορέα) και του DWV (παθογόνου) έχει γεννήσει χιλιάδες μελέτες, ενώ λόγω της σημασίας των μελισσών και της ευκολίας χειρισμού τους από τους παραγωγούς, αυτό το τριμερές σύστημα συνεχίζει να εξελίσσεται σε ένα εξαιρετικό μοντέλο μελέτης εντόμων-ξενιστών-ιογενών παθογόνων (Martin, 2019).



Εικόνα 6. Κλινική εικόνα υγιούς μέλισσας, έπειτα παρουσία του ακάρεος, παρουσία του ακάρεος και του DWV και τέλος παρουσία του DWV (Erban, et al, 2019).

Οι λοιμώξεις από τον DWV συνήθως δεν παρουσιάζουν συμπτώματα σε ενήλικες μέλισσες, αλλά προκαλούν σοβαρές ασθένειες στις αναπτυσσόμενες προνύμφες, οδηγώντας σε παραμορφώσεις φτερών, δημιουργία νάνων, αποχρωματισμούς στο σώμα και πολλές φορές τελικά ακόμα και στο θάνατο (Arevalo, et al, 2019). Ειδικότερα, όπως προαναφέρθηκε και παραπάνω, από το 2012 οι απώλειες των αποικιών των μελισσών έχουν συνδεθεί με τον ιό των παραμορφωμένων φτερών (DWV) και ιδιαίτερα με το άκαρι *Varroa destructor* (Martin, et al, 2012). Λίγα χρόνια αργότερα, το 2016, μια ξεχωριστή ομάδα ερευνητών υπέδειξε πως ο ιός DWV αποτελεί μια πρόσφατη επιδημία παγκόσμιας κλίμακας, η οποία ενισχύθηκε και εξαπλώθηκε μαζικά λόγω της πορείας μετάδοσης του ιού μέσω του παρασίτου *Varroa destructor* (Wilfert, et al, 2016). Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν παγκόσμιες δειγματοληψίες και τελικά ανέφεραν ότι, πριν τη διάδοση του *Varroa*, ο DWV ήταν ένας σχετικά σπάνιος και ήπιος ιός στις μέλισσες, ενώ μετά την παγκόσμια εξάπλωση του ακάρεος, ο DWV μεταλλάχθηκε και απέκτησε αυξημένη λοιμογόνο δράση, οδηγώντας στη μεγάλη θνησιμότητα των αποικιών (Wilfert, et al., 2016). Επίσης, σε έρευνα του 2019 τονίζεται πως, το φορτίο των ακαρέων *Varroa* που δρουν ως φορείς του DWV, είναι σίγουρα ο πιο σημαντικός παράγοντας στην ανάπτυξη εμφανών συμπτωμάτων, όπως και στη κατάρρευση της αποικίας (Arevalo, et al, 2019), ενώ μέχρι και σήμερα επισημαίνεται, πως το *V. destructor* δρα ως βιολογικός φορέας του ιού, εγχέοντας ιικά σωματίδια απευθείας στην αιμολέμφο των προνυμφών ή των ενήλικων μελισσών κατά τη διατροφή του, διαπερνώντας τις φυσικές ασπίδες άμυνας των μελισσών, ενισχύοντας σημαντικά στην παθογένεια του DWV (Sircoulomb, et al, 2025).

Τέλος, από πρόσφατη έρευνα του 2024 (Barth, et al, 2024), παρατηρούνται σαφείς διαφορές στην παθογένεια και στην κλινική εικόνα μεταξύ των δύο κυριότερων γονοτύπων του ιού, DWV-A και DWV-B (εικόνα 7). Συγκεκριμένα, η μόλυνση με DWV-A οδηγεί σε σημαντικά υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας στις προνύμφες (έως και 80%), ενώ οι ενήλικες μέλισσες παρουσιάζουν έντονες παραμορφώσεις, κυρίως στα φτερά, και μειωμένη διάρκεια ζωής. Αντιθέτως, ο DWV-B προκαλεί ηπιότερα φαινομενικά συμπτώματα, με τη θνησιμότητα στις προνύμφες να περιορίζεται στο 20% και την πλειονότητα των ενήλικων μελισσών να μην εμφανίζει εμφανή κλινικά συμπτώματα.



Εικόνα 7. Κλινική εικόνα μεταξύ υγιών μελισσών και ύστερα από μόλυνση με τα στελέχη DWV-A και DWV-B (Barth, et al, 2024).

Ωστόσο, σε περιπτώσεις έκθεσης σε υψηλό ιικό φορτίο, και οι δύο γονότυποι είναι ικανοί να προκαλέσουν μαζικό θάνατο (>90%), γεγονός που υποδηλώνει ότι η δόση του ιού αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την έκβαση της λοίμωξης (Barth, et al, 2024). Επιπλέον, αν και στο άκαρι μπορούν να συνυπάρχουν και οι δύο κύριοι τύποι του ιού Α και Β, μόνο ο DWV- Β είναι ικανός να αναπαράγεται σε αυτό, ενώ αντιθέτως ο DWV-Α φαίνεται να απαιτεί την παρουσία της μέλισσας για την αναπαραγωγή του γονιδιώματός του, γεγονός που υποδηλώνει διαφορετικές εξελικτικές στρατηγικές μεταξύ των δύο γονοτύπων προς την παθογένεια και τη δυναμική μετάδοσης του ιού (Gisder, et al, 2021). Τα ευρήματα αυτά καταδεικνύουν τις διαφοροποιήσεις στην παθοφυσιολογία των δύο στελεχών, επισημαίνοντας την ανάγκη για διακριτή προσέγγιση στην αξιολόγηση και διαχείριση της υγείας των αποικιών μελισσών.

1.3.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ

Ο ιός των παραμορφωμένων φτερών (*Deformed Wing Virus – DWV*) είναι ένας RNA ιός, ο οποίος ανήκει στο γένος *Iflavirus* και στην οικογένεια *Iflaviridae*, της τάξης *Picornavirales*, ενώ το είδος του περιγράφεται ως *Deformed Wing Virus* (DWV) (Le Gall, 2008).

Η οικογένεια *Iflaviridae* αποτελεί μια γνωστή οικογένεια ιών που σχετίζεται με τις μέλισσες, η οποία περιλαμβάνει τον Ιό Παραμορφωμένων Φτερών (DWV), τον Ιό Σακομόρφου Γόνου (SBV) και τον Ιό Χρόνιας Παράλυσης Μελισσών (CBPV). Συγκεκριμένα, η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει μια ομάδα RNA ιών που προσβάλλουν κυρίως έντομα. Οι *Iflaviruses* διακρίνονται από καψίδιο χωρίς φάκελο και θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA γονιδίωμά τους (Liu and Maclachlan, 2016).

Όπως όλοι οι ιφλαϊοί (*Iflaviruses*), ο DWV υπάρχει ως μη-επικαλυμμένο ιοσωμάτιο εικοσαεδρικής συμμετρίας με διάμετρο περίπου 30 nm, το οποίο περιέχει ένα αντίγραφο ενός θετικού μονόκλωνου RNA γονιδιώματος. Το γονιδίωμα των ~10 kb περιλαμβάνει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame) που κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη 2.893 αμινοξέων, η οποία υφίσταται μεταφραστική επεξεργασία (Martin, 2019).

1.3.3. ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΙΟΥ

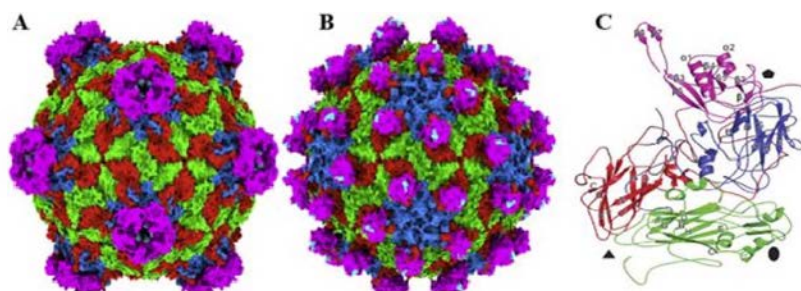
Η τρισδιάστατη δομή του ιού των παραμορφωμένων φτερών (*Deformed Wing Virus – DWV*), ανακαλύφθηκε το 2016 από μελέτες μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ. Συγκεκριμένα, ο DWV οργανώνεται σε ένα εικοσαεδρικό σφαιρικό σωματίδιο διαμέτρου 30 nm, το οποίο εξωτερικά αποτελείται από ένα πρωτεϊνικό περίβλημα ως καψίδιο, στο εσωτερικό του οποίου περικλείεται το γενετικό του υλικό ή αλλιώς το γονιδίωμά του, που αποτελείται από ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας (Skubník, et al, 2016). Όπως και οι περισσότεροι ιοί της οικογένειας

Iflaviridae και τον Εντεροϊών, ο DWV δεν διαθέτει επιπλέον προστατευτική λιπιδιακή μεμβράνη εξωτερικά του καψιδίου λειτουργώντας ως φάκελο, με αποτέλεσμα η δομή του καψιδίου να τους προσδίδει στο επίπεδο την κλασική εικοσαεδρική συμμετρία (Liu, et al, 2016).

Δομή καψιδίου

Το καψίδιο είναι η εξωτερική πρωτεϊνική επιφάνεια του ιού και αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την μολυσματικότητα και την αναπαραγωγική του διαδικασία (Liu, et al, 2016). Συγκεκριμένα, οποιαδήποτε μεταβολή ή μετάλλαξη σε αυτήν την περιοχή, είτε πρωτεϊνικά είτε γονιδιακά, μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα του ιού να προστατεύει το RNA του και να εισέρχεται σε νέα κύτταρα ξενιστές (Procházková, et al, 2020).

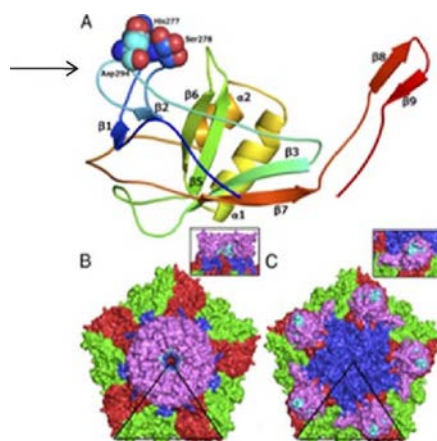
Σύμφωνα με τις έρευνες που διεξήχθησαν μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων X, η δομή του καψιδίου του ιού DWV, συγκροτείται από 4 καψιδιακές πρωτεΐνες VP1-VP4, με κυριότερες τις VP1, VP2 και VP3. Οι καψιδιακές αυτές πρωτεΐνες προέρχονται από τη διάσπαση μίας μεγάλης πολυπρωτεΐνης, όπου σχηματίζουν ένα πρωτομερές (protomers) στο οποίο οφείλεται η συμμετρία του καψιδίου. Ολόκληρο το καψίδιο αποτελείται από 60 τέτοια πρωτομερή, οργανωμένα σε 12 πενταμερείς μονάδες, με 5 πρωτομερή το καθένα (Skubník, et al, 2016). Άλλες έρευνες έχουν δείξει πως οι δομικές πρωτεΐνες του ιού, όχι μόνο παίζουν σημαντικό ρόλο στη μόλυνση και αναπαραγωγή του ιού, αλλά έχουν επίσης εξαιρετική ανοσογονικότητα και συχνά επιλέγονται ως υποψήφιος για την ανάπτυξη θεραπευτικών αντισωμάτων (Wang, 2017). Ακόμη, τα αποτελέσματα της κρυσταλλογραφίας έδειξαν ότι ο ιός μπορεί να σταθεροποιείται θερμοδυναμικά μεταξύ δύο δομών του καψιδίου, δίνοντας δύο χαρακτηριστικές μορφές στο καψίδιο, αυτή των στεμμάτων (εικόνα 8, A) και αυτή των ανοιχτών δομών (εικόνα 8, B) (Procházková, et al, 2020).



Εικόνα 8. Στα A, B απεικονίζεται η καψιδιακή επιφάνεια του DWV. A) Κλειστή δομή, B) Ανοιχτή δομή. (Procházková, et al.2020). C) Πρωτομερές καψιδίου (Skubník, et al.2016). Με μπλε χρώμα απεικονίζεται η VP1 καψιδιακή πρωτεΐνη, με κόκκινο η VP2, με πράσινο η VP3 και με ματζέντα ο P τομέας.

Μέσω της κρυσταλλογραφίας φαίνεται ότι η εναλλαγή του καψιδίου από την ανοιχτή δομή σε μια πιο κλειστή (αυτή των στεμμάτων), πραγματοποιείται χάρη στη μετακίνηση ενός μικρού πρωτεϊνικού παράγοντα, τον λεγόμενο P τομέα (p-domains)

(Karel, 2016). Ο τομέας αυτός είναι ένα σύμπλεγμα αμινοξέων, αποτελούμενος από 3 αυστηρώς συντηρημένα αμινοξέα Asp–His–Ser, με 5 επιπλέον μερικώς συντηρημένα κατάλοιπα υπολειμματικών αμινοξέων (Procházková, et al, 2020). Ωστόσο, η περαιτέρω κατανόηση της δομής του ιού δόθηκε από δύο ανεξάρτητες ομάδες, τους Škubník et al, και Organtini et al, οι οποίοι χρησιμοποίησαν κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπία και κρυσταλλογραφία ακτίνων X, για να προσδιορίσουν τη δομή του καψιδίου με ανάλυση 3–4 Å. Στα αποτελέσματά τους, έδειξαν επιπλέον πως αυτή η τρισδιάστατη δομή αλλάζει υπό διαφορετικές συνθήκες pH, ιδίως οι p-domains, οι οποίες είναι προεξέχουσες σφαιρικές προεκτάσεις των πρωτεϊνών του καψιδίου, που μπορούν να λειτουργούν ως καταλυτικοί τύποι για να διευκολύνουν την είσοδο του ιού στο κύτταρο του ξενιστή (Martin, et al, 2019). Ακόμη, η κίνηση του τομέα P μεταξύ των δύο εναλλακτικών θέσεων προσκόλλησης στην επιφάνεια του ιικού σωματιδίου περιλαμβάνει μια μετατόπιση 39 Å του κεντρικού ατόμου άνθρακα του κέντρου μάζας του και μια περιστροφή 145°, καθώς και πως η αλλαγή αυτή είναι εφικτή λόγω ενός συνδέτη 20-υπολειμμάτων αμινοξέων, που συνδέει τον τομέα P με τον πυρήνα της μεγαλύτερης κεντρικής πρωτεϊνικής υπομονάδας VP3 (Skubník, et al, 2016). Έτσι, οι επιστήμονες κατέληξαν πως είναι πιθανό κατά τη διάρκεια της εισόδου στο κύτταρο, ο τομέας P να λειτουργεί χωρίς να είναι σταθερός σε μια συγκεκριμένη θέση στην επιφάνεια του ιικού σωματιδίου (εικόνα 9).



Εικόνα 9. Α) Το βέλος δείχνει τη καταλυτική τριάδα του τομέα P, πάνω στο πρωτομερές του καψιδίου. Σε αυτή τη περίπτωση ο τομέας P είναι χρωματισμένος με μπλε χρώμα, ενώ με κόκκινο, πράσινο και κίτρινο απεικονίζονται οι VP3, VP1 και VP2 αντίστοιχα. Στα B, C, απεικονίζεται η εναλλαγή του καψιδίου από την κλειστή στην ανοιχτή δομή, χάρη στη μετακίνηση του τομέα P. Σε αυτή τη περίπτωση ο τομέας P απεικονίζεται με χρώμα ματζέντα, ενώ οι VP1, VP2 και VP3, απεικονίζονται με μπλε, πράσινο και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα (Skubník, et al, 2016).

Το γονιδίωμα

Το γενετικό υλικό του ιού DWV, ή αλλιώς το γονιδίωμα του, είναι ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας (ssRNA+), μεγέθους περίπου 10.140bp, το οποίο συνολικά κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη μεγέθους 2893 (de Miranda et al, 2010). Τα επιμέρους τμήματα του γονιδιώματος του ιού περιλαμβάνουν: την 5' μη κωδική περιοχή (5' untranslated region – 5'UTR) μήκους 1.167bp, το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame – ORF), την 3' μη κωδική περιοχή (3'untranslated region – 3'UTR) μήκους 308 bp και μια πολυαδενυλική ουρά (poly(A) –tract). Και οι δύο μη μεταφρασμένες περιοχές, εμπλέκονται στη ρύθμιση της αντιγραφής και της μετάφρασης του γονιδιώματος. Το νουκλεοτίδιο στο 5' άκρο της αλυσίδας RNA, συνδέεται ομοιοπολικά με μια μικρή, κωδικοποιούμενη από τον ιό πρωτεΐνη, τη VPg, η οποία πιστεύεται ότι συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό και στον εγκλεισμό του γονιδιώματος στο καψίδιο. Η ORF περιοχή κωδικοποιεί μια μεγάλη πολυπρωτεΐνη, η οποία στη συνέχεια θα διασπαστεί σε επιμέρους εξειδικευμένες πρωτεΐνες, όπου ο ιός θα χρησιμοποιήσει για να πραγματοποιήσει εξειδικευμένες λειτουργίες του κύκλου ζωής του (de Miranda, et al, 2010). Η δομική περιοχή του γονιδιώματος αντιστοιχεί στις δομικές πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται για την οργάνωση του καψιδίου, ενώ η μη δομική περιοχή αντιστοιχεί στις μη δομικές πρωτεΐνες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την αναπαραγωγή του γενετικού υλικού (εικόνα 10).

Όπως συμβαίνει και στους περισσότερους ιούς της οικογένειας των ιφλαϊών τύπου picorna έτσι και στο γονιδίωμα του DWV, στη 5' UTR βρίσκεται μια συμπληρωματική περιοχή των ριβοσωμάτων του ξενιστή, η οποία συνιστά την «εσωτερική θέση εισόδου των ριβοσωμάτων» (Internal Ribosome Entry Sight- IRES). Με το μηχανισμό αυτό, θεωρείται πως επιτρέπεται στους ιούς να αποφεύγουν να χρησιμοποιούν και ίσως να διαταράσσουν τον μηχανισμό μετάφρασης της CAP πολυμεράσης του mRNA του ξενιστή, ενώ ταυτόχρονα η μετάφραση που μεσολαβείται από την IRES περιοχή, απαιτεί λιγότερους παράγοντες μετάφρασης εν συγκρίσει με τη CAP (Reusche, et al, 2023). Αν και η IRES στον DWV δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη, μερικά βασικά τμήματα εντοπίστηκαν 300 νουκλεοτίδια αμέσως πριν την έναρξη του ORF. Η σειρά των γονιδίων είναι τυπική για τους ιφλαϊούς του τύπου picorna, με τη δομική περιοχή στην αρχή του ORF προς το 5' άκρο και τη μη δομική περιοχή προς το 3' άκρο. Κατά σειρά προς το 5' άκρο πριν τη δομική περιοχή βρίσκεται το γονίδιο που κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο που δρα ως πρωτεΐνη Leader (Leader protein Lp), ενώ με το πέρας της δομικής περιοχής προς το 3' άκρο βρίσκεται το γονίδιο της VPg πρωτεΐνης (de Miranda, et al, 2010).



Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση του γονιδιώματος του DWV. Με μπλε αποχρώσεις απεικονίζεται η καψιδιακή περιοχή, ενώ με πράσινο η δομική περιοχή. Η επάνω γραμμή αναγράφει πληροφορίες της εκάστοτε περιοχής στη συνολική πολυπρωτεΐνη (Fei, et al, 2019).

Ωστόσο, αν και η σειρά των γονιδίων της μη δομικής περιοχής είναι επακριβώς χαρακτηρισμένη από διάφορες μελέτες, βιβλιογραφικά παρατηρείται πως δεν υπάρχει ακρίβεια και συνοχή στις έρευνες σχετικά με το καθορισμό των επιμέρους γονιδίων όλου του γονιδιώματος μέχρι σήμερα (Salkova et al, 2024), ιδιαίτερα με τη σειρά των γονιδίων της καψιδιακής δομικής περιοχής να παραμένει ανακριβής. Πιο συγκεκριμένα, η μη δομική περιοχή, φαίνεται να οργανώνεται κατά σειρά από τα γονίδια: της ελικάσης (3B), του γονιδίου της VPg, της πρωτεάσης (3C) και μιας RNA εξαρτώμενη πολυμεράσης αποκαλούμενη ως RdRp ή 3D. Από την άλλη μεριά, μέσω βιβλιογραφικής ανασκόπησης παρατηρείται ότι οι επιστήμονες δεν βασίζονται σε μια γονιδιακή σειρά των γονιδίων του καψιδίου. Αντιθέτως, οι επιστήμονες πραγματεύονται μεταξύ τριών διαφορετικών μοτίβων ως προς τη σειρά των δομικών περιοχών, όπου είναι τα εξής: VP2-VP4-VP1-VP3 (Lanzi 2006, Yunfei 2021), VP3-VP4-VP1-VP2 (Fei, 2019), VP2-VP4-VP3-VP1 (de Miranda, 2022).

Μη δομική περιοχή του γονιδιώματος

Η μη δομική περιοχή κωδικοποιεί τις μη δομικές πρωτεΐνες, που είναι σημαντικές για την αναπαραγωγή του ιού και συγκεντρώνονται στις κυτταρικές μεμβράνες κατά τη διάρκεια της ιογενούς αναπαραγωγής. Από το γονιδίωμα του DWV κωδικοποιούνται τρεις βασικές μη δομικές πρωτεΐνες, η ελικάση 3B, η πρωτεάση 3C και η πολυμεράση 3D ή αλλιώς η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp) (Reuscher, et al, 2023).

Η 3B RNA ελικάση, είναι υπεύθυνη για την αποσύνθεση οποιουδήποτε προσωρινού διπλού κλώνου RNA, διατηρώντας το RNA σε μονόκλωνη μορφή. Αυτή η διαδικασία είναι σημαντική για την αναπαραγωγή του γονιδιώματος, καθώς με αυτό τον τρόπο η πολυμεράση είναι χωρικά ελεύθερη να προσθέσει συμπληρωματικές βάσεις και να αντιγράψει ολόκληρο το γονιδίωμα. Ωστόσο, βιβλιογραφικά αναφέρεται πως, οι πιο σημαντικές μη δομικές πρωτεΐνες είναι οι 3C πρωτεάση και η RdRp πολυμεράση, καθώς εκτελούν κρίσιμες λειτουργίες που σχετίζονται με την ιογενή αναπαραγωγή (Lanzi, et al, 2006).

Η 3C πρωτεάση χαρακτηρίζεται ως αυτοκαταλυτική, μπορεί να ενεργοποιήσει και να εκτελέσει αυτο-αποκοπή, δηλαδή να αποκόψει τμήματα της πρωτεΐνης αλυσίδας από την οποία προέρχεται (Danko, 2010), ενώ είναι υπεύθυνη για την αποτελεσματική διαίρεση της πολυπρωτεΐνης που παράγεται από τη μετάφραση του γονιδιώματος σε λειτουργικές πρωτεΐνες (Reuscher, et al, 2023). Αυτό είναι απαραίτητο για την ιογενή αναπαραγωγή και τη λειτουργία των ιογενών πρωτεϊνών (Danko, 2010). Ακόμη, εκτός από την απαραίτητη διάσπαση των ικών πολυπεπτιδίων, οι διάφορες πρωτεάσες 3C διασπούν επίσης πολλαπλές κυτταρικές πρωτεΐνες-στόχους για να χειριστούν το κύτταρο-ξενιστή. Γνωστοί κυτταρικοί στόχοι των 3C περιλαμβάνουν παράγοντες που εμπλέκονται στη μεταγραφή, τη μετάφραση και τη μεταφορά μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος. Η 3C τροποποιεί τον μεταβολισμό ώστε να δοθεί προτεραιότητα στη μετάφραση των ικών γονιδιωμάτων μέσω των στοιχείων IRES. Τα μη επεξεργασμένα μόρια πρόδρομου που

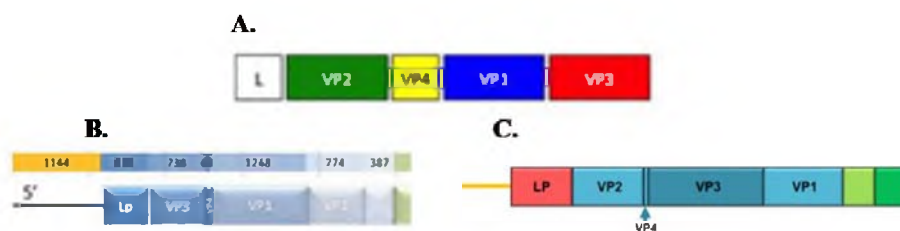
αποτελούνται από την πρωτεάση 3C και την RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp, 3D) έχουν αποδειχθεί απαραίτητα για την έναρξη της σύνθεσης RNA και έχουν χαρακτηριστεί ως πρωτεολυτικά ενεργά. Με βάση τις ομοιότητες αλληλουχίας αμινοξέων και τις εντυπωσιακές ομοιότητες δευτεροταγούς δομής, έχουν βρεθεί συγκρίσιμες πρωτεάσες κυστεΐνης τύπου 3C (3CL) σε όλους τους ιούς Picornavirales, συμπεριλαμβανομένων των iflaviruses (Reuscher, et al, 2023).

Η πολυμεράση 3D ή αλλιώς η RdRp, είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του γενετικού υλικού του ιού RNA. Πιο συγκεκριμένα, το ένζυμο χρησιμοποιεί το ιικό RNA ως πρότυπο για να συνθέσει νέα αντίγραφα του πρωταρχικού τμήματος, τα οποία στη συνέχεια χρησιμοποιούνται ως νέα πρωταρχικά τμήματα γενετικού υλικού για τη δημιουργία νέων ιικών σωματιδίων. Η RdRp, όπως και άλλες ιικές RNA πολυμεράσες, δεν έχει τόσο αποτελεσματικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης λαθών όσο οι DNA πολυμεράσες. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένο ποσοστό μεταλλάξεων στο RNA του ιού, γεγονός που συμβάλλει στην ταχεία εξέλιξη και την προσαρμογή του (Liu, et al, 2016).

Δομική περιοχή του γονιδιώματος

Η δομική περιοχή του γονιδιώματος του DWV, βρίσκεται στην αρχή της ORF και η κωδικοποίηση αυτής μετά τη μετάφραση του γενετικού υλικού, οφείλεται για το σχηματισμό των καψιδιακών πρωτεϊνών. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, βιβλιογραφικά παρατηρείται πως δεν υπάρχει ακρίβεια και συνοχή στις έρευνες, με τη σειρά όλων των γονιδίων του γονιδιώματος να μην είναι ακριβής μέχρι σήμερα (Salkova, et al, 2024). Συγκεκριμένα, ως προς τη σειρά των καψιδιακών περιοχών, οι επιστήμονες πραγματεύονται μεταξύ τριών διαφορετικών μοτίβων, όπου είναι τα εξής: VP2-VP4-VP1-VP3 (Lanzi, 2006, Yunfei, 2021), VP3-VP4-VP1-VP2 (Fei, 2019), VP2-VP4-VP3-VP1 (de Miranda, 2019, 2022).

Ανάμεσα στα τρία διαφορετικά μοτίβα των δομικών περιοχών (εικόνα 11), μεταξύ των επιστημών συμφωνείται πως η VP4 περιοχή βρίσκεται δεύτερη κατά σειρά στο γονιδίωμα, αλλά και πως η τρίτη κατά σειρά περιοχή αντιστοιχεί στη μεγαλύτερη καψιδιακή πρωτεΐνη. Αν και τα δύο από τα τρία μοτίβα συμφωνούν πως η πρωτεΐνη αυτή και κατ' επέκταση το αντίστοιχο γονίδιο αντιστοιχούν στη VP1, το τρίτο μοτίβο βασίζεται στη VP3 ως μεγαλύτερη πρωτεΐνη, ενώ η VP1 τοποθετείται τελευταία κατά σειρά των δομικών περιοχών.



Εικόνα 11. Τα τρία διαφορετικά μοτίβα της καψιδιακής περιοχής: A) VP2-VP4-VP1-VP3 (Organtini, et al, 2017), B) VP3-VP4-VP1-VP2 (Fei, et al, 2019), C) VP2-VP4-VP3-VP1 (de Miranda, et al, 2022).

Η VP1 καψιδιακή πρωτεΐνη.

Στους περισσότερους ιούς της οικογένειας Iflaviridae, η VP1 είναι η μεγαλύτερη από τις καψιδιακές πρωτεΐνες και συχνά βρίσκεται στην επιφάνεια του καψιδίου. Ο ρόλος της είναι να αλληλεπιδρά με τα κύτταρα στόχους, γεγονός που αποτελεί μια λειτουργία για το πρώτο βήμα της μόλυνσης. Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη VP1 είναι κρίσιμη για τη διαδικασία αναγνώρισης του κυττάρου ξενιστή και για την πρόσδεση του ιού στους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης (Liu, et al, 2016). Το 2006 πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά χαρτογράφηση των πρωτεϊνών του καψιδίου και έγινε μία πρώτη εκτίμηση του μοριακού τους βάρους (Lanzi, et al, 2006). Οι θεωρητικές αυτές τιμές που προέκυψαν, επιβεβαιώθηκαν μεταγενέστερα από μια ξεχωριστή ομάδα ερευνητών, οι οποίοι χαρτογράφησαν πρωτεϊνικά όλο το γονιδίωμα του ιού (Organtini, et al, 2017). Τα αποτελέσματα των ερευνών δείχνουν πως η μεγαλύτερη πρωτεΐνη είναι η VP1 με θεωρητική τιμή μεγέθους 44 kDa, ενώ ακολουθούν κατά ελαττώμενο βάρος η VP3, ύστερα με μικρή διαφορά η VP2 και τέλος με πολύ χαμηλό απροσδιόριστο βάρος η VP4. Ακόμη, το μεγάλο μέγεθος της VP1 είναι ασυνήθιστο μεταξύ των ιφλαϊών και των σχετικών ιών τύπου icosona, των οποίων τα ομόλογα της VP1 του DWV δεν ξεπερνούν τα 35 kDa και συχνά είναι πολύ μικρότερα. Η συγκριτική ανάλυση αυτών των πρωτεϊνών δείχνει ότι τα επιπλέον αμινοξέα στην VP1 του DWV βρίσκονται κυρίως στο C-τερματικό τμήμα της πρωτεΐνης, ενώ τα πιο ισχυρά συντηρημένα πρωτεϊνικά πεδία βρίσκονται στο μέσο του N-τερματικού μισού της πρωτεΐνης (Lanzi, et al, 2006). Οι ερευνητές βασίζονται στην ίδια σειρά των γενομικών περιοχών της καψιδιακής περιοχής, σύμφωνα με το μοτίβο: VP2-VP4-VP1-VP3.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, παρατηρήθηκε κρυσταλλογραφικά πως ο ιός σταθεροποιείται σε μία τρισδιάστατη δομή (T3 icosahedral), μέσω δύο διαφορετικών μορφών, μεταξύ της ανοιχτής και μιας πιο κλειστής μορφής (ανοιχτή δομή / δομή στεμμάτων) (Martin, 2019). Οι όροι «ανοιχτή και κλειστή» αναφέρονται στην έκθεση ή όχι της μεγαλύτερης καψιδιακής πρωτεΐνης, όπου οι ερευνητές θεωρούν πως είναι η VP3, πάνω στη οποία μετακινείται ο τομέας P (Skubník, et al, 2016). Σε μεταγενέστερες έρευνες της δομής του καψιδίου μέσω κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (Skubník, et al, 2016) και κρυσταλλογραφίας ακτίνων X (Organtini, et al, 2017), αναφέρεται πως η μετακίνηση του P τομέα διευκολύνει την είσοδο του ιού

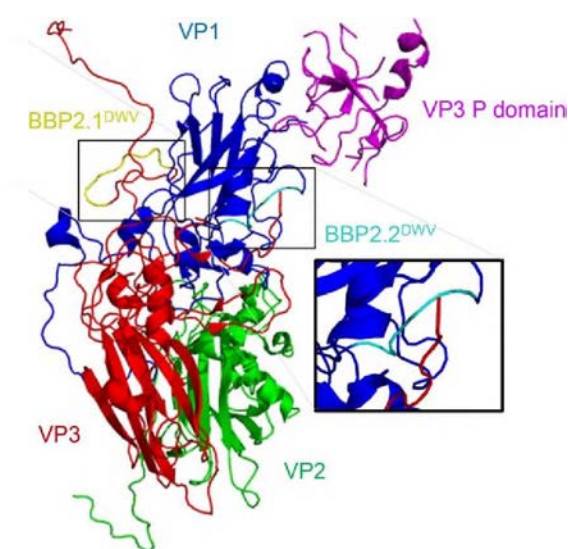
στο κύτταρο (Martin, et al, 2019), δηλαδή η μετακίνηση του τομέα πραγματοποιείται προκειμένου να εκτεθεί περισσότερο το σημείο πρόσδεσης με τον υποδοχέα, ενώ είναι γνωστό πως η έκθεση των ιών σε όξινο pH, που προσομοιώνει τις συνθήκες στα ενδοσώματα, ενεργοποιεί την απελευθέρωση του γονιδιώματός τους (Procházková, et al, 2020).

Η απάντηση δόθηκε από μεταγενέστερη μελέτη μιας ξεχωριστής ομάδας ερευνητών, η οποία αναφέρει πως η μετακίνηση του P τομέα πραγματοποιείται πάνω στη VP1 περιοχή (Wu, et al, 2021). Συγκεκριμένα, οι ερευνητές δημιούργησαν αντισώματα σε *in vitro* συστήματα με σκοπό να παρακολουθήσουν τη μόλυνση. Πιο αναλυτικά, φάνηκε πως η κάλυψη του P-τομέα της VP1 με αντίσωμα αναστέλλει τη μόλυνση από τον DWV, χωρίς όμως να επηρεάζει την είσοδο του ιού στο κύτταρο ξενιστή (Wu, et al, 2021). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ο P-τομέας δεν φαίνεται να συνδέεται με τον ιικό υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου και πως είναι πιθανό να είναι απαραίτητος για την απελευθέρωση του γονιδιώματος RNA στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου του ξενιστή μετά την είσοδο του ιού. Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, προτάθηκε ότι ο P-τομέας περιέχει καταλυτικά αμινοξέα λιπάσης, πρωτεάσης και εστεράσης, και για το λόγο αυτό υφίσταται μεγάλη διαμόρφωση υπό συνθήκες χαμηλού pH όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Organtini, et al, 2017, Skubnik, et al, 2017). Επίσης, ο ιός DWV μπορεί να μολύνει τον ξενιστή μέσω φαγοκυττάρωσης. Για την ακρίβεια, ο P-τομέας δημιουργεί ένα πόρο στη μεμβράνη του κυττάρου για να απελευθερωθεί το γονιδίωμα RNA στο κυτταρόπλασμα, προκειμένου να ακολουθήσει η μετάφραση του (Wu, et al, 2021). Οι ερευνητές ως γενετική σειρά των δομικών περιοχών ακολούθησαν ως πρωτεϊνικό μοτίβο το: VP2-VP4-VP1-VP3.

Προς διερεύνηση του τρόπου μόλυνσης του ιού, σε πρόσφατη μελέτη του 2025, οι ερευνητές δημιούργησαν συνθετικά πεπτίδια στην επιφάνεια του καψιδίου του ιού, προκειμένου να παρακολουθήσουν και να παρεμποδίσουν τη διοχέτευση της μόλυνσης (Guo, et al, 2025). Συγκεκριμένα, τροποποίησαν πεπτίδια των πρωτεϊνών VP1 και VP3 με παρόμοια συνθετικά, με στόχο την παρεμπόδιση της διοχέτευσης του ιού από το μέσο έντερο των εντόμων μετά τη μόλυνση. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν μια συσσώρευση του ιού στο κεντρικό έντερο των μελισσών και έντονη μείωση στα ποσοστά διάχυσης του ιού. Στα αποτελέσματά τους οι ερευνητές εναποθέτουν τη μόλυνση κυρίως στη VP3 καψιδιακή πρωτεΐνη, ενώ παράλληλα τονίζουν τη σημαντικότητα της VP1 πρωτεΐνης και της ORF περιοχής γύρω από τη μόλυνση, χωρίς όμως να διασαφηνίζεται ο ρόλος τους. Στη συγκεκριμένη μελέτη, η πρωτεϊνική αλληλουχία που παρουσιάζεται ακολουθεί το μοτίβο VP2-VP3-VP1, ενώ επισημαίνεται πως ο τομέας P είναι αμινοξική αλληλουχία της VP3 πρωτεΐνης. Για την ακρίβεια, μέσω της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών κατά την είσοδο του ιού στο κύτταρο, ο τομέας P με ένα τμήμα της πρωτεΐνης VP3, δεν συμμετέχουν στην αναδίπλωση, αλλά εκτείνονται προς την επιφάνεια του καψιδίου και τελικά ευθύνονται για την πρόσδεση με τον υποδοχέα (εικόνα 12) (Guo, et al, 2025). Το γεγονός αυτό απαντά σε προγενέστερη μελέτη, όπου οι ερευνητές μέσω της κατασκευής αντισωμάτων για τμήμα της VP1 και τον P τομέα, δεν κατάφεραν να

παρεμποδίσουν τη διοχέτευση της μόλυνσης στα κεφάλια και το θώρακα των μελισσών, υπογραμμίζοντας παράλληλα τη σημαντικότητα της περιοχής VP1-P για τη λειτουργικότητα της RdRp και τη διαδικασία της αναπαραγωγής του ιού. Οι ερευνητές παρουσίασαν ως καψιδιακή πρωτεϊνική σειρά τη: VP2-VP1-VP3, με τον P τομέα να βρίσκεται πάνω στη VP1 πρωτεΐνη (Wu, et al, 2021). Από τα αποτελέσματα αυτά των ερευνών, παρατηρείται ότι κατά την επεξεργασία των καψιδιακών πρωτεϊνών σε βασικές συνθήκες pH, ο ιός παίρνει τη κλειστή του μορφή (αυτή των στεμμάτων), με τη σειρά των καψιδιακών πρωτεϊνών να ακολουθείται από το μοτίβο VP2-VP1-VP3 (Wu, et al, 2021), ενώ σε όξινες συνθήκες pH, ο ιός παίρνει την ανοιχτή μολυσματική του μορφή, με τις καψιδιακές πρωτεΐνες να εμφανίζονται κατά σειρά: VP2-VP3-VP1 (Guo, et al, 2025).

Αν και οι επιστήμονες συμφωνούν πως κατά τη μόλυνση η VP1 πρωτεΐνη εμφανίζεται στην επιφάνεια του καψιδίου, τα τελευταία αποτελέσματα δείχνουν πως το σημείο πρόσδεσης πιθανότατα βρίσκεται στη VP3 πρωτεΐνη, δεν εμπλέκεται στην αναδίπλωση των υπόλοιπων καψιδιακών πρωτεϊνών, αλλά μετακινείται μαζί με τον τομέα P προς την επιφάνεια του καψιδίου έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η πρόσδεση με τον υποδοχέα του κυττάρου. Οι επιστήμονες επισημαίνουν πως απαιτείται περαιτέρω έρευνα γύρω από τις περιοχές που εμπλέκονται στη μόλυνση, τη VP1, τη VP3 και τον P τομέα (Guo, et al, 2025).

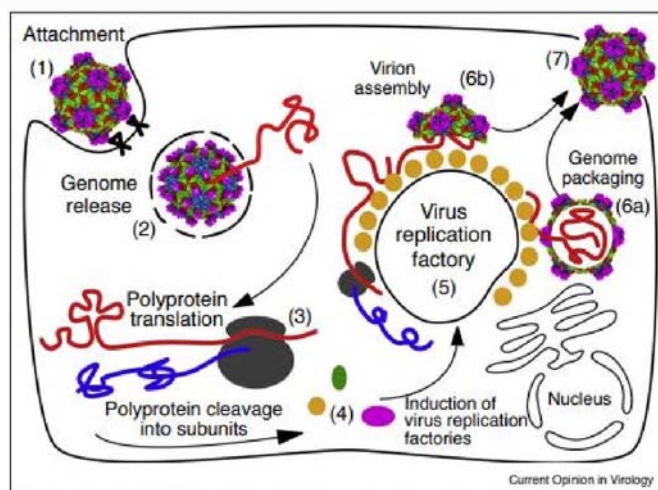


Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση της αναδίπλωσης των καψιδιακών πρωτεϊνών του DWV για την επίτευξη της μόλυνσης, παρουσία συνθετικών υλικών. Η VP1 είναι χρωματισμένη με μπλε χρώμα, η VP2 με πράσινο και η VP3 με κόκκινο, ενώ τμήμα αυτής που συμμετέχει στη μετακίνηση του P τομέα και στη πρόσδεση με τον υποδοχέα είναι χρωματισμένη με ματζέντα. Το BBP2.1 μοιάζει με τη VP3 πρωτεΐνη και το BBP2.2 με τη VP1 πρωτεΐνη (Guo, et al, 2025) .

1.3.4. Ο ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ

Ο κύκλος ζωής ενός ιού αναφέρεται στη σειρά των βιολογικών και μοριακών διεργασιών μέσω των οποίων ένας ιός προσκολλάται σε ένα κύτταρο-ξενιστή, διεισδύει σε αυτό, απελευθερώνει το γενετικό του υλικό, αξιοποιεί τον κυτταρικό μηχανισμό για τη σύνθεση ιικών συστατικών, συναρμολογεί νέα ιικά σωματίδια και τελικά απελευθερώνεται από το κύτταρο, προκαλώντας συνήθως κυτταρική λύση ή εκβλάστηση. Η αλληλεπίδραση με τον ξενιστή και οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται μπορεί να διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με τον τύπο του ιού και τον ξενιστή. Η κατανόηση της μοριακής βιολογίας των ιών των μελισσών είναι περιορισμένη, καθώς δεν υπάρχουν σταθερές κυτταρικές σειρές από ιστούς μελισσών που να υποστηρίζουν τον πολλαπλασιασμό τους. Παρ' όλα αυτά, θεωρείται ότι οι κύκλοι μόλυνσης των ιών των μελισσών είναι παρόμοιοι με αυτούς των καλύτερα μελετημένων συγγενών τους από την οικογένεια των Iflavirus (Procházková, et al, 2020).

Τα βασικά βήματα της πορείας του ιού των παραμορφωμένων φτερών (*Deformed Wing Virus*, DWV) από τη στιγμή της μόλυνσης περιλαμβάνουν: την αναγνώριση και τη δέσμευση σε υποδοχείς των κυττάρων του ξενιστή (συνήθως γλυκοπρωτεΐνες ή γλυκολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης), τον σχηματισμό του συμπλόκου δέσμευσης με τους υποδοχείς των κυττάρων, την είσοδο του ιού στο κύτταρο του ξενιστή, την αποδέσμευση συμπλόκου με το υποδοχέα και την απελευθέρωση του γενετικού υλικού (Procházková, et al, 2020). Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στην εικόνα 13, ο κύκλος ζωής του ιού ξεκινά με τη σύνδεση ενός σημείου πρόσδεσης του ιικού καψιδίου στον υποδοχέα της επιφάνειας της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων των μελισσών (1) και την επακόλουθη είσοδο του ιού και απελευθέρωση του γονιδιώματος του στο κυτταρόπλασμα (2). Η είσοδος του ιού στο κύτταρο μπορεί να γίνει είτε μέσω εκλεκτικής σύνδεσης με τον υποδοχέα, είτε μέσω ενδοκυττάρωσης. Το μονόκλωνο θετικής πολικότητας RNA μεταφράζεται άμεσα από τα κυτταρικά ριβοσώματα σε μια μεγάλη πολυπρωτεΐνη (3) μέσω της IRES περιοχής, η οποία στη συνέχεια υφίσταται πρωτεολυτική επεξεργασία σε επιμέρους λειτουργικές εξειδικευμένες πρωτεΐνες μέσω της ιικής 3C αυτοκαταλυτικής πρωτεάσης. Μεταξύ αυτών, η RNA-εξαρτώμενη RNA-πολυμεράση RdRp, απεικονισμένη με πορτοκαλί κύκλο, διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην αναπαραγωγή του ιού, ενώ παράλληλα απελευθερώνεται η 3C πρωτεάση και η 3B ελικάση (4). Η πολυμεράση, σε συνεργασία με άλλες μη δομικές ιικές πρωτεΐνες, επάγει την αναδιοργάνωση των ενδοκυττάρων μεμβρανών και τον σχηματισμό των εργοστασίων αναπαραγωγής του ιού (*virus replication factories*) (5), όπου συντελείται η σύνθεση νέων ιικών γονιδιωμάτων. Παράλληλα, οι καψιδιακές πρωτεΐνες συναρμολογούνται σε πενταμερή και κατόπιν σε ολοκληρωμένα ιικά καψίδια (6a–6b), τα οποία ενσωματώνουν το νέο γονιδίωμα μέσω ειδικών μηχανισμών συσκευασίας. Η ολοκλήρωση της ιογένεσης οδηγεί στην απελευθέρωση των νέων ιικών σωματιδίων με επακόλουθη έξοδο του ιού από το κύτταρο του ξενιστή (7), επιτρέποντας την εξάπλωση της λοίμωξης σε γειτονικά κύτταρα (Procházková, et al, 2020).



Εικόνα 13. Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής του DWV. 1) Ο ιός εισέρχεται στο κύτταρο είτε μέσω πρόσδεσης με τον υποδοχέα, είτε μέσω φαγοκυττάρωσης, 2) απελευθερώνει το γενετικό του υλικό (κόκκινη λωρίδα), 3) στη πάνω υπομονάδα του ριβοσώματος το γενετικό υλικό μεταφράζεται απευθείας σε πολυπρωτεΐνη, ενώ στη κάτω υπομονάδα του ριβοσώματος πραγματοποιείται πρωτεολυτική διάσπαση της πολυπρωτεΐνης σε, 4) επιμέρους λειτουργικές πρωτεΐνες (με πορτοκαλί χρώμα απεικονίζεται η RdRp, με πράσινο η 3C και με ματζέντα η VPg πρωτεΐνη. 5) Εργαστάσιο παραγωγής νέων ιικών σωματιδίων. 6) Τα νεοσυντιθέμενα ιικά σωματίδια σχηματίζονται είτε από τον εγκλεισμό του γονιδιώματος σε κενούς καψιδιακούς χώρους (6a), είτε σχηματίζοντας τις καψιδιακές του πρωτεΐνες γύρω από το γονιδίωμα του (6b), προκαλώντας έτσι τη καψιδίωση του και 7) την επακόλουθη έξοδο του ιού από το κύτταρο για την εξάπλωση της μόλυνσης (Procházková, et al, 2020).

1.3.5. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Παλαιότερες έρευνες έχουν δείξει ότι ιός των παραμορφωμένων φτερών (*Deformed Wing Virus*, DWV) δεν έχει ένα συγκεκριμένο γονότυπο, αλλά πως είναι ένα ιογενές σύμπλεγμα που περιλαμβάνει τουλάχιστον τρεις διακριτούς γονότυπους ή κύριες παραλλαγές του ιού, εμφανιζόμενος μεταξύ των A, B και C στελεχών. Ο αρχικός γονότυπος του ιού ταυτίζεται με αυτόν του ιού Kakugo, ο οποίος μετέπειτα μετονομάστηκε ως A τύπος του DWV, ενώ μέχρι το 2019 αναφέρεται ως η κύρια παραλλαγή του ιού (Martin, et al, 2019). Το στέλεχος DWV-B, ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά στο άκαρι το 2001 και θεωρήθηκε ότι ήταν ένας ιός που μεταδιδόταν μόνο μέσω των ακάρεων. Αρχικά ονομαζόταν ως *Varroa Destructor virus-1* (VDV-1), ενώ μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι το VDV-1 είναι ένα κύριο στέλεχος του DWV. Το DWV-C ανακαλύφθηκε σε δείγματα μελισσών το 2007 και συνδέθηκε άμεσα με το DWV-A, για τον θάνατο των αποικιών κατά τη διάρκεια του χειμώνα, κατά την οποία οι πληθυσμοί των ακάρεων ελέγχθηκαν σε χαμηλά επίπεδα (Martin et al, 2019).

1.3.5.1. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΑΚΑΡΕΟΣ *Varroa destructor*

Ο ιός των παραμορφωμένων φτερών (*Deformed Wing Virus*, DWV) αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που απειλούν την υγεία των μελισσών παγκοσμίως. Η εξάπλωσή του έχει συνδεθεί άμεσα με την παρουσία του εξωπαρασιτικού ακάρεος *Varroa destructor*, το οποίο έχει τροποποιήσει ριζικά τη δυναμική του ιού (Martin, et al, 2001).

Εξάπλωση του ιού

Υπό φυσιολογικές συνθήκες απουσία του ακάρεος, ο ιός *Deformed Wing Virus* (DWV), μεταδίδεται με σχετικά χαμηλή αποδοτικότητα μέσω σωματικής επαφής ή μέσω μόλυνσης κατά την ανάπτυξη της κυψέλης. Ωστόσο, η είσοδος του *Varroa destructor* στο οικοσύστημα των μελισσών προσέφερε έναν πιο αποδοτικό μηχανισμό μετάδοσης (Martin, et al, 2001).

Το άκαρι, κατά τη διάρκεια της διατροφής του εγχέει ιικά σωματίδια απευθείας στην αιμολémie, παρακάμπτοντας τους φυσικούς φραγμούς του ανοσοποιητικού συστήματος της μέλισσας, με αποτέλεσμα να λειτουργεί ως "μηχανικός φορέας" αλλά και ως "ενισχυτής" της λοίμωξης (Rosenkranz, et al, 2010). Πιο συγκεκριμένα, όταν το άκαρι τρέφεται από την αιμολémie της μέλισσας, τραυματίζει τους ιστούς και συγχρόνως εισάγει τεράστιο αριθμό ιικών σωματιδίων απευθείας στην κυκλοφορία του αίματος των εντόμων, παρακάμπτοντας τους φυσικούς φραγμούς της ανοσολογικής άμυνας των μελισσών. Έτσι, η λοίμωξη εγκαθίσταται γρηγορότερα και με μεγαλύτερη σφοδρότητα (Martin, 2001). Ακόμη, το άκαρι προκαλεί χρόνια αιμορραγία και αφαίμαξη πόρων από τις μέλισσες, με αποτέλεσμα την εξασθένηση και την πιθανή καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος των εντόμων. Η καταπόνηση των μελισσών διευκολύνει την ανεξέλεγκτη αναπαραγωγή του ιού μέσα στον οργανισμό τους, αυξάνοντας τα ιικά φορτία σε επικίνδυνα επίπεδα (de Miranda and Genersch, 2010). Τέλος και συνδυαστικά με παραπάνω, με την παρουσία του *Varroa* στελέχου του DWV που είναι πιο επιθετικά, αναπαράγονται ταχύτερα και μεταδίδονται ευκολότερα, επιδεινώνοντας την παθογένεια της λοίμωξης (Rosenkranz, et al, 2010). Έτσι, το *Varroa* "ενισχύει" έμμεσα και την εξέλιξη του ιού προς πιο λοιμογόνες μορφές του (Martin, et al, 2012).

Ποικιλομορφία γονιδιώματος

Η γονιδιακή ποικιλομορφία του ιού των παραμορφωμένων φτερών (*Deformed Wing Virus*, DWV) αποτελεί κρίσιμο παράγοντα στην παθογένεια και την εξάπλωσή του στον πληθυσμό των μελισσών *Apis mellifera*.

Ως ιός με RNA θετικής πολικότητας (plus-strand RNA virus), ο DWV σχηματίζει τα λεγόμενα «quasi-species» μέσα στο κύτταρο του ξενιστή. Συγκεκριμένα, λόγω της σφαλματώδους αντιγραφής του RNA, δημιουργείται μια συλλογή από ποικιλόμορφα γονιδιώματα, συγκεντρωμένα γύρω από μία κεντρική (consensus) αλληλουχία (Barth,

et al, 2024). Ακόμη, η ποικιλομορφία του ιού ενισχύεται κυρίως από τον υψηλό ρυθμό μεταλλάξεων στο RNA του γονιδιώματος, ο οποίος είναι χαρακτηριστικός των RNA ιών, καθώς και από την ικανότητά του να υφίσταται γενετικούς ανασυνδυασμούς, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις συνλοίμωξης (Wilfert, et al, 2016). Το γεγονός αυτό οδηγεί στη συνεχή δημιουργία νέων γενετικών παραλλαγών.

Πιο αναλυτικά, από έρευνα του 2011 είναι γνωστό ότι, η αυξημένη γενετική παραλλακτικότητα του ιού έγκειται κυρίως σε αποικίες αυξημένης παρουσίας του ακάρεος *Varroa destructor* (Moore, et al, 2011). Ο παρασιτισμός από το άκαρι *Varroa* έχει συμβάλει σημαντικά στην αύξηση της ποικιλομορφίας του ιού, δρώντας ως φορέας και επιλεκτικός παράγοντας, ενισχύοντας την επικράτηση πιο παθογόνων στελεχών (Martin, et al, 2012). Συγκεκριμένα, μελέτη διερεύνησης του ρόλου του ακάρεος *Varroa destructor* προς τη μετάδοση και την επικράτηση ενός πιο παθογόνου στελέχους του DWV, διαπιστώθηκε ότι η μετάδοση του ιού μέσω του *Varroa* ή *in vitro* οδηγεί στην επικράτηση ενός πιο παθογόνου στελέχους του DWV, υποδεικνύοντας ότι ενισχύονται συγκεκριμένα στελέχη του ιού (Ryabov, et al, 2014). Επιπλέον, σε έρευνα της δυναμικής της εξέλιξης του DWV σε αποικίες μελισσών στις Ηνωμένες Πολιτείες, οι επιστήμονες υποδεικνύουν ότι το άκαρι μπορεί να συμβάλλει στην εξέλιξη και την ανταγωνιστικότητα διαφορετικών στελεχών του ιού. Για την ακρίβεια, μέσω της ανάλυσης των ανασυνδυασμών μεταξύ στελεχών DWV-A και B, δείχνουν πως το *Varroa* μπορεί να λειτουργεί ως "μικτή δεξαμενή" για τους ανασυνδυασμούς μεταξύ των τύπων του ιού (Ryabov, et al, 2019). Ακόμη, αναφέρεται πως το άκαρι *Varroa* δρα όχι μόνο ως φορέας, αλλά και ως επιλεκτικός παράγοντας (selective agent) που επιτρέπει την επικράτηση ορισμένων γενότυπων του ιού, όπως ο DWV-B (Evans, et al, 2020). Επιπλέον, εφόσον μεταδίδει τον ιό απευθείας στην αιμολέμφο της μέλισσας (παρακάμπτοντας τους φυσικούς φραγμούς του εντέρου), αυξάνονται οι πιθανότητες για συνλοίμωξη με διαφορετικά στελέχη, γεγονός που ενισχύει τις ευκαιρίες ανασυνδυασμού και άρα τη γενετική διαφοροποίηση (Evans, et al, 2020). Η εκτεταμένη γονιδιακή ποικιλομορφία του DWV έχει αποτελέσει αντικείμενο πληθώρας μελετών που αξιοποιούν φυλογενετικές αναλύσεις για τη διερεύνηση της εξέλιξης και της παγκόσμιας διασποράς του ιού (Menamin, et al, 2018).

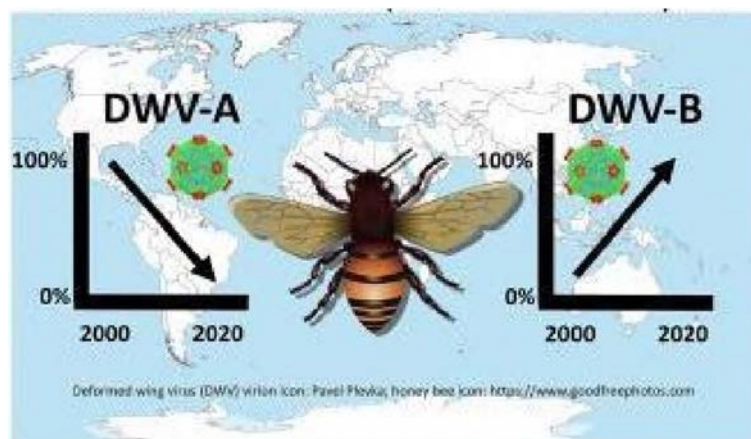
Τέλος, έχει προταθεί ότι η συνδυασμένη καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος των μελισσών τόσο από το άκαρι όσο και από τον ιό συμβάλλει στην αύξηση της παθογένειας του DWV. Σε πρόσφατη έρευνα του 2025, αναφέρεται πως η μετάδοση του DWV μέσω του *V. destructor* έχει επίσης συνδεθεί με την αύξηση της γενετικής ποικιλομορφίας του ιού και μάλιστα με αυξημένο ιικό φορτίο στις αποικίες και στις κεφαλές μεμονωμένων μελισσών, γεγονός που υποδηλώνει την επικράτηση των καλύτερα προσαρμοσμένων ιογενών στελεχών, σε αυτό το νέο περιβάλλον αλληλεπίδρασης ξενιστή-παθογόνου-φορέα (Sircoulomb, et al, 2025).

Στην Ελλάδα ο DWV ανιχνεύτηκε πρώτη φορά σε μέλισσα της Πελοποννήσου το 2010 (Bacandritsos, et al, 2010), ενώ το 2018 πραγματοποιήθηκε ανίχνευση ενός ανασυνδυασμένου στελέχους από δείγματα αποικιών μελισσών της Βόρειας Ελλάδας

(Goras et al, 2018). Πιο συγκεκριμένα, οι ερευνητές πιστοποιούν για πρώτη φορά ανασυνδυασμό στην RdRp γενωμική περιοχή, επισημαίνοντας πως ο ανασυνδυασμός προέκυψε προς το 5' άκρο της περιοχής, μεταξύ ενός στελεχούς από την Ιταλία και ενός από το Βιετνάμ (Goras et al, 2018). Σε πρόσφατη έρευνα του 2025 αναφέρεται ότι στα δείγματα από τη Βόρεια Ελλάδα ανιχνεύονται και οι δύο τύποι του ιού, DWV-A και DWV-B, με τον τύπο B να κυριαρχεί, ενώ χαρακτηρίστηκε και ένα ανασυνδυασμένο στέλεχος (Sircoulomb, et al, 2025). Ωστόσο μέχρι και σήμερα, δεν έχουν υπάρξει μοριακές αναφορές σχετικά με τα ελληνικά στελέχη του ιού και την κατανομή των τύπων του στις γεωγραφικές περιοχές της χώρας.

1.3.5.3. ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ

Ο ιός των παραμορφωμένων φτερών DWV, αποτελεί σήμερα έναν από τους πιο διαδεδομένους και παγκοσμίως αναγνωρισμένους ιούς των μελισσών (*Apis mellifera*). Η γεωγραφική του εξάπλωση είναι σχεδόν παγκόσμια και συνδέεται στενά με την εξάπλωση του παρασιτικού ακάρεος *Varroa destructor*, το οποίο δρα ως κύριος βιολογικός φορέας και ενισχυτής της μόλυνσης (Martin, et al, 2012). Ο DWV έχει ανιχνευθεί σε αποικίες μελισσών σε όλες τις ηπείρους εκτός της Ανταρκτικής και της Αυστραλίας, περιλαμβάνοντας τόσο άγριους όσο και εκτρεφόμενους πληθυσμούς (Tehel, et al, 2016). Ακόμη, όπως φαίνεται και στην εικόνα 14, από το 2000 μέχρι και το 2020, μεταξύ των χωρών παρατηρείται σταδιακή μείωση του DWV-A στελεχούς και αύξηση του DWV-B (Paxton, et al, 2022) .

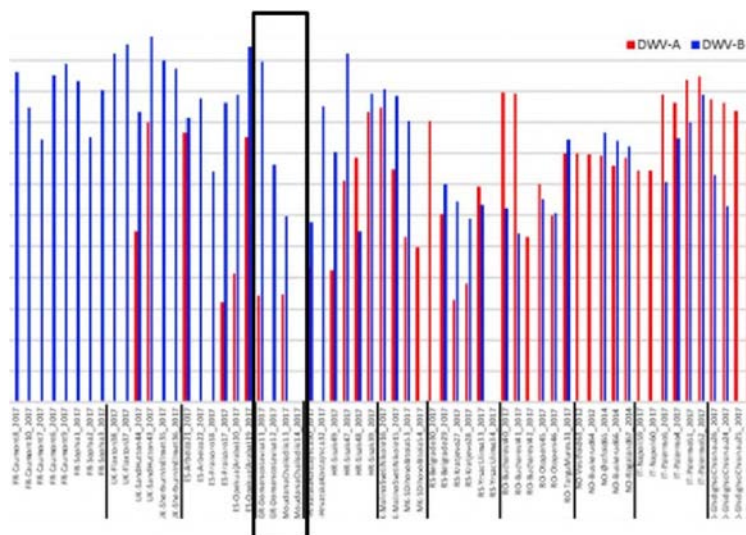


Εικόνα 14. Επικράτηση στελεχών DWV-A και DWV-B, από το 2000 μέχρι 2020 (Paxton, et al, 2022)

Στην Ελλάδα ο DWV ανιχνεύτηκε πρώτη φορά σε μελίτσια το 2010 (Bacandritsos, et al, 2010), αλλά και σε αποικίες μελισσών από το 2014 (Goras et al, 2018), ενώ σε πρόσφατη έρευνα του 2025 αναφέρεται ότι σε ελληνικά στελέχη του ιού ανιχνεύονται και οι δύο τύποι του ιού, DWV-A και DWV-B, με τον τύπο B να κυριαρχεί ανάμεσα σε 4 ελληνικά στελέχη (Sircoulomb, et al, 2025). Μελέτες που διεξήχθησαν σε διάφορες γεωγραφικές περιοχές της χώρας, καταδεικνύει υψηλά ποσοστά μόλυνσης, ιδιαίτερα σε αποικίες που είναι θετικές στον παρασιτισμό από το άκαρι *Varroa destructor*. Η παρουσία του DWV στην Ελλάδα συνδέεται με

χαρακτηριστικές κλινικές εκδηλώσεις, όπως παραμορφώσεις στα φτερά, μειωμένη διάρκεια ζωής των ενηλίκων μελισσών και αυξημένα επίπεδα χειμερινών απωλειών. Ακόμη, μέσω μιας ευρωπαϊκής ανασκόπησης περιγράφεται πώς οι κλιματικές και διαχειριστικές συνθήκες στη Μεσόγειο (όπως η Ελλάδα), ευνοούν την εξάπλωση του *Varroa* και συνεπώς και των ιογενών λοιμώξεων (Conte and Navajas, 2008). Τέλος, σε έρευνα του 2025 αναφέρεται πως στην Ελλάδα ανιχνεύονται και οι δύο κύριοι τύποι του ιού DWV-A και DWV-B, με το στέλεχος B να είναι ο κυρίαρχος τύπος μεταξύ 4 ελληνικών στελεχών (εικόνα 15) (Sircoulomb, et al, 2025). Ωστόσο μέχρι και σήμερα, δεν έχουν υπάρξει μοριακές αναφορές σχετικά με τα ελληνικά στελέχη του ιού και την κατανομή των τύπων του στις γεωγραφικές περιοχές της χώρας. Καθώς λοιπόν η Ελλάδα χαρακτηρίζεται από γεωγραφική και κλιματική ποικιλομορφία, αλλά και σε συνδυασμό με την εκτεταμένη μελισσοκομική δραστηριότητα και το ρόλο του ακάρεος στην παθογένεια του ιού, αναδεικνύεται η ανάγκη για συστηματική επιδημιολογική παρακολούθηση και ανάπτυξη στρατηγικών διαχείρισης του DWV στον ελληνικό μελισσοκομικό τομέα.

Σε σχετικές έρευνες που αφορούν την Ευρώπη, αναφέρεται πως ο ιός παρουσιάζει ιδιαίτερα υψηλή επικράτηση, με ποσοστά μόλυνσης σε ορισμένες περιοχές να υπερβαίνουν το 90% των αποικιών, εξαιτίας της παρουσίας του ακάρεος (Highfield, et al, 2009). Αναλυτικότερα, σε μια έρευνα που δημοσιεύθηκε το 2022, οι επιστήμονες απεικόνισαν τη κατανομή των τύπων DWV-A και DWV-B, μεταξύ τριών Ευρωπαϊκών χωρών. Συγκεκριμένα, η κατανομή αφορά το Ηνωμένο Βασίλειο, τη Γερμανία και την Ιταλία, με διαφορά έξι χρόνων μεταξύ των μετρήσεων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας, τα στελέχη που κυριαρχούν σε ποσότητα ιικού φορτίου με τη πάροδο του χρόνου, είναι αυτά του τύπου B, ενώ αντίθετα, παρατηρείται πως στελέχη τύπου A φαίνεται να φθίνουν με τη πάροδο του χρόνου, εμφανίζοντας λιγότερο ιικό φορτίο (Paxton, et al, 2022). Τέλος, έρευνα του 2025 πιστοποιεί πως ο DWV-B είναι πλέον το κυρίαρχο στέλεχος του ιού στην Ευρώπη, ενώ όπως απεικονίζεται στην εικόνα 15, μεταξύ των ελληνικών στελεχών ανιχνεύονται και οι δύο κυρίαρχοι τύποι του ιού (Sircoulomb, et al, 2025).

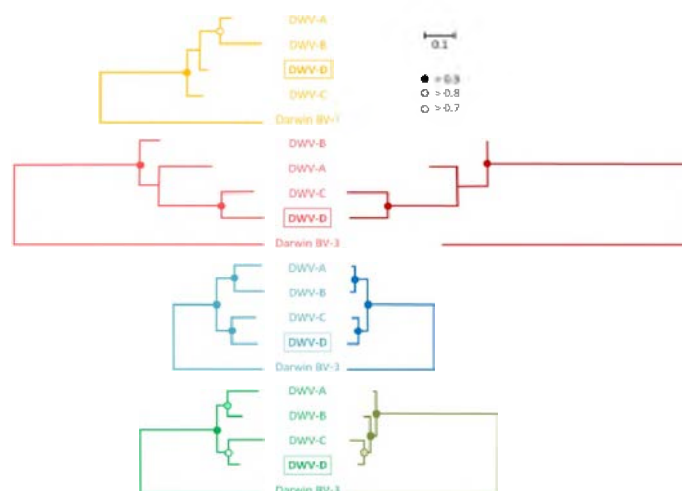


Εικόνα 15. Στην εικόνα απεικονίζεται ο καταμερισμός των τύπων DWV-A (κόκκινη ένδειξη) και DWV-B (μπλε ένδειξη), ανάμεσα σε ομαδοποιημένα στελέχη διαφόρων χωρών. Στο ένθετο πλαίσιο εμπεριέχονται 4 ελληνικά στελέχη (Sircoulomb, et al, 2025).

Οι μελέτες από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και πληθυσμούς μελισσών, επιτρέπουν τη χαρτογράφηση των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των στελεχών και την κατανόηση των μηχανισμών του ιού. Επομένως, τα φυλογενετικά δεδομένα αποτελούν αναπόσπαστο εργαλείο στην επιδημιολογική επιτήρηση του DWV και στη διαμόρφωση στρατηγικών για την αντιμετώπισή του.

1.3.6. ΦΥΛΛΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Οι φυλογενετικές αναλύσεις γίνονται μέσω της κατασκευής φυλογενετικών δέντρων και στοχεύουν στη διερεύνηση των γενετικών παραλλαγών. Σχετικά με τον ιό DWV, έχουν αναγνωριστεί τέσσερις υποτύποι του ιού, DWV-A, DWV-B, DWV-C και DWV-D (εικόνα 16), ενώ επιπλέον παρατηρούνται συχνά γενετικοί ανασυνδυασμοί μεταξύ των κυρίαρχων τύπων A και B σε διάφορες περιοχές του γονιδιώματος (de Miranda, et al, 2022). Οι φυλογενετικές αναλύσεις από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και πληθυσμούς μελισσών, επιτρέπουν τη χαρτογράφηση των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των στελεχών και την κατανόηση των μηχανισμών του ιού. Για τις φυλογενετικές μελέτες χρησιμοποιούνται κυρίως περιοχές του γονιδιώματος που εμφανίζουν επαρκή γενετική μεταβλητότητα, προσφέροντας αξιόπιστη ανάλυση της σχέσης μεταξύ διαφορετικών στελεχών. Παρατηρείται συχνά γενετικός ανασυνδυασμός μεταξύ αυτών σε διάφορες περιοχές του γονιδιώματος, καθώς και πληθώρα σημειακών μεταλλάξεων.



Εικόνα 16. Φυλογενετικά δέντρα μεταξύ των γονοτύπων του DWV A,B,C και D, βάσει τεσσάρων γενωμικών περιοχών: αμετάφραστες περιοχές (UTRs – κίτρινο), γονίδιο Lp (κόκκινο), δομική περιοχή (μπλε), μη δομική περιοχή (πράσινο). Νουκλεοτιδική αντιστοίχιση (αριστερά), αμινοξική αντιστοίχιση (δεξιά) (de Miranda, et al, 2022).

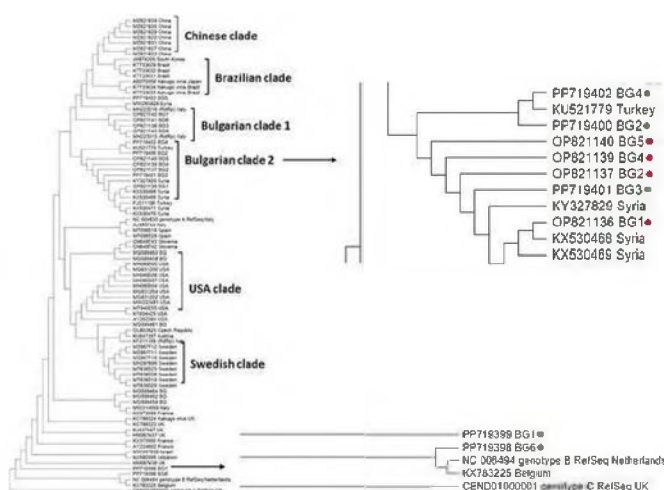
Μέσω των φυλογενετικών δέντρων παρατηρούνται αρκετές διαφορές μεταξύ και των τεσσάρων υποτύπων του ιού (de Miranda, et al, 2022). Ειδικότερα, στην εικόνα 16 απεικονίζεται η οργάνωση του γονιδιώματος και οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των κυριότερων παραλλαγών του DWV, συμπεριλαμβανομένων των γονοτύπων A, B, C, D και ενός πλήρως προσδιορισμένου συγγενικού στελέχους, του Darwin bee virus 3 (BV-3). Πιο συγκεκριμένα, στην εικόνα παρουσιάζονται οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των γονοτύπων DWV, βάσει τεσσάρων γενωμικών περιοχών: των αμετάφραστων περιοχών (UTRs – κίτρινο), του γονιδίου Lp (κόκκινο), της δομικής περιοχής (μπλε) και της μη δομικής περιοχής (πράσινο). Τα δένδροδιαγράμματα προκύπτουν τόσο από στοίχιση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (αριστερά) όσο και από στοίχιση των αντίστοιχων αμινοξικών αλληλουχιών (δεξιά) (de Miranda, et al, 2022). Η απεικόνιση αυτή τεκμηριώνει τις εξελικτικές αποκλίσεις μεταξύ των γονοτύπων, επιβεβαιώνοντας ότι ο DWV-D αποτελεί διακριτό εξελικτικό κλάδο με σαφή διαφοροποίηση από τα υπόλοιπα στελέχη.

Φυλογένεση σε μη δομικές περιοχές του ιικού γονιδιώματος

Όπως αναλύθηκε παραπάνω, στους περισσότερους ιούς RNA όπως ο DWV, τα γονίδια 3C και RdRp χρησιμοποιούνται ευρέως από ερευνητές για τη διάκριση της ταξινόμησης των υποτύπων του ιού και φυλογενετικές αναλύσεις. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί την RdRp πολυμεράση, το οποίο λόγω της λειτουργίας του ενζύμου στη διαδικασία της αντιγραφής του ιού και της σχετικά συντηρημένης αλλά διακριτής αλληλουχίας του γονιδίου του, χρησιμοποιείται ευρέως ως μοριακός δείκτης ανίχνευσης αλλά και σε φυλογενετικές αναλύσεις του DWV (Kevill, et al, 2017, Fei, et al, 2019, Balkanska, et al, 2023).

Ένα από τα πιο πρόσφατα φυλογενετικά δέντρα της RdRp γενωμικής περιοχής μεταξύ των στελεχών που έχουν απομονωθεί από διαφορετικές περιοχές, υποδηλώνει έντονη γενετική διαφοροποίηση του γονιδίου των στελεχών (εικόνα 17) (Salkova, et

al, 2024). Το φυλογενετικό δέντρο της εικόνας αποκαλύπτει σαφή διαχωρισμό των κύριων γονοτύπων του DWV (A, B και C), με τον γονότυπο B να διαχωρίζεται έντονα από τους άλλους δύο. Η ύπαρξη διακριτών κλάδων για συγκεκριμένες χώρες ή γεωγραφικές ζώνες, υποδηλώνει μια πιθανή γεωγραφική εξειδίκευση του ιού. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται για παράδειγμα, ότι τα στελέχη που προέρχονται από την Ασία (όπως Κίνα ή Ιαπωνία) σχηματίζουν ανεξάρτητους εξελικτικούς κλάδους σε σχέση με αυτά που απομονώθηκαν στην Ευρώπη ή στην Αμερική, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί σε διαχρονική απομόνωση, διαφορετικά εξελικτικά μονοπάτια, ή ακόμη και σε μια περιορισμένη γονιδιακή ροή του ιού μεταξύ των πληθυσμών των μελισσών. Επίσης, εξίσου σημαντικό είναι το γεγονός ότι παρά τη συντηρημένη φύση της RdRp, εντοπίζονται μικροδιαφοροποιήσεις που επαρκούν για την ταξινόμηση των στελεχών σε πολλαπλές υποκατηγορίες, γεγονός που μαρτυρά τη συνεχή εξέλιξη και προσαρμογή του ιού σε τοπικά οικοσυστήματα (Salkova, et al, 2024). Η πληροφορία αυτή είναι κρίσιμη όχι μόνο για την κατανόηση της μοριακής επιδημιολογίας του DWV, αλλά και για τον σχεδιασμό αποτελεσματικών στρατηγικών παρακολούθησης και ελέγχου, ιδίως σε περιβάλλοντα όπου η εξάπλωση του ιού σχετίζεται με εμπορικές μετακινήσεις μελισσών.

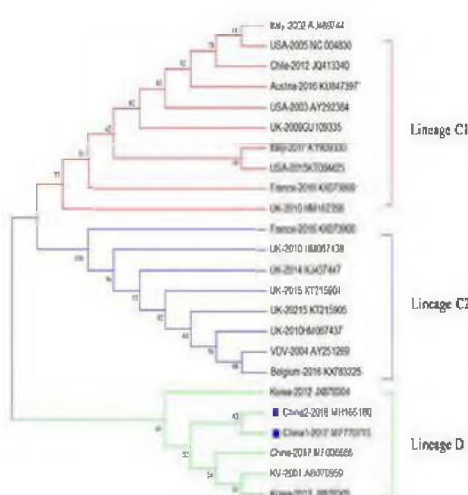


Εικόνα 17. Φυλογενετικό δέντρο της RdRp γενωμικής περιοχής (Salkova, et al, 2024).

Φυλογένεση σε δομικές περιοχές του ιικού γονιδιώματος

Η καψιδιακή περιοχή παρουσιάζει σημαντικό ενδιαφέρον για φυλογενετικές αναλύσεις, καθώς συνδυάζει συντηρημένα αλλά και μεταβλητά τμήματα, επιτρέποντας τόσο τη διάκριση μεταξύ στελεχών όσο και τη μελέτη της προσαρμοστικότητας του ιού. Ιδιαίτερα, η πρωτεΐνη VP1 διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διαδικασία της μόλυνσης, καθώς συμμετέχει στην πρόσδεση και είσοδο του ιού στα κύτταρα-ξενιστές. Μεταλλάξεις στην καψιδιακή περιοχή, ειδικά στη VP1, έχουν συνδεθεί με διαφορές στη λοιμογόνο δύναμη και στη γεωγραφική διασπορά διαφορετικών παραλλαγών του DWV (Barth, et al, 2024).

Από φυλογενετικά δέντρα της αμινοξικής αλληλουχίας της VP1 μιας έρευνας του 2024, φαίνεται ότι υπάρχουν διαφορές μεταξύ των τύπων A και B, ενώ μεταξύ των διάφορων στελεχών υπάρχει σχετική ομοιογένεια (Barth, et al, 2024). Ωστόσο, προγενέστερη μελέτη του 2019, μέσω φυλογενετικής ανάλυσης ορισμένων περιοχών του γονιδιώματος του DWV, οι επιστήμονες κατασκεύασαν φυλογενετικό δέντρο της γενωμικής περιοχής VP1 (εικόνα 18). Συγκεκριμένα, με βάση το διάγραμμα αυτό εμφανίζονται έντονες διαφορές μεταξύ των τύπων A, B και C, καθώς και διαφορές μεταξύ των διάφορων στελεχών, γεγονός που υποδηλώνει έναν γενετικό διαχωρισμό μεταξύ των χωρών και στη καψιδιακή περιοχή VP1(Fei, et al, 2019). Η συγκεκριμένη έρευνα εστιάζει σε δύο κινεζικά στελέχη, China1-2017 (απομονωμένο από *Apis mellifera*) και China2-2018 (απομονωμένο από *Apis cerana*), τα οποία κατατάσσονται στον γονότυπο DWV-A και παρουσιάζουν στενή φυλογενετική συγγένεια με το ιαπωνικό στέλεχος KV-2001. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πιθανή γεωγραφική αλλά και εξελικτική σύνδεση μεταξύ των ασιατικών στελεχών του ιού (Fei, et al, 2019). Συνεπώς, η παρατήρηση της γενετικής διαφοροποίησης της καψιδιακής περιοχής VP1 είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη στρατηγικών ελέγχου και πρόληψης της εξάπλωσης του ιού, ιδίως σε περιοχές όπου συνυπάρχουν διαφορετικά είδη μελισσών, ή και άλλων μολυσμένων εντόμων, όπως οι σφήκες.



Εικόνα 18. Φυλογενετικό δέντρο της καψιδιακής γενωμικής περιοχής VP1, μεταξύ στελεχών του τύπου DWV-A (LineageC1), στελεχών του DWV-B (LineageC2) και μερικών στελεχών της Κίνας (LineageD). Τα επισημασμένα στελέχη China 1 και China 2, χαρακτηρίστηκαν ως A στελέχη του ιού (Fei, et al, 2019).

1.3.7. ΕΠΟΧΙΚΟΤΗΤΑ

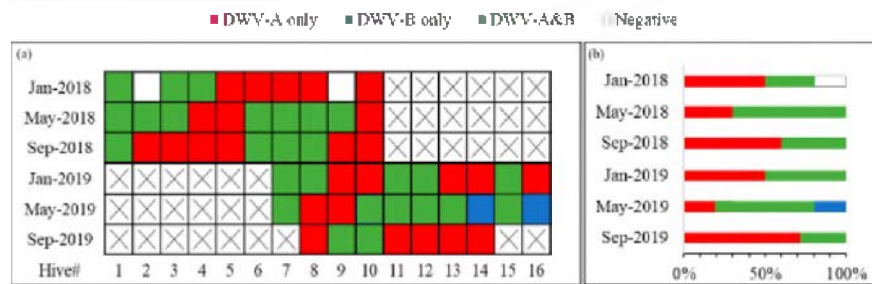
Η εποχικότητα της μόλυνσης από τον ιό των παραμορφωμένων φτερών (*Deformed Wing Virus*, DWV) αποτελεί έναν κρίσιμο παράγοντα για την κατανόηση της επιδημιολογίας της νόσου και τον σχεδιασμό στρατηγικών διαχείρισης των μελισσών (Martin, 2001). Πολλαπλές μελέτες έχουν καταδείξει ότι τα επίπεδα μόλυνσης από DWV παρουσιάζουν έντονες διακυμάνσεις εντός του ετήσιου κύκλου,

συνδεόμενα στενά τόσο με τη βιολογία του ακάρεος, όσο και με τον κύκλο ζωής των μελισσών.

Κατά τη διάρκεια της άνοιξης και των αρχών του καλοκαιριού, όταν οι πληθυσμοί των μελισσών αυξάνονται και η ωοτοκία της βασίλισσας είναι εντατική, τα επίπεδα μόλυνσης από DWV τείνουν να παραμένουν σχετικά χαμηλά (Nazzi et al, 2016). Σε αυτό το στάδιο, η διαθεσιμότητα άφθονου γόνου επιτρέπει στο άκαρι *Varroa* να αναπαράγεται, αλλά οι επιπτώσεις του σε μεμονωμένες μέλισσες αμβλύνονται λόγω της "αραίωσης" του παρασιτικού φορτίου σε μεγάλο αριθμό ατόμων. Καθώς ο χρόνος προχωρά και ιδιαίτερα προς το τέλος του καλοκαιριού, το *Varroa* αυξάνεται εκθετικά, οδηγώντας σε μεγάλη αύξηση του αριθμού των ακάρεων ανά μέλισσα (Nazzi, et al, 2016).

Σε μια διαφορετική μελέτη διακύμανσης των δύο κύριων στελεχών του ιού DWV-A και DWV-B, παρουσιάζονται διαχρονικά δεδομένα για την επικράτηση των στελεχών σε μεμονωμένες κυψέλες στο νησί Oahu της Χαβάης, για τις περιόδους του Γενάρη, του Μαΐου και του Σεπτεμβρίου (εικόνα 19). Αν και το DWV-A ήταν το κυρίαρχο στέλεχος σε μελισσοκομεία, στις μεμονωμένες κυψέλες θα μπορούσαν πλέον να χαρακτηριστούν ως ένας συνδυασμός DWV-A και DWV-B, ενώ κάποιες βρέθηκαν θετικές μόνο για το DWV-B (Zhang, 2024).

Η αύξηση της παρασιτικής πίεσης στο τέλος του καλοκαιριού και αρχές του φθινοπώρου, προκαλεί σοβαρή εξάπλωση του DWV μέσα στις αποικίες. Σε αυτήν τη φάση, η σταδιακή μείωση του γόνου περιορίζει τις δυνατότητες αναπαραγωγής των ακάρεων, αναγκάζοντάς τα να προσβάλουν μεγαλύτερο ποσοστό ενήλικων μελισσών, και ιδιαίτερα τις νεαρές εργάτριες που προορίζονται να διαχειμιάσουν. Το υικό φορτίο εκτοξεύεται και παραμένει υψηλό καθ' όλη τη διάρκεια του φθινοπώρου και του χειμώνα (Highfield, et al, 2009), ενώ μέλισσες που εκκολάπτονται κατά την περίοδο αυτή παρουσιάζουν σοβαρές παραμορφώσεις, μειωμένο προσδόκιμο ζωής και ελαττωμένη ικανότητα διαχείμανσης, καθιστώντας την αποικία ευάλωτη σε κατάρρευση (Nazzi, et al, 2016). Ακόμη, σε πρόσφατη μελέτη του 2025, τα ευρήματα των ερευνητών υποδηλώνουν μια έμμεση σύνδεση μεταξύ της παρουσίας του ακάρεος και της δυναμικής του DWV στις αποικίες μελισσών (Molinatto, et al, 2025). Συγκεκριμένα οι ερευνητές διερεύνησαν τις εποχικές διακυμάνσεις πέντε βασικών ιών που προσβάλλουν τις μέλισσες (*Deformed Wing Virus* - DWV, *Acute Bee Paralysis Virus* - ABPV, *Black Queen Cell Virus* - BQCV, *Chronic Bee Paralysis Virus* - CBPV και *Sacbrood Virus* - SBV) μέσω μιας τριετούς διαχρονικής έρευνας σε περισσότερες από 300 αποικίες μελισσών σε δύο διαφορετικές περιοχές της Νότιας Ευρώπης, τη Γαλλία και την Ιταλία, και παρατηρήθηκε αύξηση της παρουσίας των ιών κατά τους θερμότερους μήνες, υποδηλώνοντας ότι οι κλιματικές συνθήκες και η δυναμική των αποικιών και των παρασίτων επηρεάζουν την εξάπλωση των ιών (Molinatto, et al, 2025). Η μελέτη αυτή συμβάλλει σημαντικά στην κατανόηση της εποχικής δυναμικής των ιών στις αποικίες μελισσών και υπογραμμίζει την ανάγκη για συνεχή παρακολούθηση και προσαρμογή των πρακτικών διαχείρισης για τη διατήρηση της υγείας των αποικιών.



Εικόνα 19. Κατανομή των DWV-A και DWV-B στα νησιά της Χαβάης, για τις περιόδους του Γενάρη, του Μαΐου και του Σεπτεμβρίου. Η κόκκινη ένδειξη απεικονίζει την ανίχνευση του A τύπου μεταξύ των στελεχών, η μπλε ένδειξη του τύπου B, ενώ η πράσινη ένδειξη υποδηλώνει τη συνύπαρξη των δύο τύπων στη μόλυνση (Zhang, 2024).

1.3.8. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ

Η ανίχνευση και η τυποποίηση του ιού των παραμορφωμένων φτερών (*Deformed Wing Virus - DWV*) πραγματοποιείται κυρίως με μοριακές τεχνικές, που στοχεύουν στην αναγνώριση cDNA του ιού, έπειτα από την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής του γενετικού του υλικού RNA (de Miranda, et al. 2010). Η ανίχνευση του DWV, κυρίως πραγματοποιείται με μοριακή ενίσχυση μεταξύ συντηρημένων περιοχών μεταξύ των τύπων του ιού, ενώ η ταυτοποίηση του εκάστοτε τύπου πραγματοποιείται μέσω ενίσχυσης των μη κοινών συντηρημένων περιοχών (Zhu, et al. 2020).

1.3.8.1. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Από τις πιο διαδεδομένες και αξιόπιστες μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και τη τυποποίηση ιών όπως ο DWV, είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR - Polymerase Chain Reaction) (Rahman, et al, 2013). Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ενίσχυση συγκεκριμένων περιοχών του ιικού γονιδιώματος, προσφέροντας την ακριβή εκτίμηση των αλληλουχιών του, αλλά και εκτιμήσεις του ιικού φορτίου, με εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια (Salkova et al, 2024). Ένας από τους σημαντικότερους ιούς που επεξεργάζονται οι επιστήμονες γύρω από την υγεία των μελισσών μέσω μοριακών τεχνικών, είναι και ο *Deformed Wing Virus* (DWV), κυρίως εξαιτίας της πολυπλοκότητας του γονιδιώματος του ιού, αλλά και της αυξημένης ευαισθησίας και ακρίβειας των τεχνικών (de Miranda, et al., 2010). Επιπλέον, με την εφαρμογή της τεχνικής επιτρέπεται η επιβεβαίωση της παρουσίας ιών σε δείγματα διαφόρων ιστών, βιολογικών υγρών ή προϊόντων (βασιλικός πολτός) των μελισσών, ενώ με τη παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο (Real-TimePCR), μπορεί να πραγματοποιηθεί ακριβής εκτίμηση του ιικού φορτίου (Salkova, et al, 2024).

Ακόμη, η μέθοδος της PCR χαρακτηρίζεται επιπλέον από πολύ υψηλά όρια ανίχνευσης των ιών, ακόμη και σε πολύ χαμηλά επίπεδα ύπαρξης γενετικού υλικού (Rahman, et al, 2013). Πιο συγκεκριμένα, μέσω της χρήσης ειδικών εκκινητών (primers) για το γονιδίωμα του DWV, εξασφαλίζεται η ακρίβεια της ανίχνευσης

ακόμα και σε περιπτώσεις όπου η λοίμωξη βρίσκεται σε λανθάνουσα φάση (Zhu et al, 2020). Επιπλέον, με τη χρήση κατάλληλων ζευγών εκκινητών αλλά και μέσω παραλλαγών της τεχνικής, όπως RT-PCR, qPCR και RT-qPCR, είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ των διαφόρων γενετικών τύπων του ιού (π.χ. DWV-A, DWV-B, DWV-C), αλλά και η ποσοτικοποίηση του ιικού φορτίου σε διαφορετικά στάδια ζωής των μελισσών ή σε διαφορετικούς ιστούς ή προϊόντα, προσφέροντας πολύτιμες πληροφορίες για τη δυναμική της λοίμωξης και την εξέλιξη της νόσου σε επίπεδο αποικίας και μελισσοκομείου (Chen, et al, 2005, Rahman, et al, 2013, Zhu, et al, 2020).

Τέλος, η μέθοδος πλεονεκτεί ως προς τη ταχύτητα και την απόδοση της αντίδρασης, καθώς και ως προς την ευελιξία των πειραματικών διαδικασιών (Rahman, et al, 2013). Η ευελιξία της τεχνικής επιτρέπει την εφαρμογή της τόσο σε εργαστηριακές συνθήκες ερευνητικού επιπέδου, όσο και σε επίπεδο μελισσοκομείου. Επιπλέον, μπορεί να προσφέρει αποτελέσματα εντός λίγων ωρών, γεγονός που την καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμη για διαγνωστικούς σκοπούς διαφόρων ιών, ιδιαίτερα όταν απαιτείται άμεση λήψη αποφάσεων (Zhu, et al, 2020).

Ένα από τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται ευρέως ανά τον κόσμο με βάση τη βιβλιογραφία για τη ταυτοποίηση του τύπου του ιού, είναι το ABC Assay. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο αποτελεί μία ειδική μοριακή μέθοδο που αναπτύχθηκε για τη διακριτή ανίχνευση και φυλογενετική ταξινόμηση των κύριων γενότυπων του ιού DWV-A, DWV-B και DWV-C (Kevill, et al, 2017). Το πρωτόκολλο στοχεύει ταυτόχρονα σε ένα συντηρημένο τμήμα του γονιδίου της RdRp, το οποίο φαίνεται πως μέχρι και σήμερα διατηρείται μεταξύ όλων των στελεχών, καθώς και σε μη συντηρημένο τμήμα της περιοχής, όπου επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ των τριών υποτύπων. Συγκεκριμένα οι ερευνητές, χρησιμοποιώντας ειδικά σχεδιασμένα ζεύγη εκκινητών (primers), με F(forward) εκκινητή για τη συντηρημένη περιοχή και τρία διαφορετικά σετ R(reverse) για τη μη συντηρημένη, το πρωτόκολλο επιτρέπει την ακριβή διάκριση μεταξύ των διαφορετικών γενότυπων με βάση μοναδικές νουκλεοτιδικές υπογραφές στην περιοχή της RdRp. Λόγω της υψηλής ειδικότητας και ευαισθησίας του, το A-B-C assay χρησιμοποιείται ευρέως σε φυλογενετικές αναλύσεις για να παρακολουθείται η εξέλιξη του DWV σε φυσικούς πληθυσμούς μελισσών και να εκτιμάται η σχετική επικράτηση κάθε στελέχους σε γεωγραφικό επίπεδο (Jessica, et al, 2019). Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη καθώς η RdRp είναι αρκετά συντηρημένη ώστε να παρέχει σταθερά εξελικτικά σήματα, αλλά παρουσιάζει και επαρκή ποικιλία για διακριτή κατάταξη σε επίπεδο στελέχους (de Souza, et al, 2021, Kevill, et al, 2022).

Συμπερασματικά, η μέθοδος της PCR και Real-Time PCR αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία στη σύγχρονη έρευνα επιτρέποντας την ακριβή και έγκαιρη ανίχνευση των υποτύπων διαφόρων ιών όπως και ο DWV, καθώς και την παρακολούθηση των γενετικών διαμορφώσεων, με αποτέλεσμα όλες οι παραλλαγές της τεχνικής να χρησιμοποιούνται ευρέως από τους ερευνητές παγκοσμίως.

1.3.8.2. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Μια από τις παλαιότερες τεχνικές που χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα στην έρευνα, είναι η RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Williams, et al, 1989). Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στη χρήση περιοριστικών ενζύμων και είναι ικανή να ανιχνεύει πολυμορφισμούς (διαφοροποιήσεις) στο μήκος των θραυσμάτων που προκύπτουν από τη δράση των ενζύμων, σε προϊόντα πέψης του DNA (Williams, et al, 1989). Ο ιός των παραμορφωμένων φτερών είναι ένας RNA ιός, με αποτέλεσμα η τεχνική να μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο μετά τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής. Έτσι, συνδυαστικά με τη PCR χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του ιού μέσω της VP1 πρωτεΐνης, αλλά και για την τυποποίηση των υποτύπων DWV-A και DWV-B, καθώς επίσης και για ανασυνδιασμένα μόρια (Ryabov, et al, 2014).

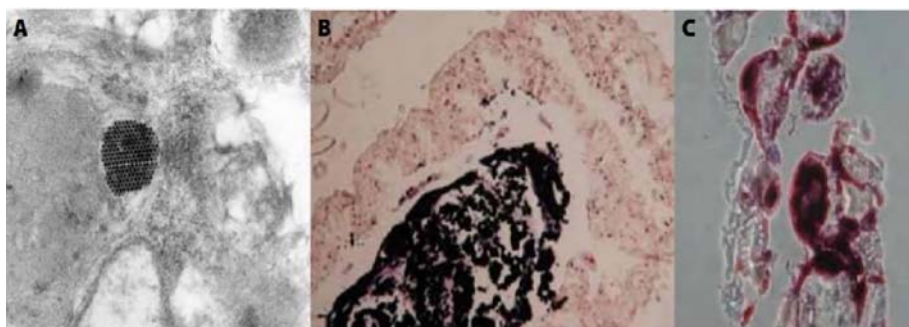
Πιο συγκεκριμένα, η χρήση της μεθόδου επιτρέπει την ιογενή ανίχνευση, αλλά και τον προσδιορισμό των μεταλλάξεων και των γονιδιακών παραλλαγών που επηρεάζουν τις θέσεις περιορισμού των ενζύμων, με σχετικά καλή ακρίβεια. Ωστόσο, καθώς η μέθοδος περιλαμβάνει εξαγωγή του DNA και περιοριστική πέψη για περαιτέρω ανάλυση, καθίσταται αρκετά αργή και χρονοβόρα (Williams, et al, 1989). Επιπλέον, απαιτεί μεγάλη ποσότητα για επεξεργασία DNA και έχει χαμηλότερη διακριτική ικανότητα σε σύγκριση με νεότερες τεχνικές μοριακής ανάλυσης, με αποτέλεσμα να αποφεύγεται να χρησιμοποιείται ευρέως από τους ερευνητές. Τέλος, η τεχνική φαίνεται βιβλιογραφικά πως χρησιμοποιείται συνδυαστικά με μοριακές τεχνικές για διάφορους σκοπούς της ιολογίας των μελισσών, όπως για παράδειγμα ο καθορισμός και η αλληλούχηση γονιδίων του ιού DWV (Dahouk, et al, 2008), καθώς και για πολλούς διαφορετικούς λόγους ερευνών, όπως ο προσδιορισμός ζωικών ειδών (Guan, et al, 2018).

1.3.8.3. IN SITU ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ

Μία ακόμη από τις βασικές τεχνικές ανίχνευσης και τυποποίησης του ιού που χρησιμοποιείται συνδυαστικά με τις μοριακές τεχνικές, είναι η τεχνική του in situ υβριδισμού. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται για την τοπική ανίχνευση του γενετικού υλικού ιών όπως και του DWV, μέσω υβριδισμού, απευθείας στους ιστούς των μελισσών και επιτρέπει την χωρική απεικόνιση της ιογενούς κατανομής εντός του οργανισμού (Fievet, et al, 2006).

Αναλυτικότερα, στη μέθοδο χρησιμοποιούνται ειδικές ανιχνευτικές αλληλουχίες (probes), οι οποίες είναι συμπληρωματικές του ιικού RNA (είτε για τον τύπο A, είτε για τον τύπο B του ιού), επισημασμένες με φθορίζοντα μόρια, ώστε τελικά να επιτρέπεται η οπτική ανίχνευσή των στελεχών με μικροσκοπία (Fievet, et al, 2006). Ο υβριδισμός παρέχει κρίσιμες πληροφορίες σχετικά με τους ιστούς-στόχους και τη δυναμική της λοίμωξης, ενώ η μέθοδος συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση της διασποράς του ιού εντός των ιστών και μπορεί να αποδείξει τη συσχέτιση κλινικών συμπτωμάτων με τη ιογενή παρουσία. Οι αναλύσεις αυτές πραγματοποιούνται κυρίως σε ιστούς του εγκεφάλου, του φάρυγγα και της μυϊκής μάζας των εντόμων (Fievet, et al, 2006).

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για ερευνητικούς σκοπούς που σχετίζονται με την παθογένεια και τη βιολογία του ιού, αλλά λόγω της πολυπλοκότητας των πειραματικών διαδικασιών και του κόστους, αποφεύγεται η χρήση για την ιογενή ανίχνευση. Στην εικόνα 20 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της τεχνικής για τη παρακολούθηση του ιού σε διαφορετικούς ιστούς της μέλισσας, μετά τη χρήση του *in situ* υβριδισμού (de Miranda, et al, 2023).



Εικόνα 20. A) Ηλεκτρονική μικροφωτογραφία μετάδοσης που δείχνει σωματίδια του ιού DWV διαμέτρου 30nm, σε ιστό ωοθήκης της βασίλισσας. B) Εικόνα *in situ* υβριδισμού που εντοπίζει το RNA του ιού DWV σε κύτταρα του μέσου εντέρου και του επιθηλίου των κηφήνων. C) Εικόνα *in situ* υβριδισμού που εντοπίζει το RNA του ιού DWV σε κύτταρα του λιπώδους ιστού της βασίλισσας, μέσω οπτικής μικροσκοπίας ως καστανό-σκούρο χρώση που αντιτίθεται στην ανοιχτόχρωμη εμφάνιση των ιστών (de Miranda, et al, 2023).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Στα ελληνικά μελισσοκομεία, ο DWV ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά το 2010, ενώ μέχρι σήμερα δεν υπάρχει καμία αναφορά για τον καταμερισμό των τύπων στη χώρα. Καθώς λοιπόν η Ελλάδα χαρακτηρίζεται από γεωγραφική και κλιματική ποικιλομορφία, αλλά και σε συνδυασμό με την εκτεταμένη μελισσοκομική δραστηριότητα και το ρόλο του ακάρεος στην παθογένεια του ιού, αναδεικνύεται ανάγκη για συστηματική επιδημιολογική παρακολούθηση και ανάπτυξη στρατηγικών διαχείρισης του DWV στον ελληνικό μελισσοκομικό τομέα.

Για το λόγο αυτό, στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη μοριακών πρωτοκόλλων για τη μοριακή ανίχνευση και τυποποίηση του ιού. Αρχικά, αναπτύχθηκε πρωτόκολλο ανίχνευσης χρησιμοποιώντας εκκινητικά μόρια ενίσχυσης συντηρημένων περιοχών της RNA εξαρτώμενης πολυμεράσης (RdRp). Καθώς κρίνεται σημαντική η διάκριση μεταξύ των τύπων του ιού κυρίως αυτών που κυκλοφορούν στην Ευρώπη, DWV-A και DWV-B, στόχος ήταν η ανάπτυξη πρωτοκόλλου για την τυποποίηση του ιού μέσω της καψιδιακής γενωμικής περιοχής VP1, αρχικά με εκκινητικά μόρια από τη βιβλιογραφία.

Καθώς δεν βρέθηκαν στη βιβλιογραφία εκκινητές που να χρησιμοποιούνται για την τυποποίηση επιπλέον στόχος της εργασίας αποτέλεσε ο σχεδιασμός νέων εκκινητικών μορίων, με σκοπό την ενίσχυση γενωμικού τμήματος μεταξύ συντηρημένων περιοχών στη VP1 οι οποίοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη μοριακή διάκριση μεταξύ των τύπων DWV-A και DWV-B.

Η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου για τη μοριακή ανίχνευση και τυποποίηση του DWV είναι σημαντική για τη γρήγορη και με μεγάλη ευαισθησία διάκριση μεταξύ των τύπων του ιού που κυκλοφορούν σε μια περιοχή και για την ευρεία επιτήρησή του. Επιπλέον η ενίσχυση τμήματος της καψιδιακής περιοχής του γενώματος του DWV θα μπορεί να οδηγήσει στη μελέτη της συγκεκριμένης περιοχής σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, στη μελέτη των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ στελεχών καθώς στη συγκεκριμένη γενωμική περιοχή και στην αναγνώριση και μελέτη ανασυνδυασμένων στελεχών DWV.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΜΕΛΙΣΣΩΝ

Οι δειγματοληψίες των μελισσών πραγματοποιήθηκαν από το Εργαστήριο Σηροτροφίας και Μελισσοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Σε κάθε δειγματοληψία συλλέγονταν 15 μέλισσες από κάθε μελίσσι, σε αποστειρωμένους ουροσυλλέκτες. Η συλλογή εμπεριείχε συμπτωματικές και μη συμπτωματικές μέλισσες, ενώ η φύλαξη των συλλεκτών πραγματοποιήθηκε στην υπερκατάψυξη στους (-80 °C). Συνολικά συλλέχθηκαν 26 διαφορετικά δείγματα από 8 νομούς της Ελλάδας, τα οποία αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα 1.

Πίνακας 1. Δείγματα Μελισσών.

Δείγματα εργαστηρίου		
Κωδικός δείγματος	Προέλευση	Νομός
S1	Σπερχειάδα 2023	Στερεά Ελλάδα
S2	Πάρος 2023	Κυκλάδες
S3	Κυρ. Αλιγοί 1	Χανιά
S4	Κυρ. Αλιγοί 2	
S5	Κυρ. Ομαλός 1	
S6	Κυρ. Ομαλός 2	
S7	Κυρ. Καλουδιανά 1	
S8	Κυρ. Καλουδιανά 2	
S9	Παпасυφ. Σκοινές	
S10	Κουφ. Κάμπος Κισσάμου 1	
S11	Κουφ. Κάμπος Κισσάμου 2	Ηράκλειο
S12	Κασταν. Καστέλι 1	
S13	Κασταν. Καστέλι 2	
S14	Κασταν. Ελαφονήσι 1	
S15	Κασταν. Ελαφονήσι 2	Χανιά
S16	Μαντούδι Εύβοια 24	Εύβοια
S17	Μαντούδι Εύβοια 5	
S18	Μαντούδι Εύβοια 11	
S19	Παππάδες Εύβοια 77	
S20	Παππάδες Εύβοια ορφ	
S21	Παππάδες Εύβοια 50	Αττική
S22	ΓΠΑ 1 τυχαίο	
S23	ΓΠΑ 2 τυχαίο	
S24	Άγιος Βασίλειος Μεσολογγίου	Αιτωλοακαρνανία
S25	Μεσόκαμπος Μεσολογγίου	
S26	Καλλίθηρο Καρδίτσας	Θεσσαλία

3.2. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕΛΙΣΣΩΝ

Η αρχική επεξεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας, του τμήματος Βιολογίας του ΑΠΘ. Αρχικά πραγματοποιήθηκε σύνθλιψη 5 εντόμων του κάθε δείγματος με τη χρήση 3ml αποστειρωμένου ρυθμιστικού διαλύματος PBS, αποστειρωμένο γουδί και γουδοχέρι, σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 3 λεπτά, στα 16.000g και φύλαξη του υπερκείμενου στους -20°C.

3.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA

Η απομόνωση του RNA έγινε με τη χρήση kitNucleoSpinRNA της Macherey-Nagel (Düren, Germany). Αρχικά, για την εκχύλιση αναμείχθηκαν 250μl του υπερκείμενου, με 350μl ρυθμιστικού διαλύματος RA1 και 3.5μl β-μερκαπτοαιθανόλη (PanReacApplichem, ITWReagents) και ακολούθησε καλή ανάδευση για 2-3 λεπτά σε συσκευή vortex.

Ο καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε σε ειδική στήλη φιλτραρίσματος NucleoSpin Filter και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό, στα 11.000g. Στο φιλτραρισμένο μίγμα, προστέθηκαν 350μl αιθανόλης 70% και έπειτα από ανάδευση, το μίγμα μεταφέρθηκε σε ειδική στήλη φιλτραρίσματος NucleoSpin RNA Column και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 11.000xg. Έπειτα, έγινε προσθήκη 350μl ρυθμιστικού διαλύματος MDB και η στήλη φυγοκεντρήθηκε για 1min, στα 11.000g. Σε αποστειρωμένο πλαστικό σωληνάριο προετοιμάστηκε το μίγμα του διαλύματος rDNAάσης, ως εξής: για κάθε δείγμα προστέθηκαν 10μl από rDNase και 90μl από Reaction Buffer for rDNase. Από το διάλυμα της rDNAάσης μεταφέρθηκαν 95μl στο κέντρο της κάθε στήλης και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 200μl ρυθμιστικού διαλύματος RAW2, φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στα 11.000g και η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο μικροσωληνάριο (collection tube). Ακολούθησε προσθήκη 600μl ρυθμιστικού διαλύματος RA3 και φυγοκέντρηση της στήλης για 30 δευτερόλεπτα στα 11.000g. Το διηθούμενο προϊόν απορρίφθηκε και η στήλη μεταφέρθηκε ξανά στο collection tube. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη από 250μl RA3 στη στήλη, φυγοκέντρηση στα 11.000g για 2λεπτά και απόρριψη του διηθήματος, ενώ η στήλη μεταφέρθηκε σε καθαρό μικροσωληνάριο των 1.5 ml. Τέλος, ακολούθησε προσθήκη 60μl H₂O ελεύθερο νουκλεασών (RNase-freewater) και φυγοκέντρηση της στήλης για 30 δευτερόλεπτα στα 11.000g. Το απομονωμένο RNA αποθηκεύτηκε στους (-20°C).

3.4. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

Καθώς το γενετικό υλικό του ιού είναι ένα RNA μόριο θετική πολικότητας, είναι απαραίτητο να προηγηθεί η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής προκειμένου να πραγματοποιηθεί ενίσχυση γονιδίων με PCR, μέσω της οποίας το RNA μετατρέπεται σε cDNA.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μικροσωληνάριο με τελικό όγκο 20μl, με τη χρήση του ενζύμου Xpert Reverse Transcriptase Reverse Transcriptase (Xper cDNA synthesis supermix, GRISP, Πορτογαλία). Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 15μl από ddH₂O ελεύθερο από DNases και RNases, 4μl μίγματος Xpert cDNA Synthesis Supermix 5x και 1μl δείγματος RNA. Τα δείγματα επωάστηκαν αρχικά στους 37°C για 30min, και ακολούθως στους 60°C για 10min. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε με απενεργοποίηση του ενζύμου 95°C για 3min. Η αντίδραση της RT πραγματοποιήθηκε στο θερμικό κυκλοποιητή MultiGeneII, Labnet. Με την ολοκλήρωση της αντίδρασης τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν ελαφρώς και φυλάχθηκαν στους -20 °C.

3.5. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ DWV ΣΤΗΝ RdRp ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ

3.5.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ.

Επιλογή εκκινητών

Για τον έλεγχο της παρουσίας του ιικού RNA, πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφικός έλεγχος και επιλέχθηκε ένα ζευγάρι εκκινητών που χρησιμοποιείται ευρέως στη βιβλιογραφία για την ανίχνευση και των τριών τύπων του DWV, A, B και C, μέσω της RdRp περιοχής.

Τα εκκινητικά μόρια που επιλέχθηκαν για την αντίδραση, σχεδιάστηκαν από τους Nielsen et al, το 2008 και χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιβλιογραφία για την ανίχνευση του DWV μέσω PCR, οι εκκινητές DWV-FWD(8.561nt-TTTGCAAGATGCTGTATGTGG-8.581nt), και DWV-REV(8.936nt-GTCGTGCAGCTCGATAGGAT-8.955nt) (Nielsen, et al, 2008), ενισχύουν το τμήμα μεταξύ των θέσεων 8.561-8.955 του πρότυπου στελέχους DWV-A, με κωδικό καταχώρησης αλληλουχίας, Accession Number: AY292384. Η σύνθεση των εκκινητών πραγματοποιήθηκε από την εταιρία Eurofins, Luxemburg.

Έλεγχος βέλτιστης θερμοκρασίας υβριδισμού (Gradient PCR).

Για τον έλεγχο της βέλτιστης θερμοκρασίας υβριδισμού των εκκινητών (annealing), εφαρμόστηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με θερμική διαβάθμιση (Gradient PCR). Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε δύο δείγματα (S3 και S5), στα 25μl με τη χρήση του ενζύμου Taq-DNA Polymerase (Xper Fast DNA Polymerase (GRISP, Πορτογαλία). Κατασκευάστηκε διάλυμα Master Mix της αντίδρασης με, 15,7μl από ddH₂O ελεύθερο από DNases και RNases, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος (Xpert reaction buffer 5x), 0,3μl του ενζύμου Taq (1,5 U), και 0,5μl από κάθε εκκινητή (DWV-FWD/DWV-REV) συγκέντρωσης 25pmol/μl. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο θερμικό κυκλοποιητή QIA amplifier 96, (Qiagen, Γερμανία), με 22μl του διαλύματος master mix και 3μl δείγματος cDNA. Αφού προηγήθηκε αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 1 λεπτό, στην συνέχεια ακολούθησε η εφαρμογή των συνθηκών που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα 2,

ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH₂O ελεύθερο από DNases και RNases. Το θερμοκρασιακό εύρος του ελέγχου ήταν από 55⁰C μέχρι 60⁰C όπως περιγράφεται στον πίνακα 3.

Πίνακας 2. Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης PCR (DWV-FWD/DWV-REV, 25pmol/μl)

Ένζυμο	Συνθήκες Αντίδρασης
Taq-DNA Polymerase (1,5 U)	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: Grad Tm για 20sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 2sec } 35cycles

Πίνακας 3. Συνθήκες Gradient PCR (DWV-FWD/DWV-REV) με θερμοκρασιακό σφάλμα ± (0,1-0,2)

Συνθήκες Θερμοκρασίας Gradient PCR						
<i>T_m:</i>	55°C	56°C	57°C	58°C	59°C	60°C
Δείγμα S3	x	x	x	x	x	x
Δείγμα S5	x	x	x	x	x	x
ddH₂O	x	x	x	x	x	x

Ο έλεγχος της παρουσίας προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.7.

Έλεγχος ελάχιστης ποσότητας αντιδραστηρίων

Για τον έλεγχο της ελάχιστης απαιτούμενης ποσότητας των αντιδραστηρίων, έγινε αναπροσαρμογή του πρωτοκόλλου σε επιβεβαιωμένα θετικά δείγματα και δοκιμάστηκαν οι ποσότητες του πίνακα 4, διατηρώντας σταθερό το τελικό όγκο της αντίδρασης στα 25μl και ως βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών τους 55°C.

Πίνακας 4. Πειραματικές δοκιμές για αντίδραση PCR, τελικού όγκου 25μl.

Τελική συγκέντρωση εκκινητικών μορίων (DWV-FWD/ DWV-REV)	Τελική συγκέντρωση ενζύμου (Taq-DNA Polymerase)	Ποσότητα cDNA (RT-PCR product)
0,5pmol/μl	1,5 U	3μl
0,2pmol/μl	0,5 U	1μl

3.5.2. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ DWV ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕΛΙΣΣΩΝ.

Το πρωτόκολλο της PCR που αναπτύχθηκε, εφαρμόστηκε και στα 26 δείγματα του πίνακα 1. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε αποστειρωμένα πλαστικά σωληνάρια των 200μl. Σε όλες τις αντιδράσεις, το μείγμα αποτελούνταν από 0,5μl από τον κάθε εκκινητή, συγκέντρωσης 10pmol/μl, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος (Xpert buffer cDNA synthesis supemix, 5X), 0,5 U Taq DNA πολυμεράση (Xpert Fast DNA polymerase, Grisp), 0,3μl cDNA από κάθε δείγμα και ddH₂O (ελεύθερο νουκλεασών) μέχρι τελικό όγκο 25μl. Οι συνθήκες της αντίδρασης περιγράφονται στον πίνακα 5.

Μετά το τέλος της αντίδρασης, για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση (βλ. Κεφαλαίο 3,7), με το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος να αντιστοιχεί στα 395 ζεύγη βάσεων.

Πίνακας 5. Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της RdRp

Ένζυμο	Συνθήκες Αντίδρασης
Taq-DNA Polymerase (0,5 U)	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 55°C για 20sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 2sec } 35cycles

3.6. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ DWV ΣΤΗ VP1 ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ.

Για την ανίχνευση του ιού μέσω της VP1 περιοχής, αναζητήθηκαν εκκινητικά μόρια στη βιβλιογραφία. Από την αναζήτηση στη διεθνή βιβλιογραφία βρέθηκαν μόνο τα εκκινητικά μόρια (Fei, et al, 2019, 2020), τα οποία είναι σχεδιασμένα βάσει του πρότυπου στελέχους A με Accession Number: AY292384. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που δοκιμάστηκαν καθώς και οι θέσεις υβριδισμού τους πάνω στο γονιδίωμα του ιού αναγράφονται στον πίνακα 6.

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στα 25μl, με τη χρήση του ενζύμου Taq-DNA Polymerase (Xper Fast DNA Polymerase, GRISP). Όπως περιγράφηκε και παραπάνω, κατασκευάστηκε διάλυμα με, 15,7μl από ddH₂O ελεύθερο από DNases και RNases, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος (Xpert reaction buffer 5x), 0,5μl από κάθε εκκινητή συγκέντρωσης 25pmol/μl, 1,5U Taq DNA πολυμεράση, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ddH₂O ελεύθερο από DNases και RNases. Σε κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 2 min. Ακολούθησαν τα εξής τρία στάδια: αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης, με τη θερμοκρασία υβριδοποίησης να διαφέρει για κάθε ζεύγος εκκινητών, όπως περιγράφεται στον πίνακα 7.

Πίνακας 6. Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του ιού μέσω της VP1, βάση του προτύπου A με Accession Number: AY292384 (Fei, et al, 2019, 2020)

Όνομα Εκκινητών	Sequence 5'-3'
DWV 7F DWV 7R	3.547nt-AGCAAGCTGCTGTAGGAACTC-3.567nt 4.285nt-TGACCAGTAGACACAGCATC-4.266nt
VP1 F VP1 R	2.536nt-ATCGTATATTAATTTTRGCAGAGG-2.559nt 4.065nt-GGAGAGCCAGCAGAACC-4.081nt

Πίνακας 7. Συνθήκες αντίδρασης PCR για την ενίσχυση τμήματος της VP1 γενωμικής περιοχής

Ζεύγη Εκκινητών	Συνθήκες Αντίδρασης PCR
DWV 7F DWV 7R	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 53°C για 20sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 2sec } 35 cycles
VP1 F VP1 R	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50°C για 20sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 2sec } 35 cycles

3.7. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Cat. No. BIO-41025, Bionline), συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE IX (Tris-Boric acid-EDTA, PanReac AppliChem), που περιέχει 0,6μl βρωμιούχο αιθίδιο συγκέντρωσης 1pg/ml. Από το προϊόν κάθε PCR χρησιμοποιήθηκαν 10 μl, τα οποία αφού αναμείχθηκαν με 2μl χρωστικής (Loading Buffer 10X, Takara, Japan), μεταφέρθηκαν στο πήκτωμα και αναλύθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης (Cleaver Scientific, Japan) όπου εφαρμόστηκε τάση 130V. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων της PCR στο πήκτωμα αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας. Ο προσδιορισμός του μεγέθους των προϊόντων της αντίδρασης έγινε με την βοήθεια μάρτυρα μοριακού βάρους 100bp PlusBlueDNA ladder (GeneOn, Germany).

3.8. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ DWV ΣΤΗ VP1 ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ.

Καθώς σε επιβεβαιωμένα θετικά για τον ιό δείγματα, δεν υπήρξαν αποτελέσματα ανίχνευσης μέσω της VP1 περιοχής σχεδιάστηκαν νέα εκκινητικά μόρια. Ειδικότερα, στόχος του σχεδιασμού ήταν η ανίχνευση και η ταυτοποίηση του ιού μέσω συντηρημένων περιοχών της VP1. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε σχεδιασμός

εκκινητικών μορίων στη VP1 γενωμική περιοχή για: α) την ανίχνευση στελεχών DWV τύπων Α και Β, β) τυποποίηση στελεχών DWV μόνο τύπου Α και γ) τυποποίηση στελεχών DWV μόνο του τύπου Β

Η αναγνώριση και επιλογή των συντηρημένων περιοχών έγινε με ομοπαράθεση αλληλουχιών ολόκληρων γονιδιωμάτων στελεχών του ιού που είναι κατατεθειμένες στη παγκόσμια τράπεζα γονιδιωμάτων (GenBank). Οι αλληλουχίες που επιλέχθηκαν για την εύρεση συντηρημένων περιοχών μεταξύ στελεχών Α και Β, μεταξύ στελεχών Α και μεταξύ στελεχών Β, περιγράφονται στους πίνακες 9 και 10 αντίστοιχα.

Τα κριτήρια επιλογής των αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: α) να είναι διαθέσιμη ολόκληρη η αλληλουχία του γονιδιωμάτος τους στη παγκόσμια τράπεζα αλληλουχιών (Gen Bank), β) να είναι χαρακτηρισμένα στελέχη ως Α ή Β, και γ) να προέρχονται από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές.

Η στοίχιση των αλληλουχιών και η αναγνώριση συντηρημένων γονιδιακών περιοχών στη VP1 πραγματοποιήθηκε με το εργαλείο ανάλυσης νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και ανάλυσης εξελικτικής γενετικής Mega12 (Kumar, et.al, 2024). Ο καθορισμός των ορίων της VP1 στις αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν έγινε μετά τη στοίχιση των αλληλουχιών, και βάση του πρότυπου Α στελέχους (Accession Number: AY292384), όπου η VP1 οριζεται μεταξύ των 2.592 nt- 3.839nt (Fei, et al, 2019).

Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε μέσω προγράμματος Primer 3 (Ntergasse et al, 2012). Για τον σχεδιασμό των εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες των πρότυπων στελεχών, DWV-A με Accession Number: AY292384 και DWV-B με Accession Number: AY251269. Οι προδιαγραφές που ορίστηκαν για τη δημιουργία των εκκινητών ήταν οι εξής: μέγεθος εκκινητή (primer size) από 18 έως 27 νουκλεοτίδια, θερμοκρασία υβριδισμού (Tm) από 55⁰C έως 60⁰C και περιεκτικότητα σε γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C, GC content), με ελάχιστο όριο 40 και μέγιστο 60. Η αναζήτηση του σχεδιασμού ξεκίνησε με την ελάχιστη τιμή πιθανότητας αναδίπλωσης (self complementarity) για τα δύο άκρα (5':0 και 3':0), για κάθε πιθανό PCR προϊόν που θα μπορούσε να προκύψει μεταξύ των συντηρημένων περιοχών.

Πίνακας 8. Στελέχη που επιλέχθηκαν για το σχεδιασμό εκκινητών για την ανίχνευση στελεχών DWV τύπων Α και Β. Στον πίνακα αναγράφονται κατά σειρά: Accession Number / μέγεθος γονιδιώματος, περιοχή απομόνωσης στελέχους, έτος απομόνωσης στελέχους

Επιλεγμένα στελέχη για το σχεδιασμό εκκινητών ανίχνευσης του DWV	
Χαρακτηρισμένα ως Α	
1.	Accession: AY292384.1 /10,166 bp, Netherlands 2003
2.	Accession: MN746311.1 /10,111 bp, Sweden 2011
3.	Accession: MK262743.1 /10,417 bp, Spain 2015
4.	Accession: PP437941.1 /10,104 bp, Italy 2017
5.	Accession: MF770715.1 /10,167 bp, China 2017,
6.	Accession: PP437962.1 /10,166 bp, North Macedonia 2017
7.	Accession: ON648743.1 /9647 bp, Slovenia 2018,
8.	Accession: OR361523.1 /10,123 bp, UK 2018
9.	Accession: OR361515.1 /10,123 bp, USA 2018
10.	Accession: MW265929.1 /10,165 bp, Syria 2018
11.	Accession: PP766259.1 /10, 117 bp, USA 2023
12.	Accession: PP437914.1 /10,119 bp, Greece 2017 recombinet
Χαρακτηρισμένα ως Β	
13.	Accession: AY251269.1 /10,112 bp, Netherlands 2003
14.	Accession: KX783225.1 /10,112 bp, Belgume 2012
15.	Accession: MK262742.1 /9031 bp, Spain 2015
16.	Accession: PP437943.1 /10,112 bp, Italy 2017
17.	Accession: PP437913.1 /10,131 bp, Greece 2017
18.	Accession: PP437915.1 /10,112 bp, Greece 2017
19.	Accession: PP437961.1 /10,111 bp, North Macedonia 2017
20.	Accession: PP437989.1 /10,090 bp, UK 2017
21.	Accession: OR361538.1 /10,130 bp, USA 2018
22.	Accession: MN565037.1 /10,113 bp, France 2019
23.	Accession: ON648740.1 /10,127 bp, Slovenia 2019
24.	Accession: PP418870.1 /10,173 bp, Austria 2022

Πίνακας 9. Στελέχη που επιλέχθηκαν για το σχεδιασμό εκκινητών για τυποποίηση στελεχών DWV τύπου Α. Στον πίνακα αναγράφονται κατά σειρά: Accession Number / μέγεθος γονιδιώματος, χώρα προέλευσης, χρονολογία δειγματοληψίας

Επιλεγμένα στελέχη για το σχεδιασμό εκκινητών τυποποίησης του τύπου DWV-A	
1.	Accession:MG831201.1 /10,188 bp USA 2015,
2.	Accession: MG831202.1 /10,188 bp USA 2015
3.	Accession: MK262743.1 /10,417 bp Spain 2015
4.	Accession: PP437974.1 /10,163 bp Serbia 2017
5.	Accession: PP437972.1 /10,149 bp Romania 2017
6.	Accession: PP437970.1 /10,169 bp Romania 2017
7.	Accession: PP437969.1 /10,156 bp Romania 2017
8.	Accession: PP437968.1 /10,183 bp Romania 2017
9.	Accession: PP437967.1 /10,166 bp Romania 2017

10. Accession: PP437966.1 /10,181 bp Romania 2017
11. Accession: PP437965.1/10,169 bp Romania 2017
12. Accession: PP437962.1 /10,166 bp North Macedonia 2017
13. Accession: PP437958.1 /10,150 bp North Macedonia 2017
14. Accession: PP437954.1 /10,099 bp North Macedonia 2017
15. Accession: PP437952.1 /10,101 bp North Macedonia 2017
16. Accession: PP437948.1 /10,164 bp Moldova 2017
17. Accession: PP437947.1 /10,150 bp Moldova 2017
18. Accession: PP437946.1 /10,142 bp Moldova 2017
19. Accession: PP437945.1 /10,137 bp Moldova 2017
20. Accession: PP437944.1 /10,148 bp Moldova 2017
21. Accession: PP437941.1 /10,104 bp Italy 2017
22. Accession: PP437938.1 /10,140 bp Italy 2017
23. Accession: PP437937.1 /10,137 bp Italy 2017
24. Accession: PP437935.1 /10,137 bpItaly 2017
25. Accession: PP437936.1 /10,137 bpItaly 2017
26. Accession: PP437935.1 /10,137 bp Italy 2017
27. Accession: PP437934.1 /10,088 bp Italy 2017
28. Accession: PP437933.1 /10,145 bp Italy 2017
29. Accession: PP437932.1 /10,139 bp Italy 2017
30. Accession: PP437930.1 /10,137 bp Italy 2017
31. Accession: PP437929.1 /10,100 bp Italy 2017
32. Accession: PP437922.1 /10,158 bp Croatia 2017
33. Accession: PP437920.1 /10,143 bp Croatia 2017
34. Accession: PP437918.1 /10,137 bp Croatia 2017
35. Accession: PP437929.1 /10,100 bp Croatia 2017
36. Accession: PP437927.1 /10,107 bp Croatia 2017
37. Accession: PP437890.1 /10,165 bp Spain 2017
38. Accession: MN538208.1 /10,099 bp New Zealand 2017
39. Accession: MW265929.1 /10,165 bp Syria 2018
40. Accession: OR361523.1 /10,123 bp UK 2018
41. Accession: OR361524.1 /10,123 bp UK 2018
42. Accession: OR361525.1 /10,122 bp UK 2018
43. Accession: OR361526.1 /10,127 bp UK 2018
44. Accession: OR361527.1 /10,123 bp UK 2018
45. Accession: OP972874.1 /10,104 bp South Korea 2022
46. Accession: PP766259.1 /10,117 bp USA 2023
47. Accession: OR130297.1 /9,559 bp Irak 2023

Πίνακας 10. Στελέχη που επιλέχθηκαν για το σχεδιασμό εκκινήτων για τυποποίηση στελεχών DWV τύπου B. Στον πίνακα αναγράφονται κατά σειρά: Accession Number / μέγεθος γονιδιώματος, χώρα προέλευσης, χρονολογία δειγματοληψίας

Επιλεγμένα στελέχη για το σχεδιασμό της ταυτοποίησης του τύπου DWV-B

1. Accession: AY251269 .1 /10,112 bp, Netherlands 2003
2. Accession: KX783225.1 /10112 bp, Belgume 2012
3. Accession: MN538209.1 /10,111 bp, Netherlands 2014
4. Accession: PP437884.1 /10,120 bp, Germany 2015
5. Accession: PP437882.1 /10,120 bp, Germany 2015
6. Accession: MK262742.1 /9031 bp, Spain 2015
7. Accession: PP437895.1 /10,111 bp, Spain 2017
8. Accession: PP437891.1 /10,118 bp, Spain 2017
9. Accession: PP437889.1 /10,120 bp, Spain 2017
10. Accession: PP437887.1 /10,117 bp, Spain 2017
11. Accession: PP437886.1 /10,133 bp, Spain 2017
12. Accession: PP437898.1 /10,119 bp, Spain 2017
13. Accession: PP437897.1 /10,080 bp, Spain 2017
14. Accession: PP437891.1 /10,118 bp, Spain 2017
15. Accession: PP437989.1 /10,090 bp, UK 2017
16. Accession: PP437986.1 /10,118 bp, UK 2017
17. Accession: PP437985.1 /10,118 bp, UK 2017
18. Accession: PP437984.1 /10,116 bp, UK 2017
19. Accession: PP437981.1 /10,096 bp, UK 2017
20. Accession: PP437976.1 /10,111 bp, UK 2017
21. Accession: PP437975.1 /10,111 bp, UK 2017
22. Accession: PP437973.1 /10,085 bp, Serbia 2017
23. Accession: PP437971.1 /10,110 bp, Romania 2017
24. Accession: PP437963.1 /10,086 bp, North Macedonia 2017
25. Accession: PP437961.1 /10,111 bp, North Macedonia 2017
26. Accession: PP437960.1 /10,119 bp, North Macedonia 2017
27. Accession: PP437957.1 /10,112 bp, North Macedonia 2017
28. Accession: PP437956.1 /10,116 bp, North Macedonia 2017
29. Accession: PP437939.1 /10,092 bp, Italy 2017
30. Accession: PP437942.1 /10,112 bp, Italy 2017
31. Accession: PP437943.1 /10,112 bp, Italy 2017
32. Accession: PP437931.1 /10,110 bp, Italy 2017
33. Accession: PP437928.1 /10,118 bp, Italy 2017
34. Accession: PP437928.1 /10,118 bp, Croatia 2017
35. Accession: PP437926.1 /10,111 bp, Croatia 2017
36. Accession: PP437925.1 /10,077 bp, Croatia 2017
37. Accession: PP437924.1 /10,112 bp, Croatia 2017
38. Accession: PP437923.1 /10,076 bp, Croatia 2017
39. Accession: PP437921.1 /10,111 bp, Croatia 2017
40. Accession: PP437919.1 /10,111 bp, Croatia 2017
41. Accession: PP437917.1 /10,111 bp, Croatia 2017
42. Accession: PP437916.1 /10,111 bp, Greece 2017
43. Accession: PP437915.1 /10,112 bp, Greece 2017

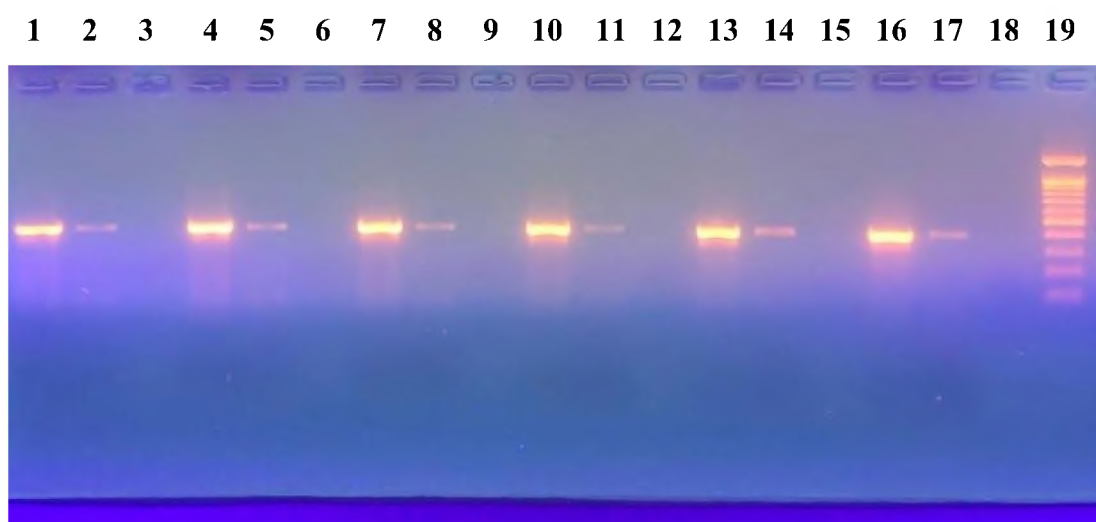
44. Accession: PP437913.1 /10,131 bp, Greece 2017
45. Accession: PP437912.1 /10,111 bp, France 2017
46. Accession: PP437911.1 /10,112 bp, France 2017
47. Accession: PP437906.1 /10,118 bp, France 2017
48. Accession: PP437905.1 /10,111 bp, France 2017
49. Accession: PP437901.1 /10,109bp,France 2017
50. Accession: OR361542.1 /10,130 bp, USA 2018
51. Accession: OR361541.1 /10,130 bp, USA 2018
52. Accession: OR361540.1 /10,130 bp, USA 2018
53. Accession: OR361539.1 /10,130 bp, USA 2018
54. Accession: OR361538.1 /10130 bp, USA 2018
55. Accession: OR361560.1 /10,130 bp, USA 2018
56. Accession: OR361558.1 /10,130 bp, USA 2018
57. Accession: OR361557.1 /10,130 bp, USA 2018
58. Accession: OR361556.1 /10,130 bp, USA 2018
59. Accession: OR361555.1 /10,130 bp, USA 2018
60. Accession: OR361554.1 /10,130 bp, USA 2018
61. Accession: OR361553.1 /10,130 bp, USA 2018
62. Accession: OR361552.1 /10,130 bp, USA 2018
63. Accession: OR361549.1 /10,135 bp, USA 2018
64. Accession: ON648740.1 /10127 bp, Slovenia 2019
65. Accession: MN565037.1 /10113 bp, France 2019
66. Accession: OP972876.1 /10,157 bp, South Korea 2022
67. Accession: OP748245.1 /10,142 bp, China 2022
68. Accession: PP418870.1 /10, 173 bp, Austria 2022
69. Accession: PP936185.1 /10,115 bp, Iraq 2023
70. Accession: PQ672001.1 /10,159 bp, USA 2024

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΤΗΝ RdRp ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ

Αποτελέσματα GRAD-PCR

Στην εικόνα 21 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου της RdRp, με τη χρήση εκκινητών της βιβλιογραφίας (Nielsen et al, 2008), από τον έλεγχο της βέλτιστης θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών δύο ενδεικτικών δειγμάτων, των S3 και S5 (**Gradient PCR**). Το αναμενόμενο προϊόν είναι στις 396 βάσεις.



Εικόνα 21. Πήκτωμα αγαρόζης της ηλεκτροφόρησης των αποτελεσμάτων της Gradient PCR, για τις θερμοκρασίες υβριδοποίησης των 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C και 60°C. Στις θέσεις 1 και 2, 4 και 5, 7 και 8, 10 και 11, 13 και 14, 16 και 17, τοποθετήθηκαν τα προϊόντα των αντιδράσεων των δειγμάτων S3 και S5 που υποβλήθηκαν στους 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C και στους 60°C αντίστοιχα, ενώ στις θέσεις 3, 6, 9, 12, 15 και 18, τοποθετήθηκε ο αντίστοιχος αρνητικός μάρτυρας της κάθε αντίδρασης και στη θέση 19 ο μάρτυρας μοριακού βάρους.

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης δείχνουν πως, τα δείγματα έχουν ενισχυθεί σωστά καθώς σύμφωνα με το μάρτυρα όλες οι ζώνες των προϊόντων βρίσκονται στο αναμενόμενο ύψος των 400bp, ενώ ως βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού επιλέχθηκαν οι 55°C, στους 35 κύκλους αντίδρασης.

Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης αντιδραστηρίων

Το πρωτόκολλο και οι συνθήκες θερμοκρασίας που επιλέχθηκαν ως βέλτιστα για την εφαρμογή PCR, για την ανίχνευση του DWV στην RdRp γενωμική περιοχή παρουσιάζονται στους πίνακες 11 και 12 αντίστοιχα.

Πίνακας 11. Ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση για την ανίχνευση του DWV μέσω της RdRp περιοχής.

Συστατικά	Τελική Συγκέντρωση	Όγκος / 25μl αντίδρασης
H ₂ O	-	15,9 μl
Xpert Buffer (5x)	1x(3mM MgCl ₂ / 4Mm dNTPs)	5 μl
Primer F (10pmol/μl)	0,5 pmol/μl	0,5 μl
Primer R (10pmol/μl)	0,5 pmol/μl	0,5 μl
Xpert Taq (5u/μl)	0,5 u	0,1 μl
cDNA		3 μl

Πίνακας 12. Συνθήκες αντίδρασης για την ανίχνευση μέσω της RdRp.

Ένζυμο	Συνθήκες Αντίδρασης
Taq-DNA Polymerase (0,5 U)	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 55°C για 20sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 2sec 35cycles

Ανίχνευση του DWV στα δείγματα μελισσών

Εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο ανίχνευσης που περιγράφηκε παραπάνω, όλα τα δείγματα μελισσών του πίνακα 1, υποβλήθηκαν σε αντίδραση PCR για τη ανίχνευση του ιικού cDNA μέσω της RdRp γενετικής περιοχής και έλεγχος των προϊόντων με ηλεκτροφόρηση. Από τα 26 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, τα 25 βρέθηκαν θετικά για την παρουσία του DWV (Πίνακας 13).

Πίνακας 13. Αποτελέσματα PCR για την RdRp στα δείγματα μελισσών της παρούσας εργασίας.

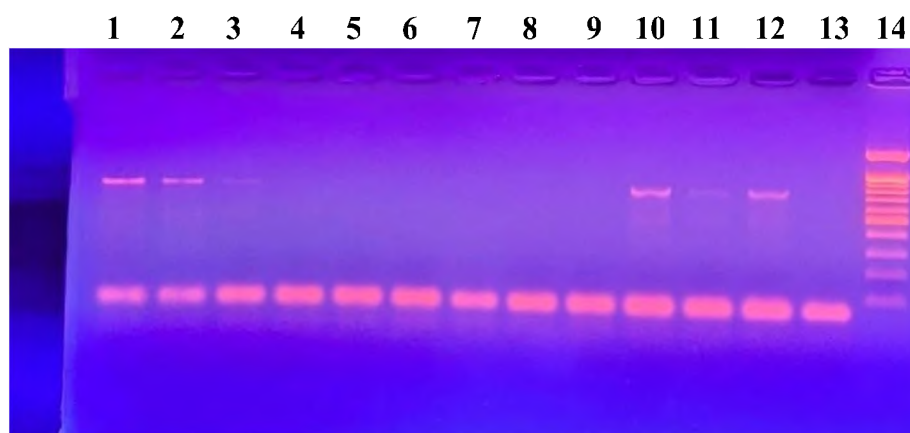
Αποτελέσματα PCR για την RdRp			
Κωδικός δείγματος	Αποτελέσματα PCR	Κωδικός δείγματος	Αποτελέσματα PCR
S1	Positive	S14	Positive
S2	Positive	S15	Positive
S3	Positive	S16	Positive
S4	Positive	S17	Positive
S5	Positive	S18	Positive
S6	Positive	S19	Positive

S7	Positive	S20	Negative
S8	Positive	S21	Positive
S9	Positive	S22	Positive
S10	Positive	S23	Positive
S11	Positive	S24	Positive
S12	Positive	S25	Positive
S13	Positive	S26	Positive

4.2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΣΤΗ VP1 ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ.

4.2.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ VP1.

Τα δείγματα που βρέθηκαν θετικά για την παρουσία του ιού ελέγχθηκαν με PCR για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου της VP1 με τα ζεύγη των εκκινητών VP1F/VP1R (Fei, et al, 2020) και DWV7F/DWV7R (Fei, et al, 2019). Ενδεικτικά στην εικόνα 22 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR με τη χρήση εκκινητών DWV-7F/DWV-7R, με μέγεθος προϊόντος 783 βάσεις (Fei, et.al, 2019) για τα δείγματα S14, S15, S16, S17, S18, S19, S21, S22, S23, S24, S25 και S26. Στον πίνακα 14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την ενίσχυση τμημάτων της VP1 γενωμικής περιοχής του ιού στα δείγματα μελισσών. Κανένα δείγμα δεν ενισχύθηκε με τους εκκινητές DWV-VP1F/DWV-VP1R, ενώ από τα 25 θετικά για τον ιό δείγματα μόνο τα 6 ενισχύθηκαν με τη χρήση των εκκινητών DWV7F/7R..



Εικόνα 22. Πήκτωμα αгарόζης της ηλεκτροφόρησης των αποτελεσμάτων PCR, για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου της VP1. Στις θέσεις 1 μέχρι 12 έχουν τοποθετηθεί κατά σειρά τα δείγματα S14, S15, S16, S17, S18, S19, S21, S22, S23, S24, S25 και S26, ενώ στη θέση 13 τοποθετήθηκε ο αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης και στη θέση 14 ο μάρτυρας μοριακού βάρους.

Στην παραπάνω εικόνα παρατηρούμε ότι υπάρχει ενίσχυση της περιοχής σε ορισμένα από τα κλινικά δείγματα S14, S15, S16, S24, S25 και S26, καθώς σύμφωνα με το μάρτυρα οι ζώνες των προϊόντων βρίσκονται στο αναμενόμενο ύψος των 800bp.

Πίνακας 14. Αποτελέσματα PCR με τα ζεύγη εκκινητών DWV-VP1 F/R και DWV7F/7R

Αποτελέσματα PCR για την VP1		
Κωδικός δείγματος	Αποτελέσματα PCR DWV-VP1 F/R	Αποτελέσματα PCR DWV7F/7R
S1	Negative	Negative
S2	Negative	Negative
S3	Negative	Negative
S4	Negative	Negative
S5	Negative	Negative
S6	Negative	Negative
S7	Negative	Negative
S8	Negative	Negative
S9	Negative	Negative
S10	Negative	Negative
S11	Negative	Negative
S12	Negative	Negative
S13	Negative	Negative
S14	Negative	Positive
S15	Negative	Positive
S16	Negative	Positive
S17	Negative	Negative
S18	Negative	Negative
S19	Negative	Negative
S21	Negative	Negative
S22	Negative	Negative
S23	Negative	Negative
S24	Negative	Positive
S25	Negative	Positive
S26	Negative	Positive

4.2.2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ DWV ΣΤΗ VP1 ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ.

Αναγνώριση συντηρημένων περιοχών στη VP1 γενωμική περιοχή.

Τα αποτελέσματα της PCR για την ενίσχυση τμήματος της VP1 περιοχής δεν ήταν θετικά σε όλα τα δείγματα. Καθώς οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν από τη βιβλιογραφία ήταν σχεδιασμένοι μόνο με βάση το πρότυπο στελέχος Α, αλλά και καθώς δεν βρέθηκαν στη βιβλιογραφία εκκινητικά μόρια της VP1 του Β στελέχους αλλά ούτε και εκκινητικά μόρια ανίχνευσης της VP1 του ιού, στην παρούσα εργασία σχεδιάστηκαν νέοι εκκινητές για: α) την ανίχνευση στελεχών DWV τύπων Α και Β, β) τυποποίηση στελεχών DWV μόνο τύπου Α και γ) τυποποίηση στελεχών DWV μόνο του τύπου Β, βασισμένοι στις συντηρημένες περιοχές μεταξύ των στελεχών Α και Β για την ανίχνευση του ιού, καθώς και μεταξύ των στελεχών Α και μεταξύ των στελεχών Β και για τη ταυτοποίηση των τύπων Α και Β. Το πρώτο βήμα για το σχεδιασμό των εκκινητών ήταν η αναγνώριση συντηρημένων περιοχών μεταξύ των στελεχών του ιού, καθώς είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι ως καψιδιακή περιοχή δέχεται υψηλή εξελικτική πίεση και ως εκ τούτου αναμένεται να είναι ετερογενής σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Για την εύρεση συντηρημένων περιοχών όπου θα χρησιμοποιούνταν για το σχεδιασμό εκκινητών πραγματοποιήθηκε ομοπαράθεση των αλληλουχιών στελεχών του ιού με το εργαλείο MEGA12. Στην εικόνα 23 απεικονίζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα από την ομοπαράθεση αλληλουχιών στελεχών τύπου Α και Β.

Στον πίνακα 15 αναφέρονται οι συντηρημένες περιοχές που καταγράφηκαν μεταξύ των Α και Β στελεχών. Στους πίνακες 16 και 17 αναγράφονται οι συντηρημένες περιοχές που καταγράφηκαν για τη τυποποίηση στελεχών τύπου Α και Β αντίστοιχα. Καθώς η περιοχή της VP1 δέχεται μεγάλη εξελικτική πίεση και παρουσιάζει πληθώρα μεταλλάξεων, κατά την απομόνωση των συντηρημένων περιοχών συνυπολογίστηκαν ορισμένες περιοχές στις οποίες υπήρχε το πολύ μια βάση διαφορά.



Εικόνα 23. Στοίχιση αλληλουχιών στελεχών DWV-A και DWV-B και αναγνώριση των συντηρημένων περιοχών, με σκοπό το σχεδιασμό εκκινητικών μορίων ανίχνευσης μέσω της VP1. Η συντηρημένη περιοχή του πλαισίου αντιστοιχεί στη περιοχή 3.234 – 3.253 βάση του πρότυπου στελέχους Α (Accession Number: AY292384) και στη περιοχή 3.213 – 3.232 βάση του πρότυπου στελέχους Β (Accession Number: AY251269).

Πίνακας 15. Συντηρημένες περιοχές μεταξύ DWV-A και DWV-B. Η αρίθμηση έγινε βάση της αλληλουχίας του πρότυπου στέλεχους A (Accession Number: AY292384), (* διαφορά σε μία βάση).

Συντηρημένες περιοχές μεταξύ DWV-A και DWV-B (nt), με βάση το πρότυπο στέλεχος A με AccessionNumber: AY292384		
3.150 – 3.169*	3.234 – 3.253	3.417 – 3.445*
3.705 – 3.742*	3.810 – 3.829*	4.008 – 4.042

Πίνακας 16. Συντηρημένες περιοχές μεταξύ A στελεχών για τη περιοχή με βάση το πρότυπο στέλεχος A (Accession Number: AY292384) (* διαφορά σε μία βάση).

Συντηρημένες περιοχές μεταξύ A στελεχών (nt) με βάση το πρότυπο στέλεχος A με AccessionNumber: AY292384		
2.094 – 2.146	2.685 – 2.707*	3.582 – 3.607
2.154 – 2.176	2.842 – 2.875*	3.627 – 3.649*
2.265 – 2.284*	2.922 – 2.950*	3.685 – 3.712*
2.309 – 2.332	3.132 – 3.172*	3.720 – 3.742*
2.613 – 2.632	3.234 – 3.253	3.999 – 4.033*
2.653 – 2.681*	3.460 – 3.489*	4.131 – 4.156*

Πίνακας 17. Συντηρημένες περιοχές μεταξύ B στελεχών (nt), με βάση το πρότυπο στέλεχος B (Accession Number: AY251269)(* διαφορά σε μία βάση).

Συντηρημένες περιοχές μεταξύ B στελεχών, με βάση το πρότυπο στέλεχος B με AccessionNumber: AY251269.		
2.078 – 2.127	2.969 – 2.991*	3.593 – 3.624
2.219 – 2.239*	2.984 – 3.004*	3.626 – 3.647
2.265 – 2.286	3.077 – 3.102	3.680 – 3.702
2.321 – 2.343*	3.122 – 3.147*	3.704 – 3.723*
2.357 – 2.379*	3.221 – 3.246	3.914 – 3.939
2.555 – 2.583*	3.302 – 3.327*	3.998 – 4.026
2.570 – 2.592*	3.395 – 3.417*	4.029 – 4.056
2.603 – 2.640	3.450 – 3.479	4.121 – 4.206
2.771 – 2.805*	3.533 – 3.556*	4.244 – 4.266
2.903 – 2.932*	3.569 – 3.591*	4.295 – 4.317

Σχεδιασμός εκκινητών

Ο σχεδιασμός των εκκινητών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Primer 3 και τις συνθήκες που αναγράφονται στο κεφάλαιο 3.8. Η αναζήτηση του σχεδιασμού ξεκίνησε με την ελάχιστη τιμή πιθανότητας αναδίπλωσης (self complementarity) για τα δύο άκρα (5':0 και 3':0) και ανέβηκε σταδιακά έως ότου υπάρξει αποτέλεσμα, για κάθε πιθανό PCR προϊόν που θα μπορούσε να προκύψει μεταξύ των συντηρημένων περιοχών της εκάστοτε περίπτωσης.

Για τον έλεγχο της συμπληρωματικότητας της πρόσδεσης μεταξύ των εκκινητών και του γονιδιώματος του ιού, οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν ελέγχθηκαν με ομοπαράθεση στο MEGA12 με τις αντίστοιχες αλληλουχίες. Τα αποτελέσματα του σχεδιασμού του Primer 3 ελέγχονταν στα αντίστοιχα αρχεία. Τα ζεύγη των εκκινητών που τελικά επιλέχθηκαν για το σκοπό της παρούσας εργασίας, αναγράφονται στον πίνακα 18, όπου αναφέρεται το όνομα του κάθε εκκινητή, η αλληλουχία, η θέση που αναγνωρίζει πάνω στο γονιδίωμα του ιού, η θερμοκρασία τήξης του (Tm) καθώς και το μέγεθος προϊόντων PCR ανά ζεύγος εκκινητών.

Για την ανίχνευση των DWV (τύπου A και B) σχεδιάστηκαν τα εκκινητικά μόρια DWV-3151F/DWV-4021R. Ο εκκινητής DWV-3151F είναι εκφυλισμένος στη θέση 14 όπου στη θέση αυτή περιέχει τα νουκλεοτίδια A και G, ώστε να αναγνωρίζει αλληλουχίες των τύπων A και B του DWV στην αντίστοιχη θέση του γονιδιώματός τους (βλ εικόνα 24).

Για την ενίσχυση τμήματος της VP1 των στελεχών τύπου A σχεδιάστηκαν τρία εναλλακτικά ζεύγη εκκινητών, τα DWV-A-3151F/DWV-A-3686R, DWV-A-2852F/DWV-A-3584R και DWV-A-2688F/DWV-A-3720R .

Για την ενίσχυση τμήματος της VP1 των στελεχών τύπου B σχεδιάστηκε το ζεύγος εκκινητών DWV-B-2603F/DWV-B-4179R.

Πίνακας 18. Εκκινητές που σχεδιάστηκαν στην παρούσα εργασία. βάση των πρότυπων στελεχών: A (*) με Accession Number: AY292384 και B () με Accession Number: AY251269.**

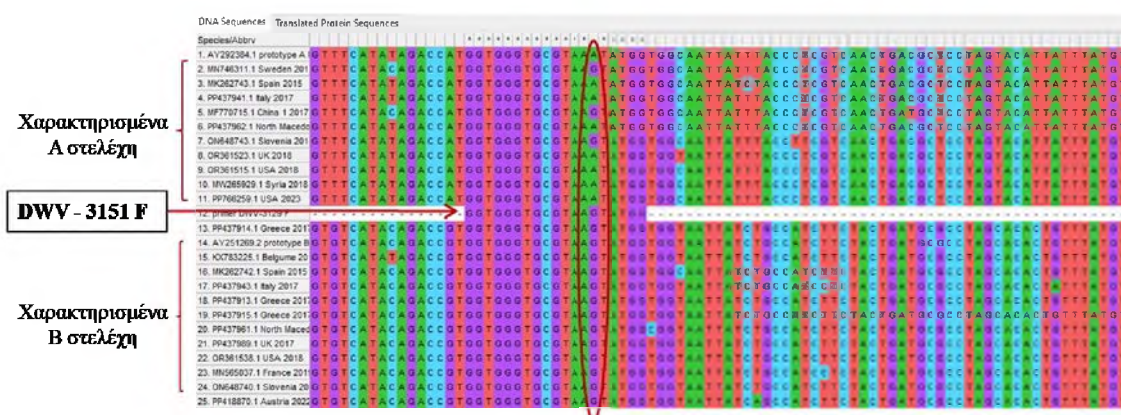
Αποτελέσματα Σχεδιασμού				
Όνομα εκκινητή	Sequence (5'-3')	Θέσεις	Tm°C	PCR προϊόν
DWV-3151 F	GGTGGGTGCGTAARTAT GGT	3151-3169 *	59,57	892bp
DWV- 4021 R	GGTAAACAAGGGAAGGT AAACA	4021-4041 *	57,25	
DWV-B-2603 F	CATTTTGTTCCTACTGGT ATGC	2603-2624**	59,74	1596bp
DWV-B-4179 R	TGGTCGATGTTGTACCC AAA	4179-4198**	57,25	
DWV-A-3151 F	GGTGGGTGCGTAAATAT GGT	3151-3170 *	59,57	556bp
DWV-A-3686 R	TGTTTGGCCTTCTCATCA GTT	3686-3706 *	59,73	
DWV-A-2852 F	TCCATTTGTGGAGCAAA GAA	2852-2871 *	59,25	766bp
DWV-A-3584 R	ACCAGAAGGCCAAACAA CC	3584-3602 *	59,96	
DWV-A-2688 F	GCATTACGTTTGGATGC AG	2688-2706 *	57,72	1052bp
DWV-A-3720 R	CCAGGTCCTTGTGATTA GC	3720-3739 *	57,27	

Έλεγχος αποτελεσμάτων σχεδιασμού

Ο έλεγχος της συμπληρωματικότητας των αλληλουχιών των εκκινητών πραγματοποιήθηκε μέσω των στοιχισμένων αλληλουχιών των στελεχών του ιού στο MEGA12. Στις εικόνες 25 και 26 απεικονίζεται ο έλεγχος της συμπληρωματικότητας των εκκινητών DWV-3151F και DWV-4021R αντίστοιχα, που σχεδιάστηκαν με σκοπό την ενίσχυση της περιοχής μεταξύ συντηρημένων περιοχών και των δύο τύπων A και B.

Στην εικόνα 24, απεικονίζεται η ομοπαράθεση της αλληλουχίας του εκκινητή DWV-3151F (12^η θέση), μεταξύ ομαδοποιημένων στελεχών A και B. Στη εικόνα παρατηρείται πως η αλληλουχία του εκκινητή DWV-3151F έχει πλήρη συμφωνία νουκλεοτιδίων με τις αλληλουχίες των στελεχών του ιού με μια διαφορά 1 βάσης

στη θέση 19 του εκκινητή. Η διαφορά αυτή εμφανίζεται στη θέση 3.163 βάση του πρότυπου στελέχους Α (AY292384). Στη θέση αυτή, στα περισσότερα Α στελέχη υπάρχει το νουκλεοτίδιο της αδενίνης (Α) αντί της γουανίνης (G), η οποία επικρατεί σε όλα τα Β στελέχη. Ωστόσο, η πρόσδεση των εκκινητών πραγματοποιείται μέσω της συμπληρωματικότητας των βάσεων και η πρόσδεση μεταξύ των νουκλεοτιδίων της γουανίνης προτρέπει το σχηματισμό τριών δεσμών υδρογόνου ανά νουκλεοτίδιο, αντί για δύο. Στην αλληλουχία του εκκινητή παρατηρείται αυξημένη περιεκτικότητα γουανίνης και ιδιαίτερα στην αρχή της αλληλουχίας του, αλλά και πως η θέση 3.163 όπου παρατηρείται η διαφοροποίηση, βρίσκεται προς το κέντρο του εκκινητή και μετέπειτα της μεγάλης περιεκτικότητας της γουανίνης.



Εικόνα 24. Έλεγχος συμπληρωματικότητας DWV-3151F (12^η θέση), μεταξύ των χαρακτηρισμένων αλληλουχιών Α και Β. Η επιλεγμένη θέση αντιστοιχεί στην 3.163 του πρότυπου στελέχους Α με Accession Number: AY292384, όπου παρατηρείται διαφοροποίηση μεταξύ των βάσεων.

Στη εικόνα 25 απεικονίζεται η ομοπαράθεση της αλληλουχίας του εκκινητή DWV-4021R, με τις αλληλουχίες των στελεχών Α και Β. Όπως φαίνεται και στην εικόνα, τα αποτελέσματα έδειξαν πως υπάρχει 100% συμφωνία μεταξύ των νουκλεοτιδίων του εκκινητή με όλες τις αλληλουχίες των στελεχών του ιού, μεταξύ των θέσεων 4.021 και 4.041 του πρότυπου στελέχους Α (AY292384).



Εικόνα 25. Έλεγχος συμπληρωματικότητας του εκκινητή DWV- 4021R (12^η θέση) σε συντηρημένη περιοχή της VP1.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αν και η πρώτη αναφορά του DWV στις μέλισσες έγινε το 1999 (Bowen-Walker et al, 1999), μέχρι και σήμερα ο ιός δεν είναι καλά χαρακτηρισμένος, ενώ μέσω βιβλιογραφικής ανασκόπησης παρατηρείται πως η έρευνα γύρω από τον DWV πραγματοποιείται κυρίως τα τελευταία 13 χρόνια.

Στα ελληνικά μελισσοκομεία, ο DWV ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά το 2010 (Bacandritsos, et al, 2010), ενώ μέχρι σήμερα δεν υπάρχει καμία αναφορά για τον καταμερισμό των τύπων στη χώρα. Καθώς λοιπόν η Ελλάδα χαρακτηρίζεται από γεωγραφική και κλιματική ποικιλομορφία, αλλά και σε συνδυασμό με την εκτεταμένη μελισσοκομική δραστηριότητα και το ρόλο του ακάρεος στην παθογένεια του ιού, αναδεικνύεται ανάγκη για συστηματική επιδημιολογική παρακολούθηση και ανάπτυξη στρατηγικών διαχείρισης του DWV στον ελληνικό μελισσοκομικό τομέα.

Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί πως αν και μέχρι σήμερα δεν έχει πραγματοποιηθεί ανίχνευση του ιού σε δείγματα μελιού, καθώς ο ιός ανιχνεύτηκε σε προϊόντα της κυψέλης και ιδιαίτερα στο βασιλικό πολτό (Salkova, et al, 2024), αλλά και σε συνδυασμό με τη δυναμική εξέλιξης του DWV, η παρακολούθησή του χρήζει ιδιαίτερη σημασία.

Για το λόγο αυτό, στη παρούσα εργασία αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο μοριακής ανίχνευσης του DWV, με τη χρήση της μοριακής μεθόδου PCR, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές DWV-FWD/DWV-REV που χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιβλιογραφία για την ανίχνευση του DWV (Nielsen et al, 2008). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πως το συγκεκριμένο ζευγάρι εκκινητών, ενισχύει τμήμα του γονιδίου της RdRp μεταξύ συντηρημένων περιοχών όλων των τύπων του ιού. Οι συνθήκες του πρωτοκόλλου που αναπτύχθηκε, εφαρμόστηκαν σε δείγματα από 26 μελίσσια, εκ των οποίων τα 25 δείγματα βρέθηκαν θετικά στον ιό. Ο DWV είναι ένας RNA ιός θετικής πολικότητας, όπου εμφανίζεται σχεδόν σε όλο τον κόσμο σε δύο κυρίαρχους τύπους A και B, καθώς και σε ανασυνδυασμένα στελέχη μεταξύ αυτών. Είναι ένας ταχύτατα εξελισσόμενος ιός, όπου μέσα από φυλογενετικά δέντρα κυρίως του γονιδιώματος της RdRp, εμφανίζονται διακριτοί κλάδοι για συγκεκριμένες χώρες ή γεωγραφικές ζώνες, υποδηλώνοντας μια πιθανή γεωγραφική εξειδίκευση του ιού, ή ακόμη και μια περιορισμένη γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών των μελισσών (Salkova, et al, 2024).

Ο τύπος A ανταποκρίνεται στον πρώτο τύπο εμφάνισης του ιού στις μέλισσες, ενώ ο τύπος B ανιχνεύτηκε πολύ αργότερα και η εμφάνισή του σχετίστηκε άμεσα με το άκαρι *Varroa destructor*. Αν και στο άκαρι μπορούν να συνυπάρχουν και οι δύο κύριοι τύποι του ιού, μόνο ο DWV-B είναι ικανός να αναπαράγεται σε αυτό, ενώ αντιθέτως, ο DWV-A φαίνεται να απαιτεί την παρουσία της μέλισσας για την αναπαραγωγή του γονιδιώματός του, γεγονός που υποδηλώνει διαφορετικές εξελικτικές στρατηγικές μεταξύ των δύο γονοτύπων προς την παθογένεια και τη δυναμική μετάδοσης του ιού (Gisder and Genersch, 2021). Ωστόσο, σε πρόσφατη μελέτη αναφέρεται πως δεν προκαλούνται διαφορετικές ανοσολογικές αποκρίσεις από τη μόλυνση των DWV-A και DWV-B (Norton, et al, 2024). Αντιθέτως, μέσω της

μόλυνσης μελισσών από την Αυστραλία (καθαρές από άκαρι και τον ιό) με τα δύο κυρίαρχα στελέχη ξεχωριστά, οι ερευνητές παρατήρησαν πως δεν υπήρξε διαφορά στην ανοσολογική απόκριση των μελισσών (Norton, et al, 2024). Τα αποτελέσματα τους έδειξαν πως, η επικράτηση του DWV-B πιθανότατα οφείλεται είτε σε μηχανισμούς του ίδιου του ιού, είτε στο ρόλο του ακάρεος, αλλά όχι σε αλλαγές της ανοσολογικής απόκρισης των μελισσών. Τα ευρήματα αυτά καταδεικνύουν τις διαφοροποιήσεις στην παθοφυσιολογία των δύο στελεχών, επισημαίνοντας την ανάγκη για διακριτή προσέγγιση στην αξιολόγηση και διαχείριση της υγείας των αποικιών μελισσών.

Η πιστοποίηση του εκάστοτε τύπου του ιού στις μέλισσες, μπορεί επίσης να υποδηλώσει το λόγο εκδήλωσης συμπτωμάτων ανάμεσα στην ύπαρξη μικρόσωμων μελισσών και χαμηλής δραστηριότητας της κυψέλης, με το θάνατο των μελισσών. Συγκεκριμένα, η εκδήλωση των παραμορφωμένων φτερών στις μέλισσες είναι κοινό σύμπτωμα και για τους δύο κυρίαρχους τύπους του ιού, ενώ από τη μόλυνση του τύπου A οι περισσότερες μέλισσες καταλήγουν στο θάνατο και από τη μόλυνση του τύπου B παρατηρούνται κυρίως παραμορφώσεις στο σώμα (Barth, et al, 2024), πιθανότατα εξαιτίας της συσχέτισης του τύπου B με το άκαρι, το οποίο τρέφεται από τις μέλισσες και εξασθενεί το ανοσοποιητικό τους.

Ωστόσο, καθώς ο ιός ακόμα εξελίσσεται και σχηματίζει νέα ανασυνδυασμένα στελέχη μεταξύ των δύο τύπων, η παρακολούθηση των ανασυνδυασμών (Liu and Maclachlan, 2016), αλλά και η συσχέτισή τους με τα συμπτώματα στις μέλισσες, θα μπορούσε να δώσει χρήσιμες πληροφορίες γύρω από την ιστορία και τη μολυσματικότητα του ιού. Επίσης, εξαιτίας της δημιουργίας των ανασυνδυασμένων στελεχών, απαιτείται τυποποίηση όλων των περιοχών του γονιδιώματος, προκειμένου να χαρακτηριστεί ο τύπος του εκάστοτε στελέχους.

Για το σκοπό αυτό, στη παρούσα εργασία σχεδιάστηκε πρωτόκολλο μοριακής ανίχνευσης του ιού, μέσω της VP1 γενωμικής περιοχής. Αρχικά, στη παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε πρωτόκολλο PCR με τη χρήση των εκκινητών VP1F/VP1R και DWV7F/DWV7R (Fei, et al, 2019, 2020). Το πρωτόκολλο εφαρμόστηκε στα 25 θετικά στη παρουσία του ιού δείγματα, με τα αποτελέσματα η ενίσχυσης της VP1 περιοχής, να επιτυγχάνεται σε 6 από αυτά, μόνο με τη χρήση του ζεύγους των εκκινητών DWV7F/DWV7R.

Μετά από αναζήτηση της βιβλιογραφίας, παρατηρήθηκε πως όλα τα εκκινητικά μόρια που βρέθηκαν να έχουν σχεδιαστεί για την ενίσχυση τμήματος της περιοχής, είναι σχεδιασμένα βασιζόμενα στο πρότυπο στέλεχος A του ιού, ενώ δεν εντοπίστηκε κανένα εκκινητικό ζευγάρι που να χρησιμοποιείται ευρέως από τους ερευνητές για την ανίχνευση όλων των τύπων του ιού μέσω της VP1. Αντιθέτως η ακριβής χαρτογράφηση ολόκληρου του γονιδιώματος και ιδιαίτερα της καψιδιακής περιοχής, παραμένουν μέχρι σήμερα αδιευκρίνιστα. Για το λόγο αυτό, στη παρούσα εργασία έγινε μια προσπάθεια σχεδιασμού νέων εκκινητικών μορίων, με στόχο την ενίσχυση τμήματος της γενωμικής περιοχής VP1, με τη μέθοδο της PCR.

Όπως αναλύθηκε και παραπάνω (βλ. Κεφ. Υλικά και μέθοδοι), στη παρούσα μελέτη σχεδιάστηκαν νέα ζευγάρια εκκινητών, που στοχεύουν στην ενίσχυση τμημάτων της VP1 μεταξύ συντηρημένων περιοχών, είτε ως ένδειξη ανίχνευσης του DWV, είτε ως ένδειξη ανίχνευσης των τύπου DWV-A, ή DWV-B, με τη χρήση της μεθόδου PCR. Πιο συγκεκριμένα, το ζευγάρι DWV-3151F/DWV-4021R, σχεδιάστηκε για την ενίσχυση τμήματος του γονιδίου της VP1 μέσω συντηρημένων περιοχών ανάμεσα και στα δύο στελέχη A και B, με αποτέλεσμα, πιθανώς να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εκκινητικό ζευγάρι της αντίδρασης PCR, για την ανίχνευσης και των δύο κυρίαρχων στελεχών του ιού στην Ευρώπη. Επισημαίνεται πως ο διαχωρισμός των συντηρημένων περιοχών μεταξύ των στελεχών και των δύο τύπων A και B, ήταν μια αρκετά δύσκολη και περιοριστική διαδικασία, καθώς στη συγκεκριμένη περιοχή οι συντηρημένες περιοχές σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ήταν πολύ λίγες και περιορισμένης έκτασης. Επιπλέον, τα ζευγάρια DWV-A-3151F/DWV-A-3686R, DWV-A-2852F/DWV-A-3584R και DWV-A-2688F/DWV-A-3720R, σχεδιάστηκαν για την ανίχνευση των A στελεχών του ιού, ενώ το ζευγάρι DWV-B-2603F/DWV-B-4179R, σχεδιάστηκε για την ανίχνευση των B στελεχών. Αξίζει να σημειωθεί πως ο σχεδιασμός των εκκινητών όχι μόνο στοχεύει στην ενίσχυση γενωμικού τμήματος μεταξύ συντηρημένων περιοχών, αλλά και στη δημιουργία διαφορετικών PCR προϊόντων, με απώτερο σκοπό τον εμφανή διαχωρισμό μέσω ανίχνευσης των δύο τύπων, σε μια αντίδραση PCR πολλαπλών στόχων (multiplex PCR). Έτσι, η ανάπτυξη μοριακού πρωτοκόλλου με τη χρήση των νέων εκκινητών για την ανίχνευση της VP1 γενωμικής περιοχής, αποτελεί ένα βασικό μελλοντικό στόχο.

Ακόμη, για την επεξήγηση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία για την ανίχνευση της VP1 περιοχής με τους εκκινητές που σχεδιάστηκαν στη βιβλιογραφία, οι αλληλουχίες των εκκινητών ελέγχθηκαν για τη συμπληρωματικότητά τους μέσω ομοπαράθεσης των αλληλουχιών τους στο Mega12, ανάμεσα σε ομαδοποιημένα στελέχη A και B. Παρατηρήθηκε πως το ζευγάρι VP1F/VP1R (Fei, et al, 2020), αντιστοιχούσε σε μη συντηρημένες περιοχές μεταξύ των στελεχών, ενώ το ζευγάρι DWV7F/DWV7R (Fei, et al, 2019), αντιστοιχούσε σε μερικώς συντηρημένες θέσεις μεταξύ των A στελεχών. Τα αποτελέσματα αυτά εξηγούν τα αποτελέσματα των πειραμάτων, καθώς δεν βρέθηκε προϊόν ενίσχυσης από την αντίδραση της PCR με το ζεύγος VP1F/VP1R, ενώ φαίνεται πως το πρωτόκολλο ανίχνευσης που σχεδιάστηκε με τη χρήση των DWV7F/DVW7R, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του DWV-A μέσω της VP1 περιοχής.

Επιπλέον, καθώς η ανάπτυξη κυτταρικών σειρών των μελισσών και του *Varroa* δεν είναι εφικτή μέχρι σήμερα, ο μηχανισμός του ιού και η ταυτοποίηση του υποδοχέα της μόλυνσης παραμένουν άγνωστοι. Ωστόσο, με βάση τα εμφανή συμπτώματα των μελισσών και από τα αποτελέσματα ερευνών μέσω *in situ* υβριδισμού, φαίνεται ότι ο ιός ανιχνεύτηκε, στον εγκέφαλο των μελισσών προσβάλλοντας τα νευρικά κύτταρα προκαλώντας νευρολογικές διαταραχές στη συμπεριφορά των εντόμων, στο θώρακα, στις ωοθήκες και στον λιπώδη ιστό της

βασίλισσας (de Miranda and Genersch, 2010), ενώ σε πιο πρόσφατη έρευνα αναφέρεται πως ο ιός ανιχνεύτηκε στο επιθήλιο των κηφώνων αλλά και στο μέσο έντερο των εντόμων (de Miranda, et al, 2023). Ακόμη, από διαφορετική ομάδα ερευνητών, αναφέρεται πως ο DWV μολύνει κυρίως κύτταρα του εντέρου του *Varroa*, ενώ ο ιός ανιχνεύτηκε και στους σιελογόνους αδένες του ακάρεος, από τους οποίους μολύνει απευθείας την αιμόλεμφο των μελισσών (Gisder and Genersch, 2021). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν μια πιθανή εξειδίκευση του ιού προς τα κύτταρα του εντέρου τόσο των μελισσών όσο και του ακάρεος, ενώ αντιθέτως, μεταξύ των συστημάτων αναπαραγωγής του ιού, παρατηρείται μεγαλύτερη εξειδίκευση μεταξύ των τύπων Α και Β, καθώς μόνο ο Β τύπος μπορεί να αναπαράγεται στο άκαρι.

Η ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου για τη μοριακή ανίχνευση και τυποποίηση του DWV είναι σημαντική για τη γρήγορη και με μεγάλη ευαισθησία διάκριση μεταξύ των τύπων του ιού που κυκλοφορούν σε μια περιοχή και για την ευρεία επιτήρησή του. Επιπλέον, η ενίσχυση τμήματος της καψιδιακής περιοχής του γενώματος του DWV, θα μπορεί να οδηγήσει στη μελέτη της συγκεκριμένης περιοχής σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, στη μελέτη των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ στελεχών καθώς στη συγκεκριμένη γενωμική περιοχή και στην αναγνώριση και μελέτη ανασυνδυασμένων στελεχών DWV.

Ένα μελλοντικό βήμα αποτελεί η εφαρμογή των πρωτοκόλλων σε επιπλέον δείγματα μελισσών από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας και ο χαρακτηρισμός του εκάστοτε τύπου των στελεχών έπειτα από αλληλούχιση, με απώτερο σκοπό τον έλεγχο της ευαισθησίας της εφαρμογής, αλλά και τη κατανόηση της κατανομής των στελεχών του ιού στη χώρα. Επιπλέον, για την παρακολούθηση της πρόσδεσης των εκκινητών που σχεδιάστηκαν στην παρούσα εργασία, αλλά και για τον προσδιορισμό του φορτίου του ιού στα δείγματα, εφαρμόζοντάς τους σε realtimePCR. Τέλος, καθώς εμφανίζονται διαφορετικά κλινικά συμπτώματα μεταξύ των δύο κυρίαρχων τύπων DWV-A και DWV-B, αλλά και ο ιός δημιουργεί και ανασυνδυασμένα στελέχη μεταξύ αυτών, παράλληλο μελλοντικό βήμα αποτελεί η ανίχνευση και η τυποποίηση ανασυνδυασμένων στελεχών, καθώς και η συσχέτιση τους με τα κλινικά συμπτώματα στις μέλισσες.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Amiri, E. (2015, October 8). Four Categories of Viral Infection Describe the Health Status of Honey Bee Colonies. *Plos One*, 10(10), 0140272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140272>
2. Amiri, E. (2016, September 9). Deformed wing virus can be transmitted during natural mating in honey bees and infect the queens. *Scientific Reports* (6), 33065. <https://doi.org/10.1038/srep33065>
3. Arevalo B. S., Fernandez-carrion E., Goyache J., Molero F., Puerta F. & Sanchez-Vizcaino J.M. (2019). High load of Deformed Wing Virus and Varroa destructor infestation are related to weakness of honey bee colonies in southern Spain. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1331. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01331>
4. Bacandritsos N, Granato A, Budge G, Papanastasiou I, Roinioti E, Caldon M, Falcaro C, Gallina A, Mutinelli F. J Invertebr Pathol. (2010, September 24) Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies, 105(3):335-40. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.08.004>
5. Balkanska, R. (2023, February 10). Molecular detection and phylogenetic analysis of Deformed Wing Virus and Sacbrood Virus isolated from pollen. *Veterinary Sciences*, 10(2), 140 <https://doi.org/10.3390/vetsci10020140>
6. Barth, S., (2024, May 3). Characterization of a molecular clone of Deformed Wing Virus B. *Viruses*, 16(6), 980. <https://doi.org/10.3390/v16060980>
7. Beaurepaire A. (2020, April 7) Diversity and Global Distribution of Viruses of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. *Insects* 11(4), 239. <https://doi.org/10.3390/insects11040239>
8. Beaurepaire, A. (2020, March 21). Diversity and global distribution of viruses of the Western honey bee, *Apis mellifera*: A review. *Insects*, 11(4), 239. <https://doi.org/10.3390/insects11040239>
9. Bradford, E. L., De Miranda, J. R., Yañez, O., & Ball, B. V. (2017). A real-time PCR method for quantification of the total and major variant strains of the deformed wing virus. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(17), e00696-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190017>
10. Brasesco C. (2020, June 29). Deformed wing virus type A and B in managed honeybee colonies of Argentina. *Bulletin of Entomological Research*, 110(5), 555–562. <https://doi.org/10.1017/S000748532000036X>
11. Britton, N. F. & White K.A.J. (2021). The effect of covert and overt infections on disease dynamics in honey-bee colonies. *Bulletin of Mathematical Biology*, 83(67). <https://doi.org/10.1007/s11538-021-00892-6>
12. Chen, Y., Pettis J.S. & Feldlaufer M.F. (2005). Detection of multiple viruses in queens of the honey bee *Apis mellifera* L. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90(2), 118–121. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.08.005>

13. Chen, Y., Pettis, J. S., Collins, A., & Feldlaufer, M. F. (2005). Detection of multiple viruses in queens of the honey bee *Apis mellifera* L. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90(2), 118–121. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.08.005>
14. Danko Cierra N. (2010). Subcellular localization of the non-structural proteins 3C and ED of DWV. *Bucknell University Honors Theses*, 35. https://digitalcommons.bucknell.edu/honors_theses/35
15. de Miranda, J. R. & Genersch E. (2010). Deformed Wing Virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(1), 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.012>
16. de Miranda, J. R., Brettell L.E., Chejanovsky N., Childers A.K., Dalmon A., Deboutte W., de Graaf D.C., Doublet V., Gebremedhn H., Genersch E., Gisder S., Granberg F., Haddad N.J., Kaden R., Manley R., Matthijssens J., Meeus I., Migdadi H., Milbrath M.O., Mondet F., Remnant E.J., Roberts J.M.K., Ryabov E.V., Sela N., Smagghe G., Somanathan H., Wilfert L., Wright O.N., Stephen J Martin S.J., Ball B.V. (2022). Cold case: The disappearance of Egypt bee virus, a fourth distinct master strain of deformed wing virus linked to honeybee mortality in 1970s Egypt. *Virology Journal*, 19, Article 14. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01740-2>
17. Erban, T., Shcherbachenko, E., Talacko, P., Harant, K., & Markovic, M. (2019). *Varroa destructor* parasitism has a greater effect on proteome changes than the deformed wing virus and activates TGF- β signaling pathways. *Scientific Reports*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45764-1>
18. Fei, D. (2020, November 6). Codon optimization expression in *E. coli* and immunogenicity analysis of DWV structural protein. *PeerJ*, 8, e8750. <https://doi.org/10.7717/peerj.8750>
19. Fei, D., et al. (2019, June 28). Phylogenetic and recombination analyses of two deformed wing virus strains from different honeybee species in China. *PLOS ONE*, 14(6), e0219387. <https://doi.org/10.7717/peerj.7214>
20. Fievet, J. (2006, March 28). Localization of Deformed Wing Virus infection in queen and drone *Apis mellifera* L. *Virology Journal*, 3, 16. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-3-16>
21. 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*), *Veterinary journal* 121-123. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.01.004>
22. Genersch, E. (2010, April 20). Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Veterinary Research*, 41(6), 54. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010027>
23. Genersch, E., & Aubert, M. (2010). Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Veterinary Research*, 41(6), 54. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010027>
24. Genersch, E., Yue, C., Fries, I., & de Miranda, J. R. (2005). Development of a rapid and sensitive RT-PCR method for the detection of deformed wing virus, a pathogen of the honeybee (*Apis mellifera*). *Veterinary Microbiology*, 114(1-2), 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.01.004>

25. Gisder, S. & Genersch, E. (2021). Direct evidence for infection of Varroa destructor mites with the bee-pathogenic Deformed Wing Virus variant B, but not variant A. *Journal of Virology*, 95(4), e01786-20. <https://doi.org/10.1128/jvi.01786-20>
26. Goras, G., Ruether, I., Tanakaki C., Gounari, S., Liolios, V., Kanelis, D., Argana, N., Rodopoulou, M., Karazafiris, E., & Thrasyvoulou A., (2018). Characterization of a novel recombination event in the Deformed wing bee virus polymerase gene. *Veterinary Medical Society*, 68(4), 661-668. <http://dx.doi.org/10.12681/jhvms.16071>
27. Guo, Y., Taylor, L.N., Mishra, R., Dolezal, A.G., Bonning, B.C. (2025). Gut-binding peptides as potential tools to reduce virus binding to honey bee gut surface proteins. *Appl Environ Microbiol.* 2025;91(3):e02418-24. <https://doi.org/10.1128/aem.02418-24>
28. Highfield, A. C. (2009, September 25). Deformed Wing Virus implicated in overwintering honeybee colony losses. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22), 7212–7220. <https://doi.org/10.1128/AEM.02227-09>
29. Karpov, V. (2024, September 13). Molecular characterization and phylogenetic analysis of honeybee (*Apis mellifera*) mite-borne pathogen DWV-A and DWV-B isolated from Lithuania. *Virus Genes*, 60(1), 1–10. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12091884>
30. Kevill, J. L.(2019, March 22). DWV-A lethal to honey bees (*Apis mellifera*): A colony level survey of DWV variants (A, B, and C). *Viruses*, 11(5), 426. <http://dx.doi.org/10.3390/v11050426>
31. Kevill, J. L., (2017, September 20). ABC assay: Method development and application to quantify the role of three DWV master variants in overwinter colony losses of European honey bees. *Viruses*, 9(10), 314. <http://dx.doi.org/10.3390/v9110314>
32. Kevill, J. L., de Souza F.S., Sharples C., Oliver R., Schroeder D.C. and Martin S.J. (2019). DWV-A lethal to honey bees (*Apis mellifera*): A colony level survey of DWV variants (A, B, and C) in England, Wales, and 32 states across the US. *Viruses*, 11(5), 426. <https://doi.org/10.3390/v11050426>
33. Kramar, S. L., Toplak, I., & Jamnikar-Ciglenečki, U. (2024). Identification of twenty-two new complete genome sequences of honeybee viruses detected in *Apis mellifera carnica* worker bees from Slovenia. *Insects*, 15(11), 832. <https://doi.org/10.3390/insects15110832>
34. Kumar S, Stecher G, Suleski M, Sanderford M, Sharma S, and Tamura K (2024),Mega 12 <https://doi.org/10.1093/molbev/msae263>
35. Lamp, B., Url, A., Seitz, K., Eichhorn, J., Riedel, C., Sinn, L. J., & Rümenapf, T. (2016). Construction and rescue of a molecular clone of deformed wing virus (DWV). *PLOS ONE*, 11(10), e0164639. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164639>
36. Lanzi, G., de Miranda J.R., Boniotti M.B., Cameron C.E., Lavazza A., Capucci L., Camazine S.M. and Rossi C. (2006). Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Virology*, 80(10), 4998–5009. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.10.4998-5009.2006>
37. 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. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0041-x>

38. Leclercq, G., Gengler, N., & Francis, F. (2018). How human reshaped diversity in honey bees (*Apis mellifera* L.): A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 22(1), 1–12. <https://doi.org/10.25518/2030-6318.4050>
39. Liu, D. & Maclachlan, J. (2016). Iflavirus, Deformed Wing Virus. In *Molecular detection of animal viral pathogens* (pp. 37–54). CRC Press. ISBN-13:978-1-4987-0037-5
40. Lopes, R.A. (2024, July 15). Origins, diversity, and adaptive evolution of DWV in the honey bees of the Azores: the impact of the invasive mite *Varroa destructor*. *Virus Evolution*, 053(10), <https://doi.org/10.1093/ve/veac053>
41. Martin, S. J. (2001, April 20). The role of Varroa and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: A modeling approach. *Journal of Applied Ecology*, 38(5), 1082–1093. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2001.00662.x>
42. Martin, S. J. (2019, June 11). Deformed Wing Virus in honeybees and other insects. *Annual Review of Virology*, 6, 49–69. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015700>
43. Martin, S. J. Highfield A.C, Brattell L., Villalobos E.M, Bunge G., Powell M., Nikaido S. & Schroeder D.C. (2012). Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science*, 336(6086), 1304–1306. <https://doi.org/10.1126/science.1220941>
44. Mataragka, A.(2020, January 23). Detection of the deformed wing virus of bees using the polymerase chain reaction: a review with reference to method performance. *Journal of Apicultural Research*, 59(1), 1–14. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1702324>
45. Michener, C. D. (2007). *The bees of the world* (2nd ed.). Johns Hopkins University Press. ISBN-13:978-0-8018-8573-0, ISBN-10:0-8018-8573-6
46. Moore, J.C. (2018). Predicting tipping points in complex environmental systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(4), 635–641. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1721206115>
47. Molinatto, G. (2025, July 26). Seasonal variations of the five main honey bee viruses in a three-year longitudinal survey. *Apidologie*, 56(2), 182–196. <https://doi.org/10.1007/s13592-025-01147-2>
48. Mordecai, G. J.(2015, October 27). Superinfection exclusion and the long-term survival of honey bees in *Varroa*-infested colonies. *ISME Journal*, 10(5), 1264–1272. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.186>
49. Mordecai, G. J., Wilfert, L., Martin, S. J., Jones, I. M., & Schroeder, D. C.(2016). Diversity in a honey bee pathogen: first report of a third master variant of the deformed wing virus quasispecies. *The ISME Journal*, 10(5), 1264–1272. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.178>
50. Nazzi, F. (2016, December 14). Ecology of *Varroa destructor* and interactions with honey bee hosts. *Current Opinion in Insect Science*, 14, 122–127. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023731>
51. Nielsen, S. L., Nicolaisen M. & Kryger P. (2008). Incidence of acute bee paralysis virus, black queen cell virus, chronic bee paralysis virus, deformed wing virus,

- Kashmir bee virus and sacbrood virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Denmark. *Apidologie*, 39(3), 310–314. <https://doi.org/10.1051/apido:2008007>
52. Noordyke, E. R., & Ellis, J. D.(2021). Reviewing the efficacy of pollen substitutes as a management tool for improving the health and productivity of western honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 772897. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.772897>
 53. Norton, A. M., Buchmann, G., Ashe, A., Watson, O. T., Beekman, M., & Remnant, E. J. (2021). Deformed wing virus genotypes A and B do not elicit immunologically different responses in naïve honey bee hosts. *Frontiers in Microbiology*, 12, 631889. <https://doi.org/10.1111/imb.12948>
 54. Ntergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth B. C., Remm M. and Rozen S. G., (2012) *Primer3—new capabilities and interfaces*. 1;40(15):e115 <http://frodo.wi.mit.edu/primer/>
 55. O’Shea-Wheller, T. A., Hall, A., Stainton, K., Tomkies, V., Budge, G. E., Wilkins, S., & Jones, B. (2025). A large-scale study of *Varroa destructor* treatment adherence in apiculture. *Entomologia Generalis*, 45(1), 127–136. <https://doi.org/10.1127/entomologia/2024/2758>
 56. Organtini L.J., Shingler K.L., Ashley R.E., Capaldi E.A., Durrani K., Dryden K.A., Makhov A. M. & Conway J. F. (2017). Honey bee deformed wing virus structures reveal that conformational changes accompany genome release. *Journal of Virology*, 91(17), e01795-16. <https://doi.org/10.1128/jvi.01795-16>
 57. Paxton, R. J., Schafer M.O., Nazzi F., Zanni V., Annoscia D., Marroni F., Bigot D., Laws-Quinn R.E., Panziera D., Jenkins C., Shaf H. (2022). Epidemiology of a major honey bee pathogen, deformed wing virus: Potential worldwide replacement of genotype A by genotype B. *Current Opinion in Insect Science*, 50(18), 157-171. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2022.04.013>
 58. Piou, V., Schurr, F., Dubois, E., & Vétillard, A. (2024). Transmission of deformed wing virus between *Varroa destructor* foundresses, mite offspring and infested honey bees. *Scientific Reports*, 14, 2351. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05463-9>
 59. Pöhlmann, S., & Bergelson, J. M. (2013). Picornavirus. In *Viral entry into host cells* (Ch. 2, pp. 39–58). Springer Science. ISBN: 978-1-4614-7650-4
 60. Procházková, M., Škubník K., Füzik T., Mukhamedova L., Přidal A., Plevka P. (2020). Virion structures and genome delivery of honeybee viruses. *Virus Research*, 285, 197989. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.06.007>
 61. Rahman, M. T., Uddin, M. S., Sultana, R., & Mhil, A. M. (2013). Polymerase chain reaction (PCR): A short review. *AKMMC Journal*, 4(1), 30–36. <https://doi.org/10.3329/akmmcj.v4i1.13682>
 62. Reuscher, C. M., Barth S., Gockel F., Netsch A., Seitz K., Rümenapf T. and Lamp B. (2023). Processing of the 3C/D region of the Deformed Wing Virus (DWV). *Viruses*, 15(12), 2344. <https://doi.org/10.3390/v15122344>

63. Rosenkranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of Varroa destructor. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(S1), S96–S119.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>
64. Ryabov, E. V. (2014, June 26). A virulent strain of Deformed Wing Virus (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) prevails after Varroa destructor-mediated transmission and colony collapse. *PLoS Pathogens*, 10(2), e1004230.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004230>
65. Sadiq, A., Al-Khafaji, N. J., & Al-Attar, M. A. (2024). Complete genome sequence of deformed wing virus isolated from honeybees (*Apis mellifera* L.) in Iraq. *Microbiology Resource Announcements*, 13(1), e01023-23. <https://doi.org/10.1128/mra.00770-24>
66. Salkova, D., Balkanska R., Shumkova R., Lazarova S., Radoslavov G. and Hristov P. (2024, June 26). Molecular detection and phylogenetic relationships of honey bee-associated viruses in bee products. *Veterinary Sciences*, 11(8), 369.
<https://doi.org/10.3390/vet11080369>
67. Schurr, F., Tison, A., & Siede, R. (2019). Validation of quantitative real-time RT-PCR assays for the detection of six honeybee viruses. *Journal of Virological Methods*, 269, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.04.020>
68. Sguazza, G. H., Reynaldi, F. J., Galosi, C. M., & Pecoraro, M. R. (2013). Simultaneous detection of bee viruses by multiplex PCR. *Journal of Virological Methods*, 193(2), 633–640. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.08.003>
69. Sircoulomb, F. (2025, February 8). Genotype B of deformed wing virus and related recombinant viruses become dominant in European honey bee colonies. *Viruses*, 17(3), 135. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-86937-5>
70. Skubník, K., Nováček J. & Füzik T. (2017). Structure of deformed wing virus, a major honeybee pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(48), 13075–13080. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615695114>
71. Sorvillo, C., Malabusini, S., Holzer, E., Frasnelli, M., Giovanetti, M., Lavazza, A. and Lupi, D. (2025). Urban green areas: Examining honeybee pathogen spillover in wild bees through shared foraging niches. *Applied Sciences*, 15(6), 2879.
<https://doi.org/10.3390/app15062879>
72. Souza, F. S. de. (2020, November 8). DWV prevalence and load in honeybees in South Africa. *ResearchGate*. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-020-04863-5>
73. Tehel, A., Brown, M. J. F., & Paxton, R. J. (2016). Impact of managed honey bee viruses on wild bees. *Current Opinion in Virology*, 19, 16–22.
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.06.006>
74. Tehel, A., Streicher, T., Tragust, S., & Paxton, R. J. (2019). The two prevalent genotypes of an emerging infectious disease, deformed wing virus, cause equally low pupal mortality and equally high wing deformities in host honey bees. *Viruses*, 11(1), 46. <http://dx.doi.org/10.3390/v11020114>
75. Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M. E., & Bergoin, M. (2004). Polymerase chain reaction detection of deformed wing virus

- (DWV) in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie*, 35(4), 431–439.
<https://doi.org/10.1051/apido:2004021>
76. Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M. E., & Bergoin, M. (2005). Comparative analysis of deformed wing virus (DWV) RNA in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie*, 36(1), 49–61.
<https://doi.org/10.1051/apido:2005057>
 77. Traynor, K. S., Mondet, F., de Miranda, J. R., Techer, M., Kowallik, V., Oddie, M. A. Y., Chantawannakul, P., & McAfee, A. (2020). *Varroa destructor*: A complex parasite, crippling honey bees worldwide. *Trends in Parasitology*, 36(7), 592–606.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.004>
 78. Underwood, E., Darwin, G. & Gerritsen, E. (2017). Pollinator initiatives in EU member states: Success factors and gaps. *Institute for European Environmental Policy Report*. https://www.cooksinfo.com/wp-content/uploads/world-bee-day-ieep_2017_pollinator_initiatives_in_eu_member_states.pdf
 79. Vasiliev, D. & Greenwood, S. (2020). Pollinator biodiversity and crop pollination in temperate ecosystems, implications for national pollinator conservation strategies. *Science of the Total Environment*, 744, 140909.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140880>
 80. Wilfert, L. (2016, February 5). Deformed Wing Virus is a recent global epidemic in honeybees driven by Varroa mites. *Science*, 351(6273), 594–597.
<https://doi.org/10.1126/science.aac9976>
 81. Williams, R. C. (1989). Restriction fragment length polymorphism (RFLP). *American Journal of Physical Anthropology*, 78(5), 525–532.
<https://doi.org/10.1002/ajpa.1330320508>
 82. Wu, Y., Yuan X., Li J. & Kadowaki T. (2021). DWV infection *in vitro* using honey bee pupal tissue. *Viruses*, 13(2), 291. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.631889>
 83. Yoo M.S. (2023, June 10). First identification of *Tyrophagus curvipenis* (Acari: Acaridae) and pathogen detection in *Apis mellifera* colonies in the Republic of Korea. *Veterinary Sciences*, 10(6), 377. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36695-z>
 84. Zhang, Z., & Villalobos, E. M. (2024, March 4). Seasonal variability in the prevalence of DWV strains in individual colonies of European honeybees in Hawaii. *Insects*, 15(4), 219. <https://doi.org/10.3390/insects15040219>
 85. Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M., & Neužil, P. (2020). PCR past, present and future. *BioTechniques*, 68(6), 307–316. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0057>
 86. Zioni, N., Soroker, V., & Chejanovsky, N. (2011). Replication of Varroa destructor virus 1 (VDV-1) and a Varroa destructor virus 1–deformed wing virus recombinant (VDV-1–DWV) in the head of the honey bee. *Virology*, 417(1), 106–112.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.05.009>