

Corso di Aggiornamento per Medici Veterinari

“Riconoscere e Gestire le Patologie delle Api nel Rispetto della Sicurezza dei Prodotti dell’Alveare”

IZSLT – Regione Lazio - Regione Toscana - CERERE

09 e 11 ottobre 2013



Le VIROSI delle API: SINTOMATOLOGIA e DIAGNOSI

Antonio Lavazza

Antonella Cersini

Giusy Cardeti

Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana, Roma

Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell’Emilia Romagna
Brescia

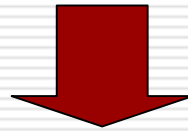


Istituto Zooprofilattico Sperimentale della
Lombardia e dell’Emilia-Romagna
“B. Ubertini”



Argomenti trattati

- ✕ Virus: caratteristiche, vie di trasmissione
- ✕ Principali Virosi: Sintomi, Terapia, Profilassi
- ✕ Tecniche diagnostiche: **ME, ELISA, PCR**








- ✕ Indagini epidemiologiche, progetti di ricerca
- ✕ Conclusioni

Virus delle api: quanti sono?

Dal 1963, anno dell'isolamento del primo virus (CBPV) ad oggi, sono stati **identificati e caratterizzati** non meno di **19 virus**

La maggior parte di essi sono particelle icosaedriche di 30 nm di diametro morfologicamente simili al TEM

VIRUS DELLE API					
<i>Apis mellifera</i>	Virus della Paralisi Cronica	CPV	20X30-50 nm		RNA
	Virus Associato alla Paralisi Cronica	CPVA	17nm		"
	Virus delle Ali Opache	CWP	"		"
	Virus Filamentoso	FV	150x450nm		DNA
	Virus X	BVX	35nm		RNA
	Virus Y	BYV	"		"
	Kashmir (ceppi Australiani) Virus	KBV			RNA
	Egypt Virus	EBV			"
	Virus della Covata a Sacco	SBV			"
	Arkansans Virus	ABV			"
	Virus della Paralisi Lenta	SPV			"
	Black Queen Cell Virus	BQCV			"
	Virus della Paralisi Acuta	APV	30nm		"
	Virus delle Ali Deformi	DWV			"
<i>Bombus</i>	Virus della Paralisi Acuta	APV			RNA
<i>Apis cerana</i>	Virus della Covata a Sacco (ceppo Tahi)	SBV			RNA
	Kashmir (ceppo Indiano) Virus	KBV			"
	Virus Iridescente	AIV	150nm		DNA

Tratto da: Bailey L. & Ball B.V. Honey Bee Pathology, 2nd ed.; Academic Press, London, 1991, p.11



Ministero della Sanità
Dipartimento di Sanità Pubblica
Servizio di Epidemiologia e Prevenzione



Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Rurali
Dipartimento di Politiche Agricole, Alimentari e Rurali
Servizio di Politiche Agricole, Alimentari e Rurali

Virus delle api: classificazione

Dicistroviridae genus Cripavirus

Black Queen Cell Virus (BQCV)

Cloudy Wing Virus (CWV)

Acute Bee Paralysis Virus (ABPV)

Kashmir Bee Virus (KBV)

Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV)

Virus non classificati

Arkansas Bee Virus (ABV)

Bee Virus X (BVY)

Bee Virus Y (BVX)

Egypt Bee Virus (EBV)

Slow Bee Paralysis Virus (SPV)

Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV)

Iflaviridae genus Iflavirus

Sacbrood Virus (SBV)

Deformed Wing Virus (DWV)

Kakugo Virus (KV)

Varroa destructor Virus-1 (VDV)

Altri virus (a DNA)

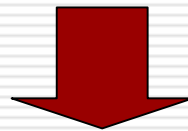
CPVA (Virus Satellite del CBPV)

AIV (Iridovirus)

FV (Virus filamentoso)

Virus delle api: principali caratteristiche

- ✕ Virus piccoli e nudi
- ✕ RNA a singolo filamento, polarità positiva
- ✕ Sequenza genomica completa per 7 virus:
ABPV, IAPV, KBV, BQCV - SBV, DWV, KV



- ✕ Elevata resistenza ambientale
- ✕ Elevata variabilità

Trasmissione dei virus nelle api

Orizzontale

Tramite insetti (*vector-borne*)

Per via alimentare (*food-borne*)

- virus in polline, miele, pappa reale
- alte [] virali nell'intestino e feci

Per via venerea

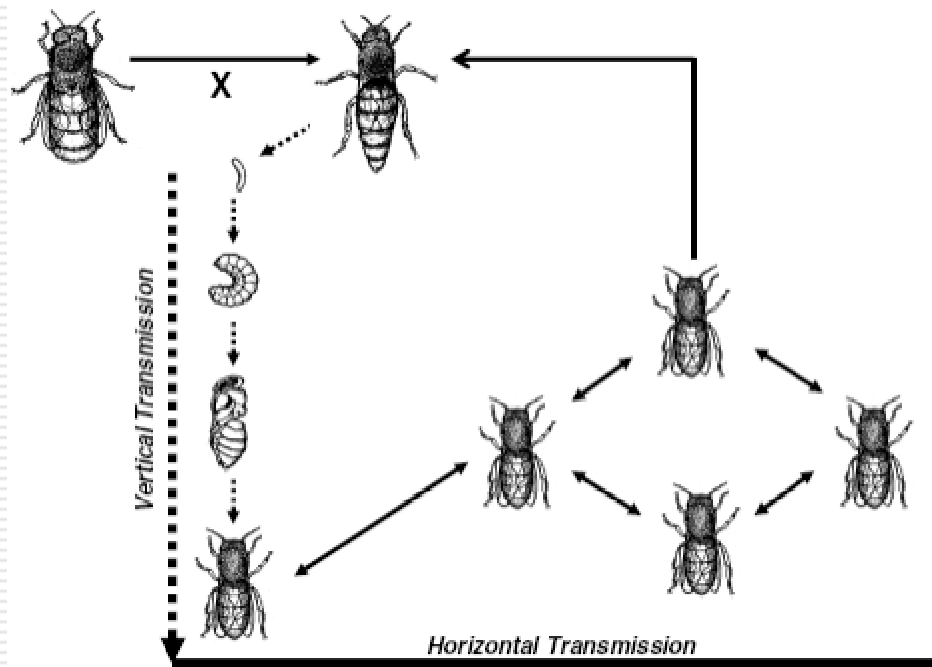
- virus in fuchi, seme, spermateca

Verticale

Trasmissione transovarica

- Regine positive per più virus, presenza di virus in ovari
- Virus (es. DWV) in uova, anche con superficie sterilizzata
- Virus in ogni stadio di sviluppo, anche in assenza di varroa e di virus in pappa reale

Y. Chen et al. / Journal of Invertebrate Pathology 92 (2006) 152–159



Transmission Pathways of Viruses in Honey Bees

Modello epidemiologico dei virus delle api

Chen Y. et al, Journal Invertebrate Pathology, 92, 152-159, 2006

× Nelle colonie in salute e vitali, i virus

- si mantengono con trasmissione **per via verticale**
- rimangono allo stato di latenza/persistenza
- non causano episodi clinici evidenti

× Nelle colonie “stressate” (carenze alimentari, varroa, altre patologie) e poco vitali, i virus

- abbandonano lo stato di latenza
- si riproducono in modo massivo
- si trasmettono **per via orizzontale**
- causano morte degli individui e spopolamento della famiglia

Attitudine patogena

- ✕ Solo il virus della covata a sacco (SBV) ed il virus della paralisi cronica (CBPV) sono identificabili su base clinica per i sintomi caratteristici indotti
- ✕ Molti, se non tutti i virus delle api causano infezioni latenti o inapparenti
- ✕ La maggior parte dei virus è spesso associata ad altri agenti patogeni (varroa, nosema, altri virus, etc)
- ✕ In situazioni particolari (fattori predisponenti e malattie concomitanti) possono moltiplicarsi e causare malattia conclamata e causare morte della famiglia/spopolamento
- ✕ La mortalità da virus è rara e spesso insidiosa
- ✕ In condizioni “normali” il loro impatto è trascurabile o transitorio (*latenza*)

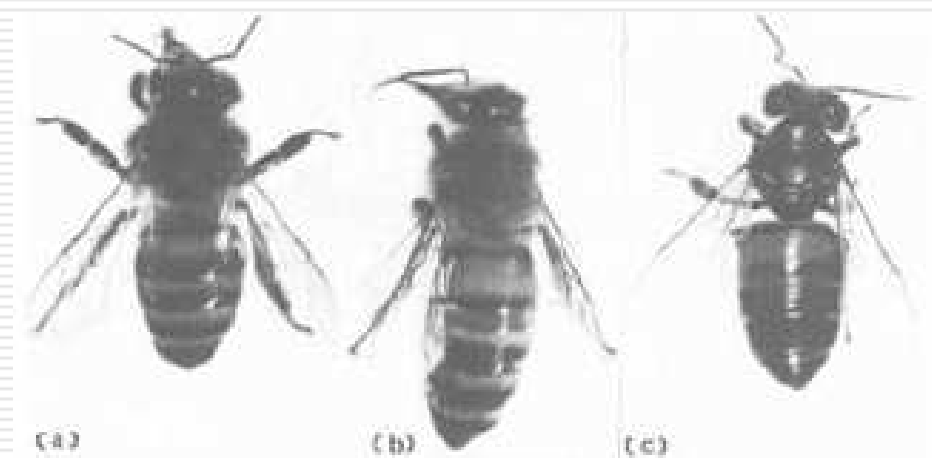
CBPV (*Chronic Bee Paralysis Virus*)

Famiglia e Genere: *Non classificato*

2 sindromi ben distinte in base alle caratteristiche genetiche delle api:

“Mal della foresta” - api non in grado di volare, tremolanti e in gruppo davanti alle arnie dove muoiono

“Mal nero” - api nere per la perdita dei peli, di piccole dimensioni. In breve tempo, comparsa di tremori e morte



a) Sana b) Mal della Foresta c) Mal Nero

CBPV (*Chronic Bee Paralysis Virus*)

- ✖ Spiccato tropismo per il tessuto nervoso (cervello, gangli ipofaringei, mandibolari, addominali e toracici)
- ✖ Infetta tutti gli stadi larvali
- ✖ Normalmente infezione allo stato latente: replicazione lenta, l'ape compie il suo ciclo vitale
- ✖ Virulenza di CBPV: potenziata in presenza di *Varroa destructor* (abbassamento delle difese immunitarie nell'ape → replicazione virale)
- ✖ Insieme ad ABPV, determina la mortalità invernale delle famiglie



Covata a sacco (SBV)

- ✕ Malattia della covata (covata irregolare, larve non pupano, celle disopercolate o parzialmente opercolate)
- ✕ Diffusione limitata in apiario
- ✕ Persistente negli anni
- ✕ Incidenza stagionale (inizio estate)
- ✕ Autolimitante per intervento api adulte (rimozione larve infette).
- ✕ Replica anche in soggetti adulti, può dare latenza
- ✕ Virus trasmesso dalla varroa ma anche dalle nutrici (secrezione delle ghiandole ipofaringee)

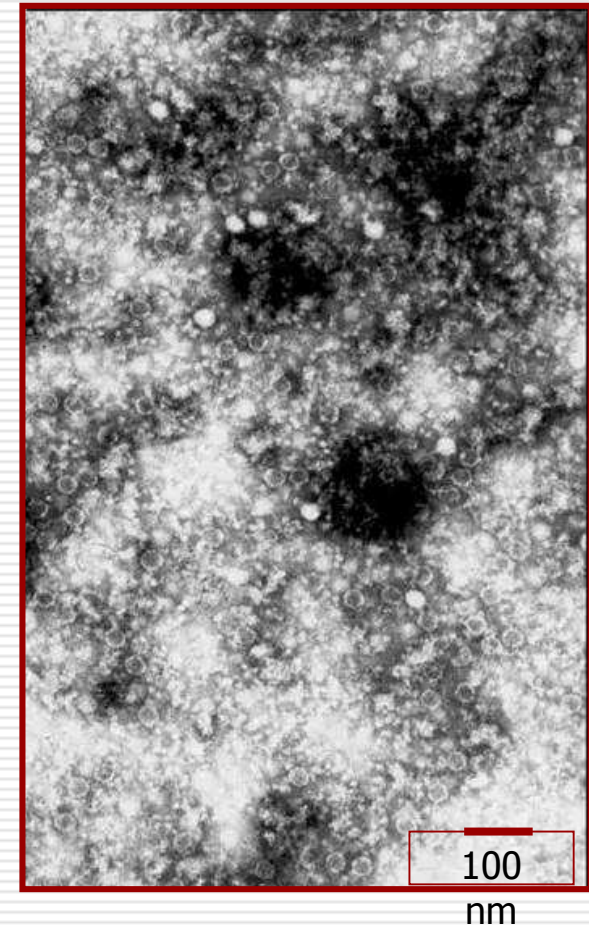
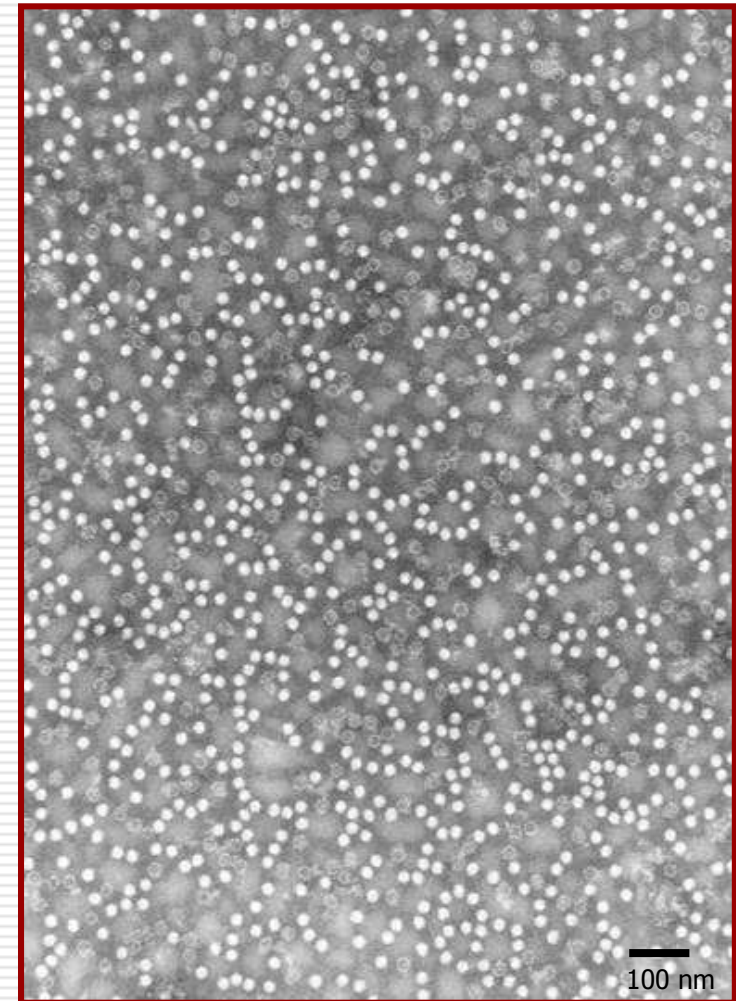


Foto covata

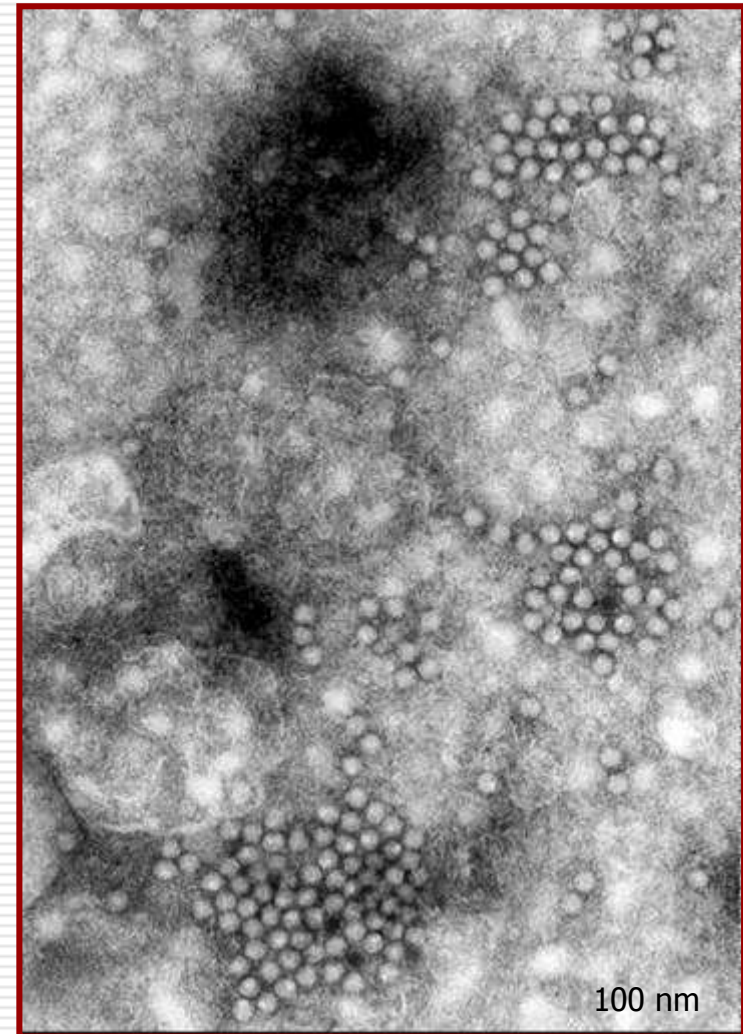
Virus della Paralisi Acuta (ABPV)

- ✕ Molto diffuso, si propaga velocemente
- ✕ Causa infezioni latenti
- ✕ Trasmesso da **varroa** che funziona anche da attivatore
- ✕ Causa mortalità nelle **api adulte** (tarda estate, autunno)
- ✕ Positività anche della covata parassitata da varroa → danno?



Virus delle Ali Deformi (DWV)

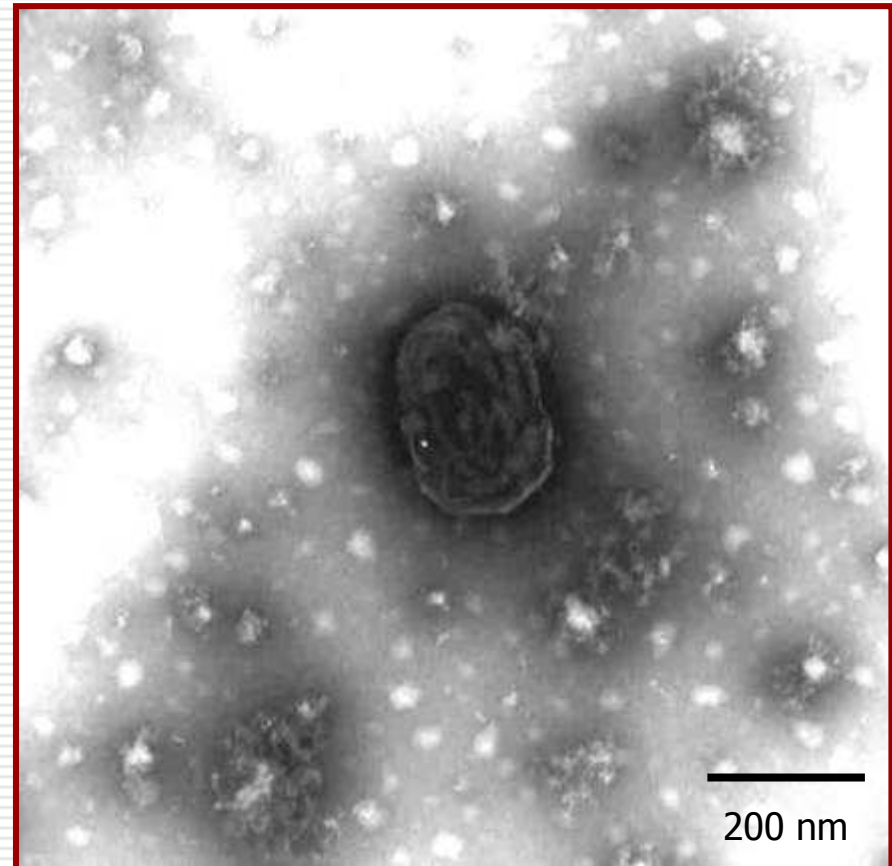
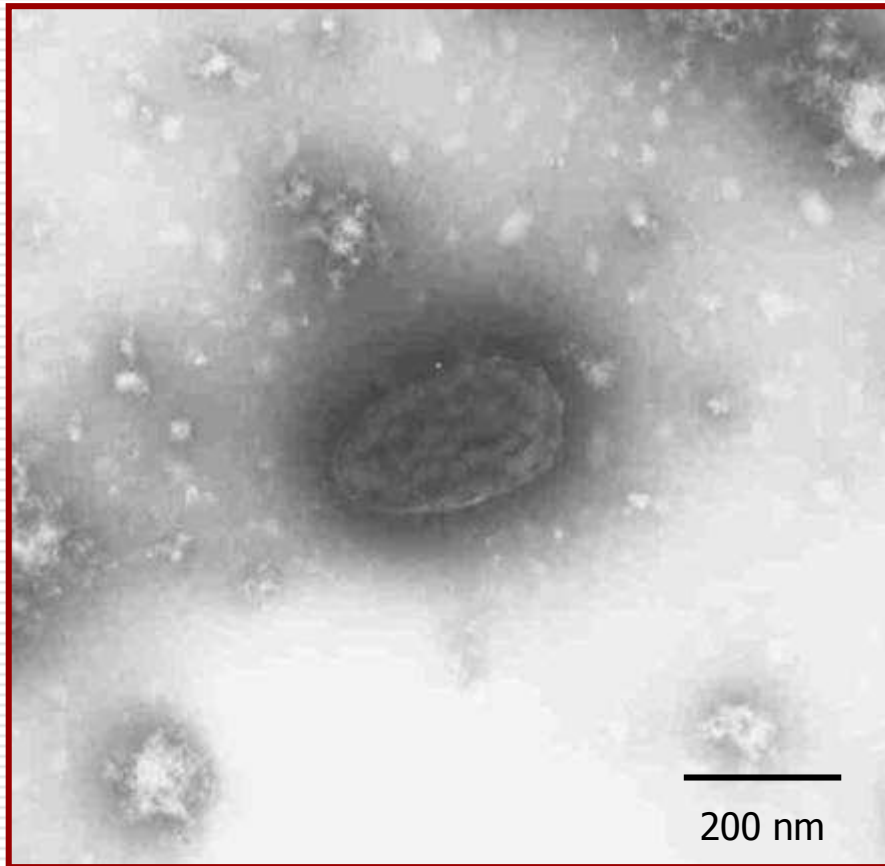
- ✕ Uno degli ultimi identificati, oggi molto diffuso
- ✕ Può causare infezioni latenti
- ✕ Replica più lentamente di ABPV
- ✕ Molto spesso associato a **varroa** che ne facilita la trasmissione
- ✕ Causa malformazioni delle ali con impossibilità a volare



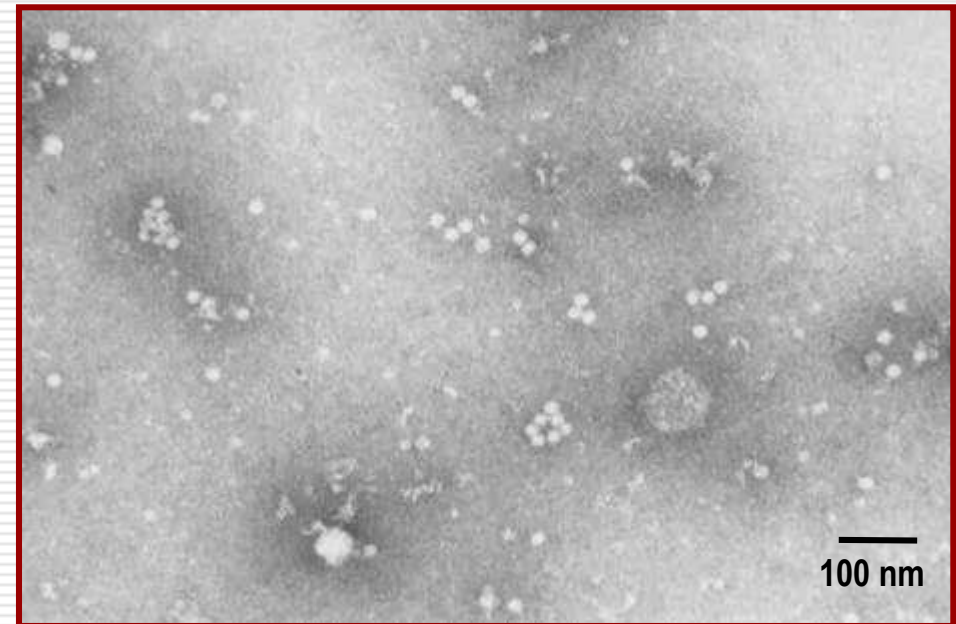
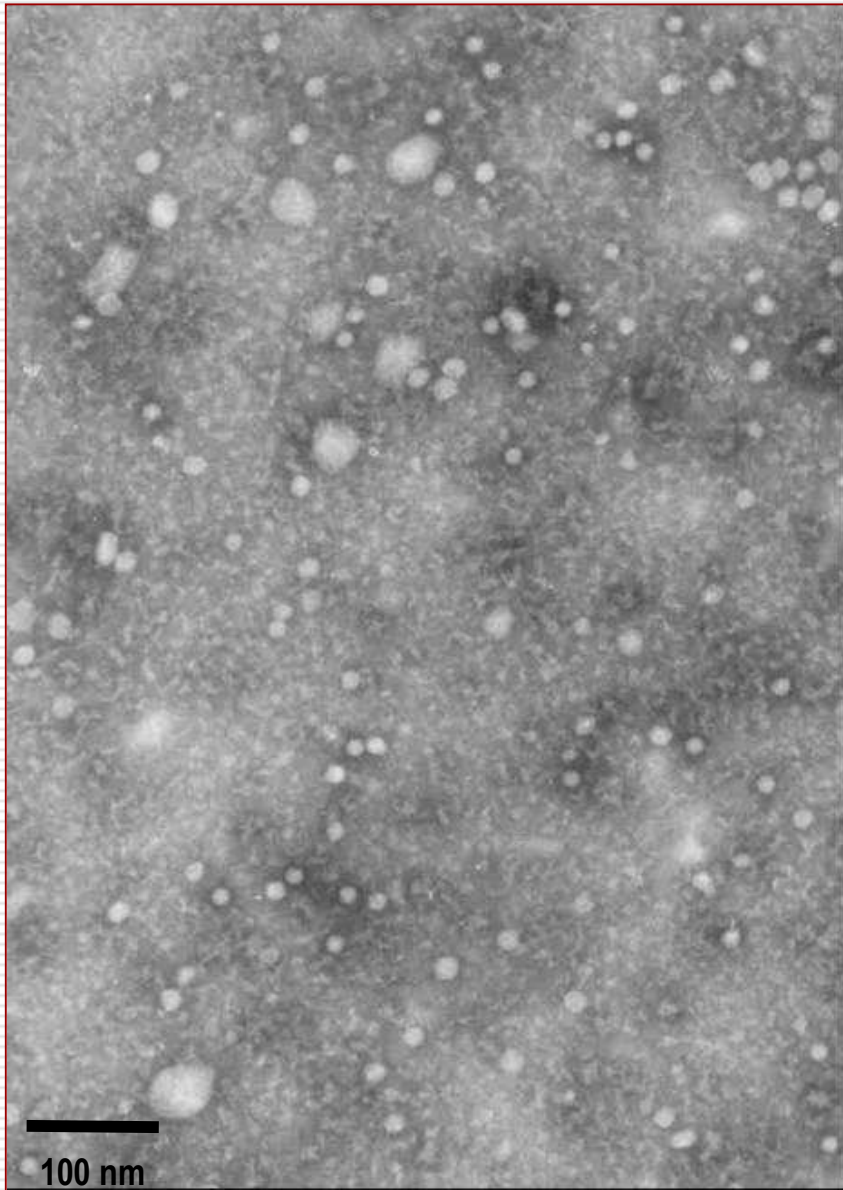
Altri virus delle api

KBV	Virus Kashmir	Correlato ad ABPV e IAPV; infetta l'ape in tutti gli stadi; latenza; elevata mortalità; identificato in Italia nel 2010	
IAPV	Virus della paralisi acuta israeliana	Sintomi simili ad ABPV, ritenuto concausa della CCD negli USA; descritto in Israele nel 2004, identificato in Italia nel 2009	
CWP	Virus delle Ali Opache	Virus comune. Causa opacità delle ali, diffusione aerogena, può causare mortalità in caso di infezioni gravi	
BQCV	Black Queen Cell Virus	Moltiplica nelle celle delle regine che diventano scure, causa mortalità delle propupe, replica anche negli adulti	Raramente causano malattia da soli ma più spesso associati a Nosema apis , moltiplicano nell'intestino delle bottinatrici, causando infezioni piuttosto comuni, senza sintomi ma possono generalizzare a partire dall'intestino lesionato da Nosema
FV	Virus Filamentoso	Virus molto grosso che causa opacizzazione della emolinfa	
BVY	Virus Y	Più frequente ad inizio estate	
EBV	Egypt Virus	Poco conosciuto, sperimentalmente causa mortalità nelle larve e non negli adulti	
ABV	Arkansas Virus	Infezione inapparente, replicazione lenta, causa accorciamento periodo di vita, decorre con altri virus	
SPV	Virus della Paralisi Lenta	Poco conosciuto, replica lentamente, induce mortalità sperimentale con paralisi arti anteriori	
BVX	Virus X	Associato ad Ameba, non correlato con BVY, più frequente in tardo inverno, ciclo oro-fecale, minor vitalità delle api, mortalità precoce	
AIV	Virus Iridescente	Responsabile nell'ape cerana della "Clustering Disease". Si osservano gruppi di api inattive, isolate; la colonia viene a morte entro 2 mesi. Non è trasmesso da acari, replica anche nell'ape mellifera.	

Virus Filamentoso (CWP)



Cloudy Wing Particle (CWP)



Virus recentemente scoperti e potenzialmente patogeni per le api

Picornavirus-like, famiglia *Dicistroviridae*, omologie di sequenza con virus di altri Apoidi (Bombo) e dei Lepidotteri

1a) *Aphid Lethal Paralysis Virus (ALPV)*

1b) *Aphid Lethal Paralysis Virus* ceppo *Brooking* (ALPV strain Brooking)

2) *Big Sioux River Virus (BSRV)* = nuova specie virale

3a) *Lake Sinai Virus* ceppo 1 (**LSV1**)

3b) *Lake Sinai Virus* ceppo 2 (**LSV2**)

Picornavirus-like, famiglia e genere *Iflavirus*, omologie di sequenza con DWV e KV

Varroa Destructor Virus 1 (VDV-1)

Ruolo della varroa nelle infezioni virali

- ✕ L'infestazione da varroa aumenta la recettività delle api verso patologie secondarie
- ✕ Alla diffusione della varroa in un'area si associa spesso la comparsa più o meno immediata di patologie secondarie incluse le virosi
- ✕ Esiste una correlazione diretta con la comparsa di virosi (DWV, ABPV, KBV e IAPV)

Varroa e trasmissione di DWV e KBV

(Bowen Walker et al., J. Vertebr. Pathol, 73, 101-106, 1999)

Shen et al., Virology, 342, 141-149, 2005)

- ✕ La varroa è veicolo di virus con 2 modalità
 - *attraverso l'attività alimentare, causando una riattivazione di virus latenti a seguito di soppressione dell'immunità dell'ape*
 - *come vettore passivo trasportando i virus con la saliva o contenuto intestinale*
- ✕ La varroa può acquisire il virus da api infette, ma anche da altre varroe infette per via orizzontale
- ✕ Se la varroa si è precedentemente alimentata su un'ape deformata, è maggiore la probabilità che un'ape nasca deformata o muoia

Varroa ed infezioni virali

- ✕ L'esito dell'infestazione dipende da numerosi fattori:
 - il numero di varroe (infette)
 - la presenza (*quali virus*) e il livello (*a quale titolo*) di infezione virale nelle api
 - la prevalenza e titolo virale nella popolazione di varroe
 - la virulenza del ceppo virale
 - la suscettibilità delle api (e forse della varroa) al virus
 - la quantità di covata presente nella colonia
- ✕ E' noto che:
 - La quantità (titolo) di **DWV presente nelle api** e non la sola presenza, determina se nasceranno deformate o meno
 - Il numero di **copie di genoma di DWV nelle varroe** condiziona lo sviluppo o meno di api con ali deformi ([Gisder et al. J. Gen Virol, 90, 463-467, 2009](#))
 - Il virus **DWV replica anche nella varroa** (*[] elevatissime di virus anche in varroe da api non deformi*) ([Gisder et al. J. Gen Virol, 90, 463-467, 2009](#))
 - C'è una correlazione positiva fra aumento del n. di varroe e aumento della percentuale di api deformate

Diffusione dei virus

- ✕ In passato realizzati pochi studi a causa di:
 - **difficoltà nella diagnosi**
 - **attitudine patogena non definita**
 - **scarsa disponibilità di strumenti diagnostici specifici**
- ✕ Sono stati condotti studi in diversi Paesi ma il dato sulla loro distribuzione e diffusione è ancora incompleto
- ✕ Oggi la situazione è molto migliorata grazie anche all'uso di metodi biomolecolari (**PCR**)

Prelievo per indagine di virosi

- ✕ E' necessario operare un campionamento completo che comprenda:
 - api adulte, vive, morte e moribonde
 - covata a diversi stadi di sviluppo
 - larve disopercolate di 2-3 gg e di 5-6 gg
 - larve opercolate-propupe
 - pupe occhi bianchi e rosa
 - api allo sfarfallamento
 - varroe
- ✕ Dopo il prelievo tali materiali vanno congelati e mantenuti a -20 ° C fino al momento dell'esame
- ✕ L'invio dei campioni deve essere corredato da adeguate e complete indicazioni anamnestiche

Cosa fare in caso di episodi di morie e spopolamenti improvvisi in apiari sul territorio?

Apicoltore deve:

segnalare gli episodi alla ASL con la massima tempestività



ASL effettua:

- ➔ immediato sopralluogo presso l'apiario interessato compilando il [verbale / questionario](#)
- ➔ eventuale campionamento di api, sia morte, che moribonde e possibilmente anche vive da inviare all'IZS
- ➔ trasmissione in Regione di copia del verbale/questionario.

Terapia

**Non esistono rimedi terapeutici contro le virosi delle api:
attualmente allo studio l'uso di PROBIOTICI**

- ✕ Distruzione delle famiglie colpite
- ✕ Distruzione dei favi; messa a sciame per diminuire la carica virale; sostituzione delle api regine
- ✕ Lavaggio e disinfezione delle arnie (soda caustica; sali quaternari di ammonio o ipoclorito di sodio + fiamma azzurra)
- ✕ Quarantena delle regine di nuova introduzione
- ✕ Recentemente sono stati prodotti farmaci basati sulla tecnologia a iRNA (Remebee – iRNA anti-IAPV)

Profilassi

Misure Preventive e Indirette

- a. Buone pratiche di allevamento
 - mantenere e potenziare difese naturali delle colonie (ad es. somministrando integratori)
 - prevenire la diffusione delle infezioni virali controllando e contenendo la *Varroa* e il *Nosema*
 - nutrire bene la famiglia all'inizio dell'inverno
- b. Osservanza delle norme sanitarie

Diagnosi di laboratorio

Spesso difficoltosa per mancanza di reagenti (antisieri)

AGAR GEL IMMUNODIFFUSIONE: metodica rapida, poco costosa e specifica, anche se poco sensibile. E' adeguata per svelare infezioni massive.

MICROSCOPIA ELETTRONICA (ME/IEM): sensibilità variabile in rapporto al metodo usato (goccia, Airfuge). E' costosa e dispendiosa in termini di tempo per indagini su larga scala.

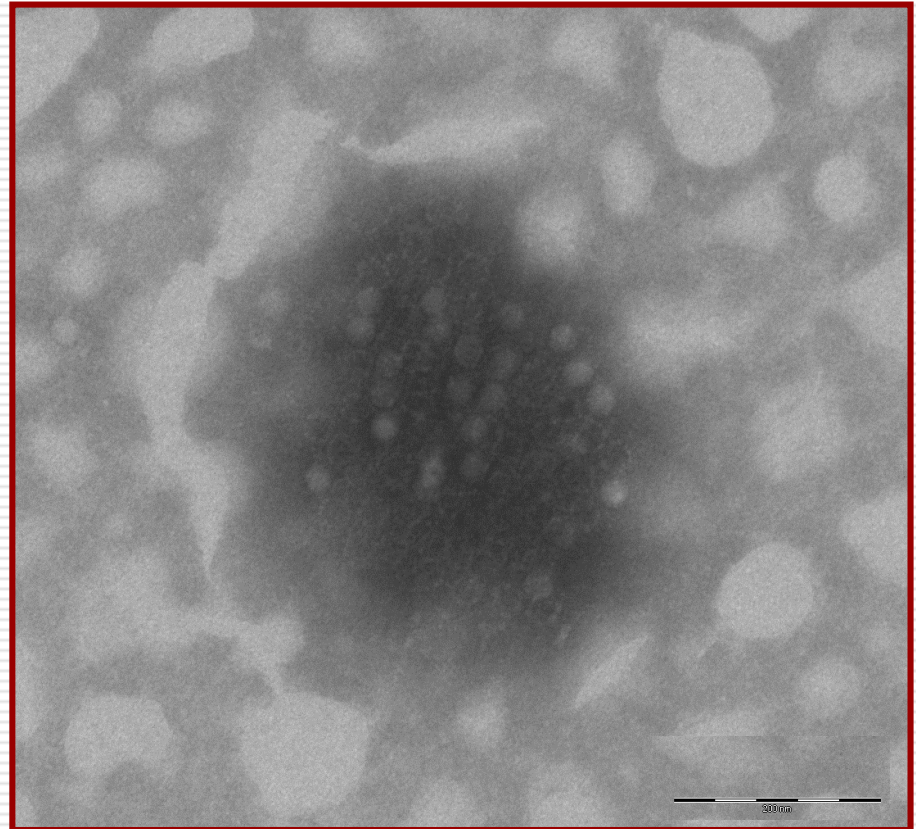
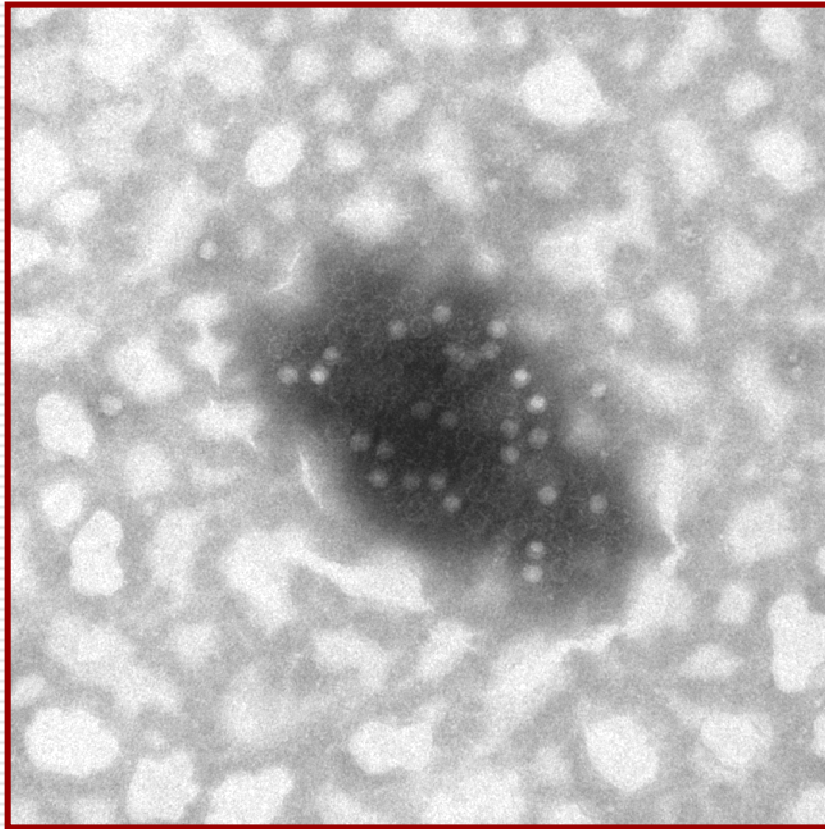
IMMUNOCROMATOGRAFIA: "on side test"

WESTERN BLOT: identificazione proteica

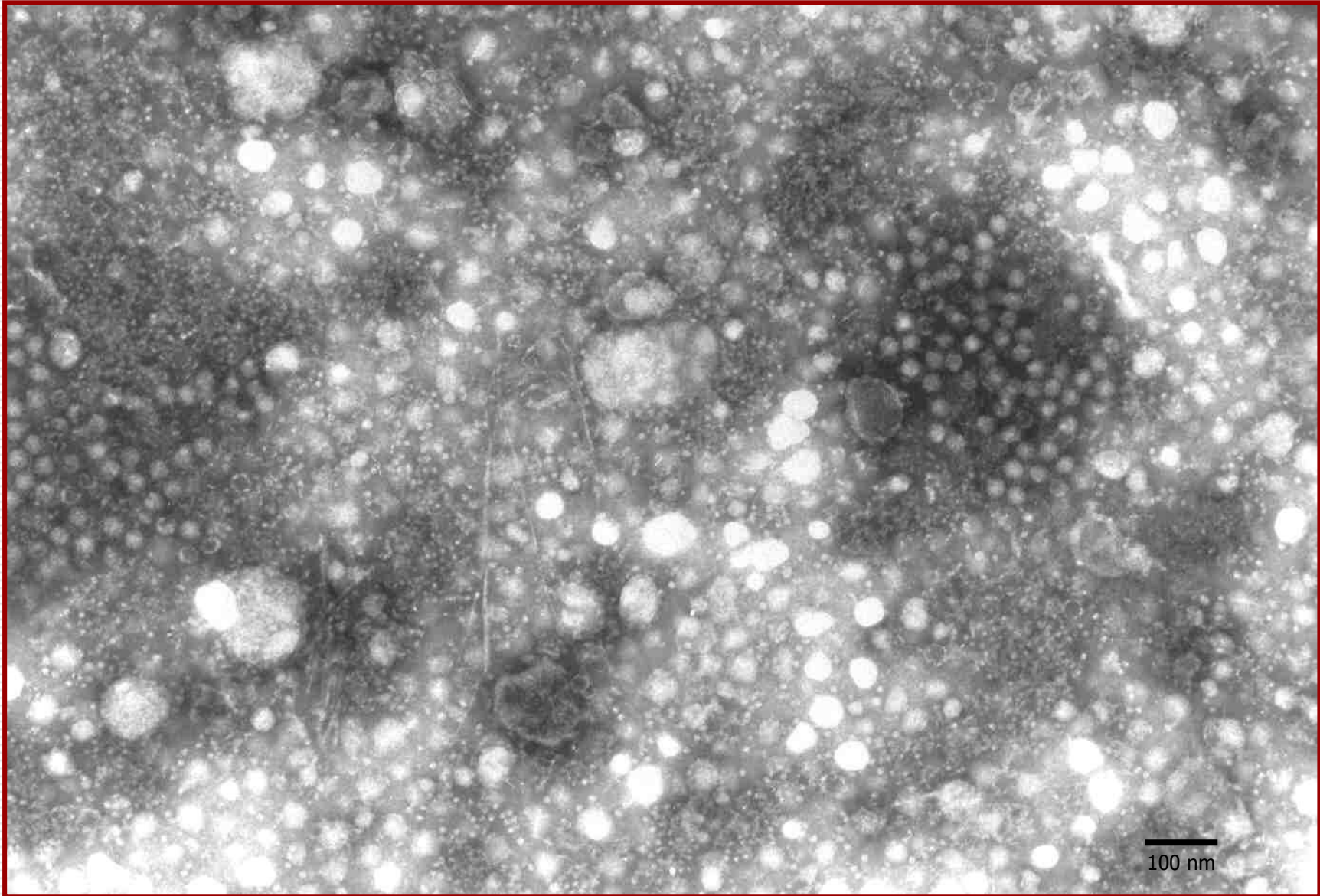
ELISA: molto sensibile, svela anche infezioni latenti

Problema oggi risolto con l'uso della **PCR** in tutte le sue varianti (multiplex - real time - immunocapture PCR)

Virus delle Ali Deformi (DWV) - IEM



Virus della Paralisi Acuta (ABPV) - IEM



Ministero della Sanità
Dipartimento di Sanità Pubblica
Viale della Sanità, 155 - 00144 Roma



Università della Repubblica
Via della Ricerca Scientifica, 1
00133 Roma

Tecniche Biomolecolari

Fasi di lavorazione

- ✕ Preparazione dell'estratto da api, larve e pupe (15 soggetti)
- ✕ Estrazione dell'RNA mediante kit commerciale (QIAamp Viral RNA Mini Kit)
- ✕ Sintesi del DNA copia (cDNA)

✕ PCR end point

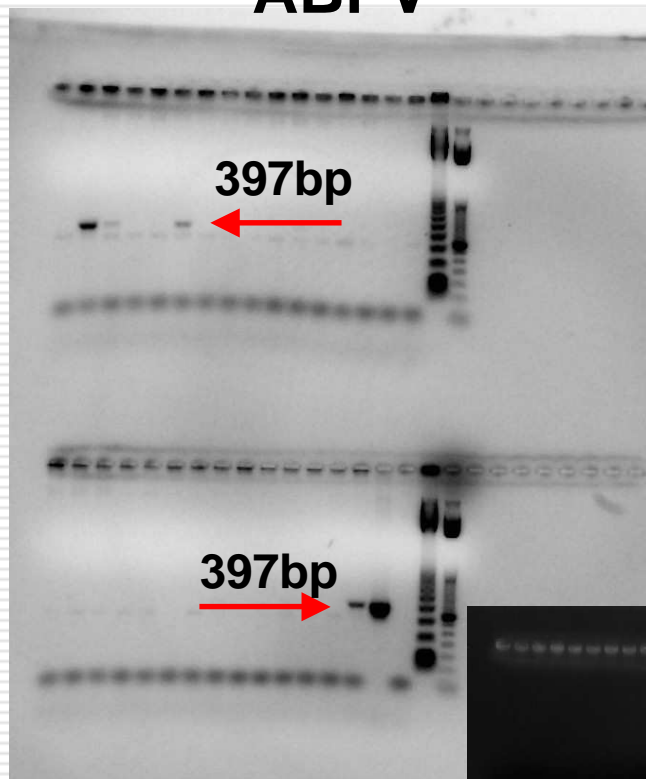
- Amplificazione (PCR) con i primers specifici per le virosi esaminate
- Elettroforesi in gel di agarosio dei prodotti di PCR

✕ PCR real time

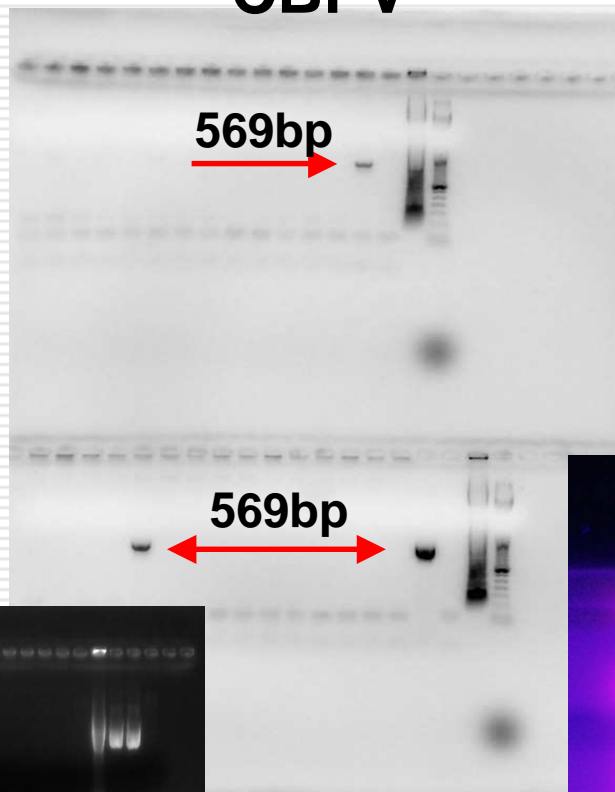
- Amplificazione (PCR) con i primers e sonda specifici per le virosi esaminate

Elettroforesi in gel di agarosio

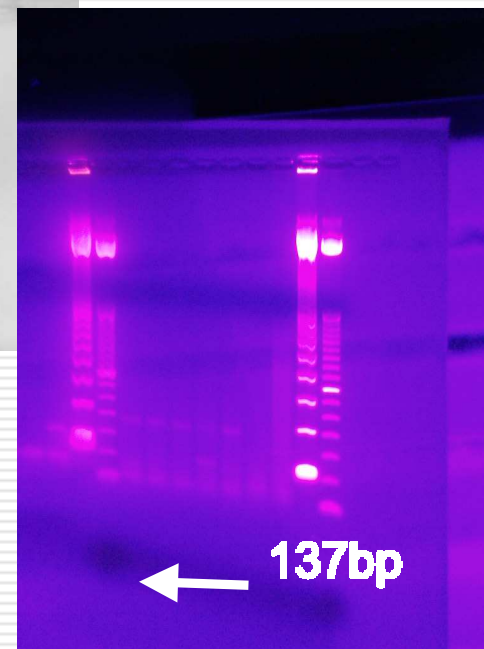
ABPV



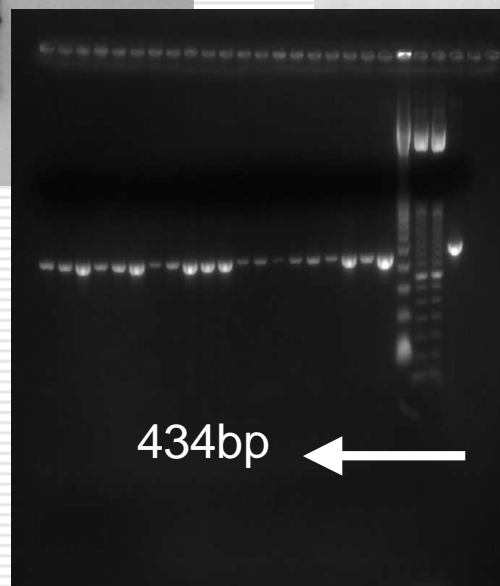
CBPV



IAPV



DWV



Ministero della Sanità
Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle
Malattie Infettive e Tropicali
"G. Monod"

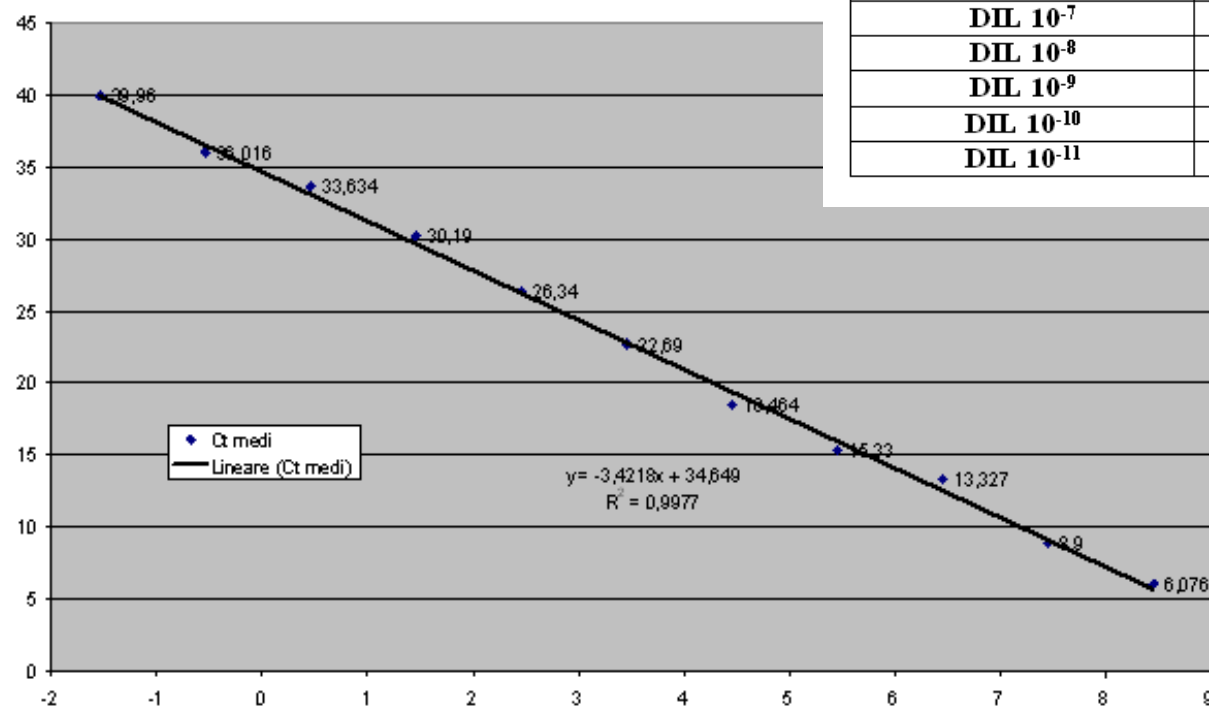


CBPV (Chronic Bee Paralysis Virus)

CURVA STANDARD CBPV

DILUIZIONE	N° MOLECOLE PLASMIDI	<u>Ct medio</u>
DIL 10 ⁻¹	2,88*10 ⁹	6,076
DIL 10 ⁻²	2,88*10 ⁸	8,9
DIL 10 ⁻³	2,88*10 ⁷	13,327
DIL 10 ⁻⁴	2,88*10 ⁶	15,33
DIL 10 ⁻⁵	2,88*10 ⁵	18,464
DIL 10 ⁻⁶	2,88*10 ⁴	22,69
DIL 10 ⁻⁷	2,88*10 ³	26,34
DIL 10 ⁻⁸	2,88*10 ²	30,19
DIL 10 ⁻⁹	2,88*10 ¹	33,634
DIL 10 ⁻¹⁰	2,88	36,016
DIL 10 ⁻¹¹	0,288	39,96

Curva standard CBPV virus



Ministero della Sanità
 Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle
 Malattie Infettive "G. Gaslini"



Protocolli di TaqMan Real Time PCR

- ✕ Real Time qualitativa e quantitativa per CBPV (*Chronic Bee Paralysis Virus*)
- ✕ Real Time qualitativa e quantitativa per ABPV (*Acute Bee Paralysis Virus*)
- ✕ Real Time qualitativa e quantitativa per DWV (*Deformed Wing Virus*)
- ✕ Real Time qualitativa e quantitativa per *Nosema ceranae*

INDAGINI SULLA PRESENZA DI VIROSI IN ITALIA

IZS LER e IZS LT

1989-2012

Attività diagnostica dell'IZS LT

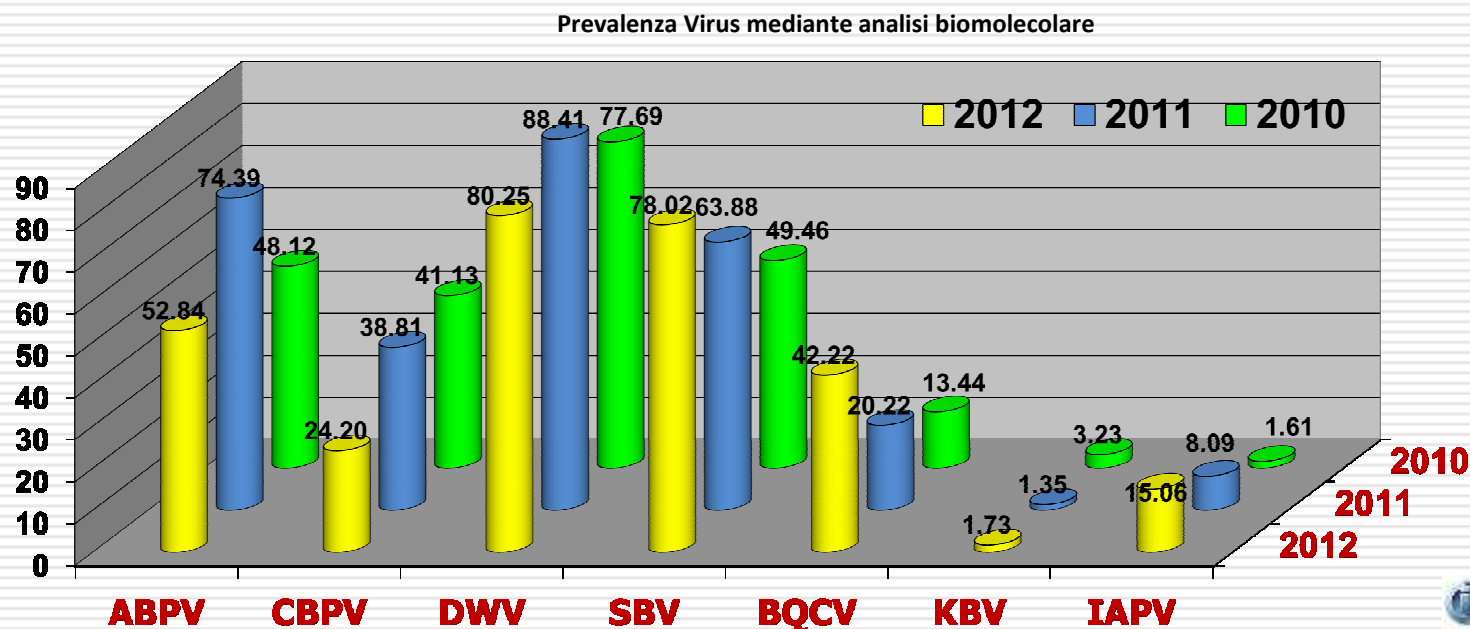
Settembre 2004 - Dicembre 2012

Giusy Cardeti, Antonella Cersini - Uff.Staff Biotechnologie

- ✕ **Campioni: 1461** (larve, pupe, api allo sfarfallamento e adulte) da oltre **200** aziende apistiche e **3** aree naturali protette di Lazio e Toscana
- ✕ **Anamnesi:** lentezza nella ripresa primaverile delle colonie, elevata mortalità delle larve ed in alcuni casi grave spopolamento e morte; piani di monitoraggio.
- ✕ **Materiali e Metodi:** indagini parassitologiche (*varroa*, *nosema* ed *amebiasi*), batteriologiche (*peste europea* ed *americana*) ed esami virologici (larve, propupezze e pupe, api allo sfarfallamento e adulte deformate) mediante ME (**656** camp.) e PCR (**1148** camp. dal 2010).

Risultati

- ✓ In ME, particelle Picornavirus-like in:
538 campioni (**81,01%**)
- ✓ Identificazione mediante IEM-ABPV e IEM ELISA-DWV:
 - **146** campioni positivi per **DWV**
 - **5** campioni positivi per **ABPV**
 - **1** campione positivo per **ABPV + DWV**
- ✓ In PCR, triennio 2010-2012: **ABPV** (58.28%); **CBPV** (50.44%); **DWV** (82.06%); **SBV** (64.20%); **BQCV** (25.78%); **KBV** (2.09%); **IAPV** (8.45%).



Osservazioni

Attività diagnostica dell'IZSLT, Settembre 2004 -
Dicembre 2012. Cardeti G et al., IZSLT Roma

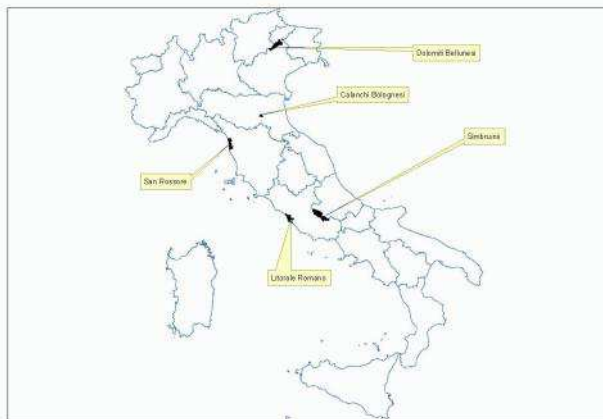
- ✕ Infezione virale associata ad alta infestazione da varroa, soprattutto a carico della covata opercolata, ma anche degli adulti
- ✕ In molte arnie con sospetta sindrome da spopolamento: diagnosi di virosi
- ✕ campioni positivi anche per:
 - *Nosema ceranae*
 - *Peste Europea*
 - *Peste Americana*
 - *Malpighamoeba mellificae*
- ✕ Alta prevalenza di **DWV-ABPV-CBPV**: elevata diffusione associata a massiccia infestazione da Varroa
- ✕ **BQCV**: rilevato soprattutto in estate x presenza di molta covata

Progetto

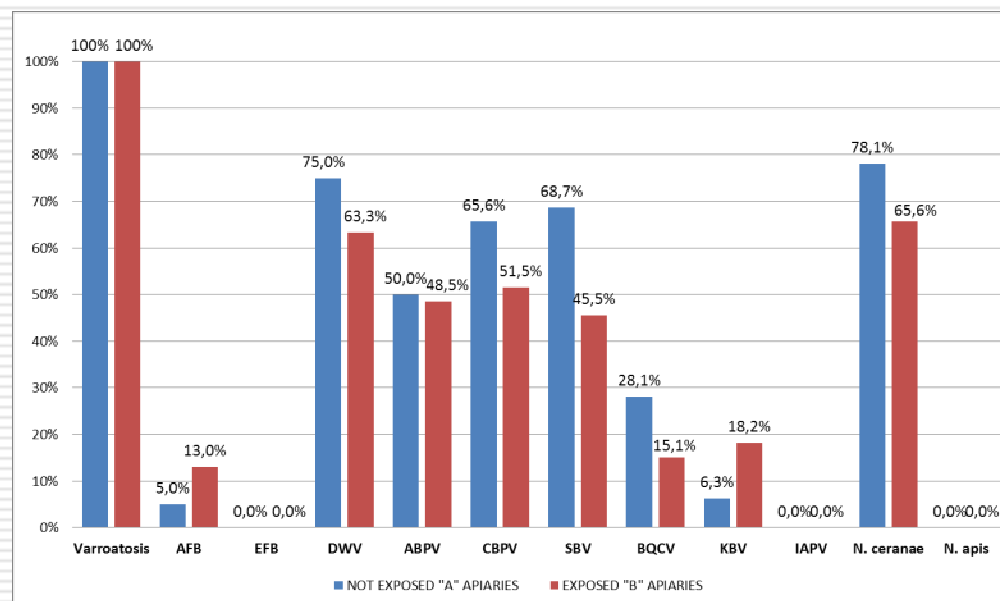
“Indagine sullo stato di salute di *Apis mellifera* in 5 aree naturali protette”

- ✕ Maggio 2009 – Settembre 2010
- ✕ **5 Aree Naturali** protette: Veneto, Emilia Romagna, Toscana, Lazio
- ✕ 2 apiari/Area: 1 esposto e 1 non esposto
- ✕ osservazioni su **fenomeni di moria per esposizione ad inquinanti di origine antropica**
- ✕ valutazioni cliniche, prelievo campioni x ricerca residui di prodotti fitosanitari, individuazione specie botaniche visitate, ricerca di agenti patogeni; ricerca di fitosanitari e metalli pesanti nel miele

Mappa delle 5 Aree naturali protette monitorate



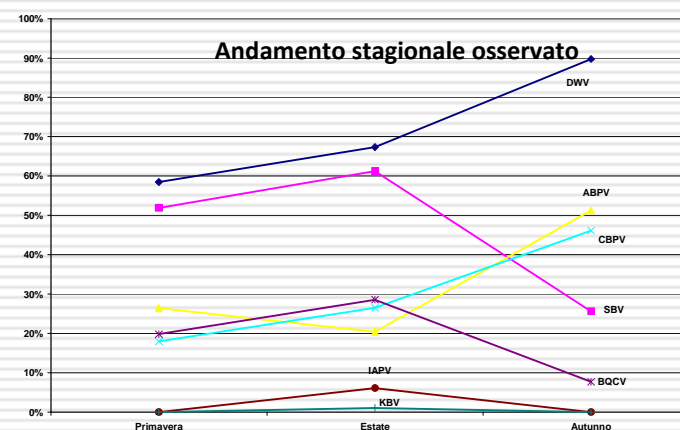
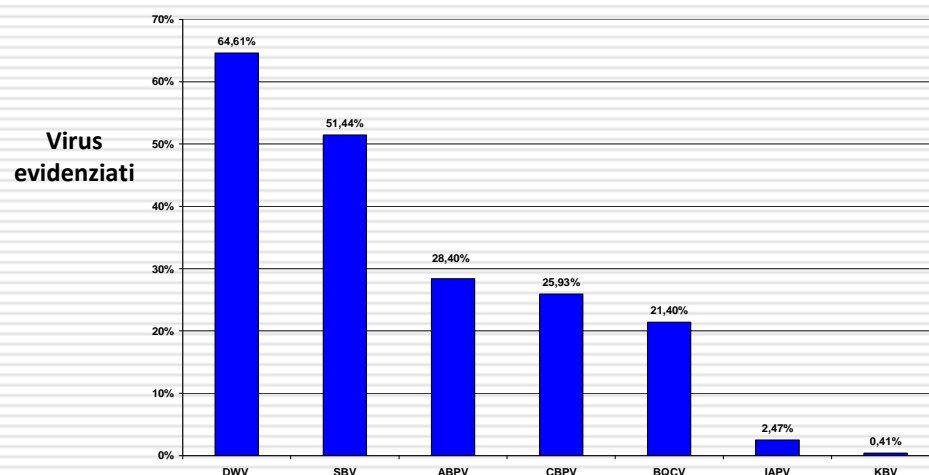
Prevalenza dei patogeni in apiari esposti e non-esposti dei 5 Parchi



APENET-TOSCANA

“Progetto biennale di monitoraggio sullo stato di salute delle api”

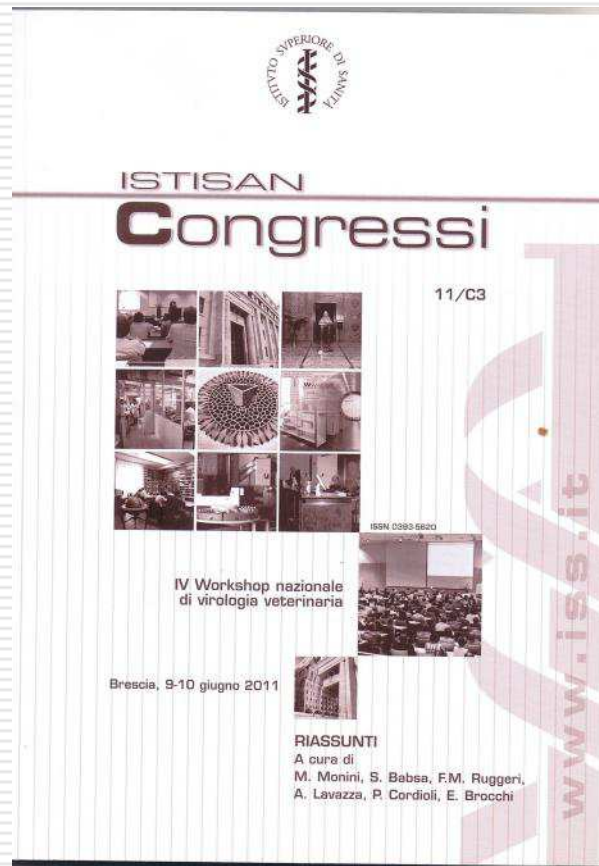
- ✕ Giugno 2009 – Giugno 2011
 - 4 Moduli (FI, SI, AR, LU); 5 apiari / Modulo
 - Sopralluoghi a giugno → agosto → ottobre → aprile x i seguenti rilievi:
- ✕ Caratteristiche geografico-ambientali dei diversi apiari (dati metereologici, destinazione ad uso del territorio, coltivazioni presenti)
- ✕ Capacità gestionali degli apicoltori (lotta alla *Varroa*)
- ✕ Caratteristiche delle famiglie (estensione della covata, presenza di scorte, età della regina, presenza di fuchi, numero di api adulte.
- ✕ Stato sanitario delle famiglie (comportamenti anomali delle api; fenomeni di mortalità/spopolamento a carico degli alveari) con relativi prelievi x indagini di laboratorio



Protezione e sviluppo sostenibile delle risorse naturali e ambientali
Servizio Nazionale di Referenza per la Sicurezza Alimentare e la Salute
D. 10/08/2010



Ricerca e sviluppo IZSLT



P.13 IDENTIFICAZIONE DI KASHMIR BEE VIRUS (KBV) IN ITALIA

Antonella Cersini (a), Giusy Cardeti (a), Ugo Marchesi (a), Valeria Antognetti (a), Maurizio Zini (a), Silvia Puccica (a), Roberta Barcaioli (a), Anna Granato (b), Franco Mutinelli (b), Giovanni Formato (a)

(a) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma

(b) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, Padova

Journal of Apicultural Research 50(2): 176-177 (2011)
DOI 10.1093/IJAR/51.50.2.12

© ISRA 2011

NOTES AND COMMENTS

First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in Italy

Giovanni Formato¹, Alessandra Giacomelli², Ma'ayan Olivia³, Lucie Aubin², Eltan Glick², Nitzan Paldi², Giusy Cardeti³, Antonella Cersini², Ilaria Maria Ciabatti³, Massimo Palazzetti³, Anna Granato⁴ and Franco Mutinelli⁴

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma, Italy.

²BeeLogics Inc., 11900 SW 77th Avenue, Miami, FL 33156, USA.

³ASL VT Sez 1 Servizio Veterinario AREA B, Viterbo, Italy.

⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, NRL for beekeeping, Legnaro (PD), Italy.

Received 25 October 2010; accepted subject to revision 1 March 2011; accepted for publication 17 March 2011.

*Corresponding author: Email: giovanni.formato@izsl.it



Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana
Via dell'Industria, 1 - 00144 Roma, Italia



Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie
Via dell'Industria, 1 - 35010 Legnaro (PD), Italia

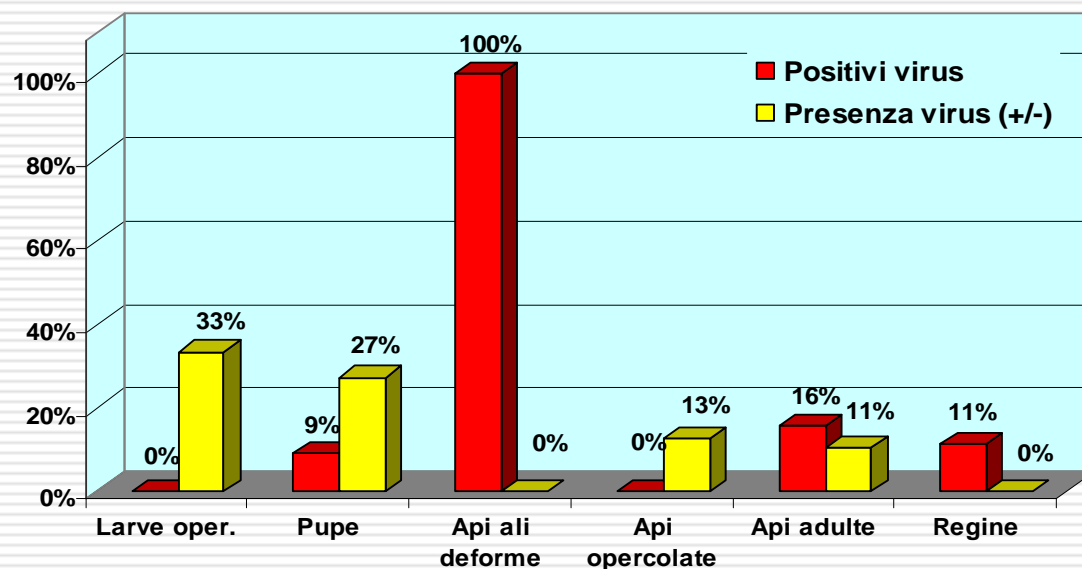
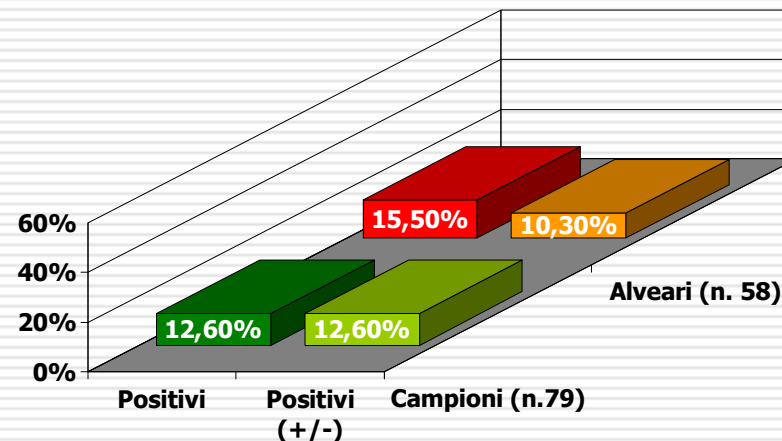
Attività diagnostica dell'IZS LER Osservazioni

*Lavazza A. et al., "Indagine sulla diffusione delle virosi in Italia negli anni 1989-1993" Apilombardia 1994;
Arculeo P. & Lavazza A. "Patologie secondarie alla varroa in alveari della Sicilia: virosi e covata calcificata" Apilombardia 1998*

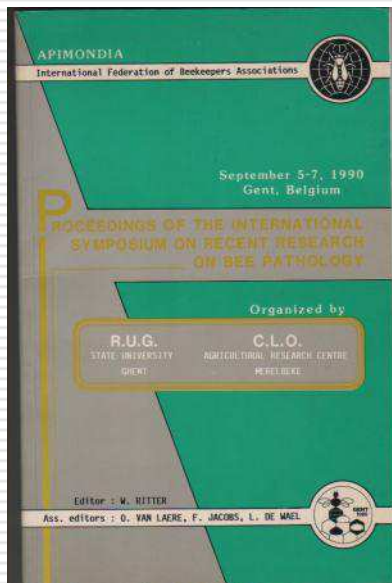
- ✕ Positività virale principalmente in api con le ali deformi associata ad alta infestazione di varroa
- ✕ In alveari con spopolamento, indebolimento delle famiglie e/o mortalità di api
 - spesso positività solo ai virus (negativi gli altri esami)
 - più raramente positivi per *Nosema apis*
- ✕ Alcuni campioni positivi per PA e PE risultati positivi anche per virus (picornavirus-like in ME e AGID)
- ✕ Covata calcificata nel 10,3% degli alveari in assenza di virus

Positività virale per campioni ed alveari

Totale alveari positivi = 15 (25,8%)
Totale campioni positivi = 20 (25,2%)



Positività virale nei diversi stadi di sviluppo

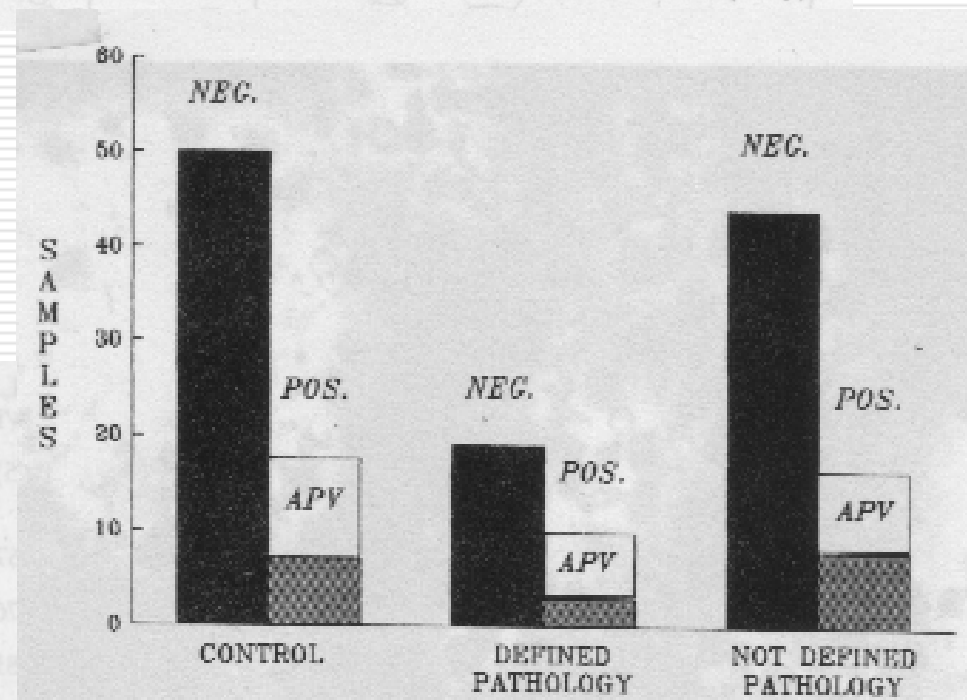
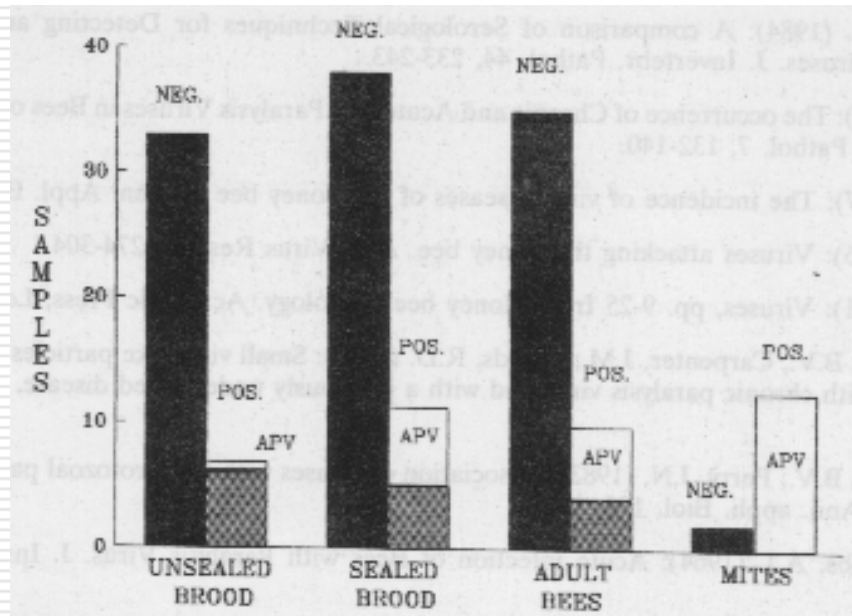


Prevalence of acute paralysis virus (APV) and other viral infections in honeybees in Italy

E. CARPANA¹, M.A. VECCHI¹, A. LAVAZZA², S. BASSI², M. DOTTORI²

¹ Istituto Nazionale di Apicoltura, Bologna (Italy)

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Brescia (Italy)

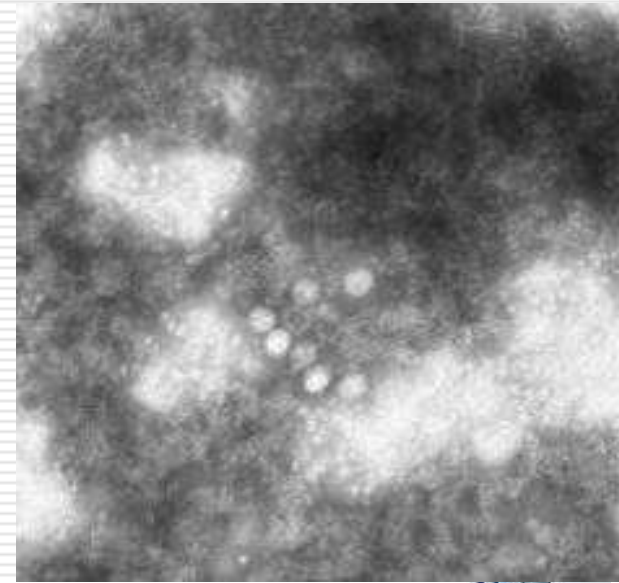


Attività diagnostica dell'IZS LER

Gennaio - Giugno 2008

21 casi di spopolamento, morte improvvisa

- ✕ in **4** diagnosi di **DWV** conclamata (alti titoli)
- ✕ presenza di **DWV** in forma **latente** (5 ME neg./ELISA pos.)
- ✕ in **5** casi diagnosi di **Nosemiasi**
- ✕ **1** caso “classico” di **Covata a sacco**



Indagini su mortalità api

Primavera 2008

INA – IZS LER – Regione Lombardia – CNR - IZSVe

- × **63** conferimenti (api vive, api morte, polline)
- × **Analisi chimiche** per Neonicotinoidi (*Imidacloprid, Thiamethoxan, Clothianidin*)
- × **Analisi batteriologiche, parassitologiche**
- × **Analisi virologiche** (ME e ELISA)



2 positivi ME (basso titolo) / negativi ELISA-DWV

2 positivi ELISA-DWV / negativi ME (latenza?)

Attività diagnostica dell'IZSLER 2009 - 2011

Prova	N° positività	2009	2010	2011
Peste europea <i>Melissococcus plutonius</i>	rete monitoraggio	1	0	0
	extra-piano	11	3	5
	totali	12	3	5
Nosema sp.	rete monitoraggio	1	1	0
	extra-piano	31	19	30
	totali	32	20	30
Peste americana <i>Paenibacillus larvae</i>	rete monitoraggio	2	10	1
	extra-piano	42	28	31
	totali	44	38	32
Virus dell'ala deforme DWV	rete monitoraggio	12	5	4
	extra-piano	56	65	120
	totali	68	70	124
Totale	rete monitoraggio	16	16	5
	extra-piano	140	115	186
	totali	156	131	191*

* In 2 casi è stata fatta diagnosi di grave infestazione da varroa

Progetto A.M.A. (A - APE) Indagini sui virus dell'ape associati alla varroa

- ✕ **Caratterizzazione morfologica di DWV al M.E.**
- ✕ Purificazione del virus
- ✕ Studio delle proprietà biochimiche e antigeniche
- ✕ Produzione di reagenti specifici (anticorpi mono e policlonali)
- ✕ Caratterizzazione del genoma di DWV
- ✕ Messa a punto di **ELISA e PCR diagnostiche**
- ✕ Utilizzo preliminare e validazione del test ELISA per la diagnosi di routine

JOURNAL OF VIROLOGY, May 2006, p. 4998–5009
0022-538X/06/\$08.00+0 doi:10.1128/JVI.80.10.4998-5009.2006
Copyright © 2006, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 80, No. 10

Molecular and Biological Characterization of Deformed Wing Virus of Honeybees (*Apis mellifera* L.)

Gaetana Lanzi,^{1†} Joachim R. de Miranda,^{2‡} Maria Beatrice Boniotti,¹ Craig E. Cameron,³
Antonio Lavazza,¹ Lorenzo Capucci,¹ Scott M. Camazine,^{2§} and Cesare Rossi^{1*}

Reparto di Biologia Molecolare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia e Emilia-Romagna,
via Bianchi 9, Brescia, Italy 25124-I,¹ and Department of Entomology² and Department of
Biochemistry,³ Penn State University, University Park, Pennsylvania 16802

Received 16 November 2005/Accepted 21 February 2006



Apimondia
International
Federation of
Beekeepers'
Associations

XXXVIIIth APIMONDIA
INTERNATIONAL APICULTURAL CONGRESS
Ljubljana, Slovenia, August 24-29, 2003

XXXVIII. INTERNATIONALER
BIENZÜCHTERKONGRESS DER APIMONDIA
Ljubljana, Slowenien, 24.-29. August 2003

XXXVIIIe CONGRÈS
INTERNATIONAL D'APICULTURE DE L'APIMONDIA
Ljubljana, Slovénie, 24-29 août 2003

XXXVIII CONGRESO
INTERNACIONAL DE APICULTURA DE APIMONDIA
Ljubljana, Eslovenia, 24 - 29 de agosto de 2003

THE IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF DEFORMED WING VIRUS IN ITALIAN HONEY BEES AS A PRELIMINARY STEP FOR THE PRODUCTION OF SPECIFIC REAGENTS AND THE ESTABLISHMENT OF DIAGNOSTIC METHODS

No: 285

Topic: Bee pathology
Keywords: diagnosis, deforming wing virus, characterization
Authors: Antonio Lavazza, Daniela Gamba, Giuliana Botti, Norberto Milani,
Brenda V. Ball, Lorenzo Capucci
E-mail of corresponding author: alavazza@bs.izs.it



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
Lombardia e Emilia-Romagna
Via Bianchi 9, 25124-I Brescia
Tel. 030 2319111



Ricerca e sviluppo IZSLER



P.5 APPLICAZIONE DIAGNOSTICA DELLA *REAL-TIME* PCR PER L'IDENTIFICAZIONE DEL VIRUS DELLE API DEFORMI (DWV) IN *APIS MELLIFERA* L.

Beatrice Boniotti, Roberto Ferrari, Giuliana Botti, Claudia Nassuato, Antonio Lavazza
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia B. Ubertini, Brescia

- ✕ DWV possibile concausa della *Colony Collapse Disorder* (CCD), una sindrome multifattoriale.
- ✕ DWV molto diffuso e presente in forma latente
- ✕ Varroa che funge da vettore e attivatore virale
- ✕ Per comprendere il ruolo eziopatogenetico di DWV necessarie metodiche diagnostiche sensibili ed accurate

Sviluppo di un metodo molecolare quantitativo di Real-Time RT-PCR.

Risultati confrontati con quelli ottenuti con i metodi tradizionali in uso: IEM e MAb-ELISA

Confronto fra risultati con le 3 metodiche per DWV

- ✖ La metodica molecolare evidenziava la presenza del virus in **62** su **64** campioni testati (**96,87%**), seppure in alcuni con concentrazioni molto basse
- ✖ Risultarono positivi anche campioni negativi con le altre 2 metodiche, a testimonianza dell'elevata sensibilità del metodo

METODICA	N° positivi	N° negativi
ME (CN + IEM)	20	44
ELISA	22	42
Real-Time RT-PCR	62	2
TOTALE		64

Coefficiente di correlazione K

ELISA (S/P) vs ME (n° +) = 0,75 (IC95%=0,62-0,84)

RT-PCR Real-Time (log10 titolo) vs ME = 0,62 (IC95%=0,43-0,75)

ELISA vs RT-PCR Real-Time = 0,81 (IC95%= 0,7-0,88)

Quindi per Diagnosi di DWV....



- ✗ Le metodiche di ELISA e ME sembrano in grado di identificare l'infezione virale solamente quando questa supera una concentrazione di 10^6 copie virali/individuo (dato ricavato con Real Time PCR quantitativa)
- ✗ Possibile ipotizzare che tale valore di titolo virale sia un possibile **cut-off** per **discriminare un'infezione con sintomatologia latente** da una che causi un **quadro sintomatologico conclamato** nell'ospite

Prospettive applicative

Potenziale utilizzo della
Real Time PCR per:



1. monitorare l'evoluzione della virosi in una colonia durante l'anno (approccio utile per poter comprendere i meccanismi di associazione della virosi con lo scatenamento della CCD), sia che resti latente o che causi sintomatologia evidente
2. associare l'evoluzione del titolo virale in una colonia soggetta ad infestazione da varroa per comprendere il ruolo di questa come attivatore/vettore della replicazione virale
3. comprendere i meccanismi di replicazione del virus nell'acaro vettore

Altre informazioni su presenza di virus in Italia

dati ApeNet (anno 2009-2010)

- ✕ **DWV, BQCV, SBV, CBPV, ABPV, KBV e IAPV** sono stati identificati durante le indagini del 2009 e 2010. Mentre i primi 5 erano presenti in tutte le regioni italiane, anche se con diversa prevalenza, KBV e IAPV sono stati identificati solo in aree limitate.
- ✕ **DWV** e **BQCV**: 96% e 59%. Nel 2010, prevalenza di **SBV**: aumentata sensibilmente da 49 a 72%.
- ✕ La diagnosi di **DWV** e **ABPV** era fortemente correlata all'infestazione da varroa nelle colonie di api. Ciò in particolare nelle aree del Sud Italia dove per condizioni climatiche non c'è interruzione di covata.

dati BeeNet (1° anno 2011-2012)

- ✕ **DWV, CBPV, ABPV**: identificati mediante **Real Time RT PCR quantitativa** in tutta Italia.
- ✕ **DWV**: 96,7% positivi; 40% con $>10^7$ copie/ape
- ✕ **CBPV**: 57,7% positivi; 5,4% con $>10^7$ copie/ape
- ✕ **ABPV**: 53,6% positivi; 5,9% con $>10^7$ copie/ape

Le virosi delle api: conclusioni

- ✕ Le **manifestazioni cliniche** in corso di patologie delle api solo raramente sono patognomoniche ovvero molti sintomi sono comuni a molte malattie
- ✕ Sono sempre necessarie **analisi di laboratorio** per individuare le cause eziologiche
- ✕ Alcune situazioni patologiche sono la conseguenza di una **compromissione generale della colonia**, dovuta a disordini di varia natura (tossica, genetica, biochimica, metabolica etc), in associazione ad agenti infettivi, tra cui i virus, corresponsabili della rottura dell'equilibrio di forza delle famiglie **(Sindrome da spopolamento)**

Le virosi delle api: conclusioni

- ✕ I **virus** sono **agenti complicanti**, che trovano in altri patogeni, e segnatamente nella varroa, il fattore scatenante il loro sviluppo, contribuendo a determinare il collasso e la morte della famiglia
- ✕ La prevenzione delle malattie virali dipende principalmente dal **controllo della varroa** con interventi appropriati e con programmi territoriali

Grazie dell'attenzione!



*Grazie per il loro
contributo ai colleghi
e collaboratori*

- *Microscopia Elettronica,
Proteomica, Genomica –
IZS LER*
- *Bioteχνologie, Unità di
Apicoltura – IZS LT*