



LE VIROSI DELLE API E LA DIAGNOSTICA MOLECOLARE

Antonella Cersini
IZSLT, D.O. Biotecnologie



Anni successivi:
identificati e
caratterizzati
non meno di 19
virus

Tullis W, Bailey L, Edell TF. *Heavy Box Palletizing*. 2nd ed. Academic Press, London, 1989. p 11.



ULTERIORI VIRUS RECENTEMENTE SCOPERTI
PATOGENI PER LE API

• Sono 2 Picornavirus-like, appartenenti alla famiglia
Dicistroviridae:

- 1) *Aphid Lethal Paralysis Virus* (ALPV)
- 2) *Aphid Lethal Paralysis Virus ceppo Brooking* (ALPV strain
Brooking).

• Un lungo tratto del loro genoma (4.125 nucleotidi
comprendente la RdRP, le sequenze IRES e le sequenze
codificanti per le proteine del capside) è caratterizzato da
una omologia di sequenza nucleotidica dell'83% e da una
omologia di sequenza aminoacidica dell'89% con il
genoma dell'ALPV depositato in GenBank.





ULTERIORI VIRUS
RECENTEMENTE SCOPERTI PATOGENI
PER LE API

• Un *Picornavirus-like*, appartenente alla famiglia *Dicistroviridae*: *Big Sioux River Virus* (BSRVV)

• È considerato una nuova specie virale

• Le sequenze codificanti la RdRP e la IRES presentano, rispettivamente, una omologia di sequenza *percentuale* del 78% e del 69% con il *Rhopalosiphum padi Virus* (RSPV)



ULTERIORI VIRUS
RECENTEMENTE SCOPERTI PATOGENI
PER LE API

- Due Picornavirus-like, appartenenti alla famiglia Dicistroviridae che sono:
1) Lake Sinai Virus ceppo 1 (LSV1)
2) Lake Sinai Virus ceppo 2 (LSV2)
- LSV1 ed LSV2 presentano le seguenti omologie di ~~sequenza nucleotidica~~: a) 80% con la RdRP del Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV); b) 20% con la ORF1 del CBPV e c) 70% con le proteine del capside di Nucleopolytetraviridae





**ULTERIORI VIRUS
RECENTEMENTE SCOPERTI PATOGENI
PER LE API**

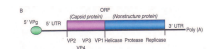
• Un Picornavirus-like, appartenente al genere Iflavirus:
Varroa Destructor Virus (VDV-1)

• Il VDV-1 presenta sia una identità di sequenza
nucleotidica dell'84% con la RdRp di Deformed Wing Virus
(DWV) e il Kagapo Virus (KV) che una identità di sequenza
amminocidica del 90% con le proteine strutturali
(VP1,VP2,VP3 e VP4) e non strutturali (elicasi, proteasi,
RdRp) di questi stessi due virus






VIRUS CON GENOMA
A ORGANIZZAZIONE MONOCISTRONICA




- Deformed Wing Virus (**DWV**)
- Sacrocod Virus (**SVV**)

Genere *Flavivirus*,
un genere "floating" in
quanto non è stato
assegnato a nessuna
famiglia




CBPV (Chronic Bee Paralysis Virus)



The diagram illustrates the genome structure of the Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV). It shows a single-stranded RNA genome with a 5' cap and a 3' poly-A tail. The genome is divided into several regions: a 5' non-coding region (5' NCR), a coding region (C) containing the VP1 gene, and a 3' non-coding region (3' NCR). The VP1 gene is flanked by two small RNA genes, RNA1 and RNA2. The genome is also associated with three small RNA genes, RNA3, RNA4, and RNA5, which are located downstream of the VP1 gene. The diagram includes scale bars indicating the length of the genome in nucleotides (nt) and the size of the subgenomic RNAs in base pairs (bp).

Fig. 1. Diagram of the genome organization of CBPV. The CBPV genome is a single-stranded RNA molecule of approximately 10 kb. It contains a single open reading frame (ORF) that encodes the VP1 protein. The genome is also associated with three small RNA genes, RNA3, RNA4, and RNA5, which are located downstream of the VP1 gene. The diagram shows the arrangement of the genes and the subgenomic RNAs, as well as the location of the VP1 gene. The scale bars indicate the length of the genome in nucleotides (nt) and the size of the subgenomic RNAs in base pairs (bp).

- Il genoma è bipartito (RNA1 ed RNA2) e sono presenti 3 piccoli RNA (RNA 3, 4, 5) che si ritiene codificano il genoma del suo virus satellite (CBPVV).
- CBPV non è incluso in nessuna famiglia o genere e può essere considerato come un prototipo di un nuovo genere di virus ad RNA positivo.
- La filofy di CBPV mostra una elevata omologia di sequenza con la filofy dei membri della famiglia dei Tospoviridae e dei Tombusviridae.





ABPV (Acute Bee Paralysis Virus)
Superfamiglia: Picornavirus-like
Famiglia: Dicistroviridae
Genere: Crispavirus



Sintomi:

paralisi, alterazione del comportamento
con carente accudimento della covata e
colore nerastro dell'addome e dei torace
a causa della perdita dei peli





KBV (Kashmir Bee Virus)
Superfamiglia: Picornaviridae-like
Famiglia: Dicistroviridae
Genere: Crispavirus



Sintomi:

tremori che progrediscono in paralisi,
incapacità a volare ed a nutrirsi, colore
nerastro dell'addome e del torace a
causa della perdita dei peli



Image courtesy: [illegible]



IAPV (Israeli Acute Paralysis Virus)

Superfamiglia: Picornaviridae-like

Famiglia: Dicistroviridae

Genere: Cripavirus



Sintomi:

annebbimento dell'addome e del torace,
movimento circolare, atassia, scarsa
attitudine al volo ed a nutrirsi, paralisi,
spasmi e morte (sintomatologia
prodotta in infezioni sperimentali)



G. Carballi - 2010



BQCV (Black Queen Cell Virus)

Superfamiglia: Picornavirus-like

Famiglia: Dicistroviridae

Genere: Cripavirus



• Sintomi: colpisce esclusivamente le larve delle api regine determinando l'arrestamento sia delle forme larvali che delle pupe delle celle reali con conseguente morte

• L'infezione delle larve avviene tramite l'alimentazione con pappa reale contaminata





SBV (Sacbrood Virus)
Superfamiglia: Picornavirus-like
Famiglia: Flaviridae
Genere: Flavivirus



Il quadro sintomatologico si evidenzia nelle larve opescolate che assumono un aspetto saccolforme (dovuto alla fluidificazione del corpo, mentre il legamento rimane integro). Le larve muoiono nel momento in cui vengono estratte dalle celle dalle nutrici.





DWV (Deformed Wing Virus)
Superfamiglia: Picornavirus-like



Famiglia: *Flaviviridae*
Genere: *Flavivirus*

- Sintomi: gravi deformazioni a carico delle ali, ridotte dimensioni del corpo, aspettativa di vita molto breve

- Nelle infezioni asintomatiche, DWV è localizzato nell'addome, nel torace e nelle ghiandole ipofaringee

- Nelle infezioni sintomatiche, DWV è localizzato nel cervello





Ministero della Sanità

CBPV (Chronic Bee Paralysis Virus)

Superfamiglia: Picornavirus-like

Famiglia: Non classificato

Genere: Non classificato



- Si possono distinguere 2 sindromi ben distinte in base alle caratteristiche genetiche delle api
- **"mal della foresta"**, le api non sono in grado di volare, sono tremolanti e tendono a raggrupparsi davanti alle amie dove muoiono
- **"mal nero"**, le api sono nere a causa della perdita dei peli, sono in grado di volare ed hanno piccole dimensioni. Rapidamente subentrano tremori e morte



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



DIAGNOSI DELLE VIROSI DELLE API

- Virus non coltivabili in vitro: impossibile isolamento virale
- Microscopia elettronica: utile come tecnica di screening ma non consente l'identificazione della specie virale (tranne quando sono disponibili sieri specifici per i virus)
- Tecniche molecolari PCR (Polymerase Chain Reaction): alta sensibilità e specificità





**DIAGNOSI DELLE VIROSI
DELLE API**



Titolo della Commissione:

• api adulte vive, morte, agonizzanti
• covetto a differenti stadi di crescita:



- larve non opercolate di 2-3 e 5-6 giorni di vita
- larve opercolate - prepupa
- pupa con occhi bianchi, rossi, neri
- api alla sfarfallamento



• varroa



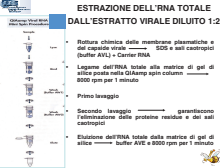
- Congelare e conservare i campioni a -20°C (fino all'analisi)
- Inviare adeguate e complete informazioni anamnestiche

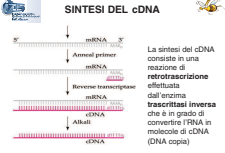


FASI DI LAVORAZIONE



- Preparazione dell'estratto virale dalle api (~10 api), dalle larve e dalle pupae
- Estrazione dell'RNA mediante kit commerciale (QIAamp Viral RNA Min Kit)
- Sintesi del DNA copia (cDNA)
- Amplificazione (PCR) con i primers specifici per le virusi esaminato
- Elettroforesi in gel di agarosio dei prodotti di PCR



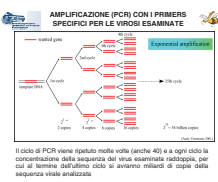




SINTESI DEL cDNA



- La sintesi del cDNA sfrutta l'utilizzo dei random primers (primers costituiti da soli 6 nucleotidi) che si appaiano in maniera aspecifica alle molecole di RNA a singolo filamento
- Aumenta enormemente la sensibilità diagnostica in quanto permette di amplificare in numerose copie di cDNA un numero ridotto di genomi virali
- Kit impiegato: High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)





AMPLIFICAZIONE (PCR) CON I PRIMERS SPECIFICI PER LE VIROSI ESAMINATE

- Le diverse reazioni di amplificazione (PCR) vengono effettuate utilizzando il Kit Platinum® DNA Polymerase (Invitrogen)
- Lo stampo nella reazione di PCR è costituito dal cDNA
- I primers impiegati sono specifici per la sequenza virale da ricercare
- Le amplificazioni seguono tutte uno stesso schema: 94°C per 7 minuti seguiti da 40 cicli costituiti da 94°C per 1 minuto, 55°C (54°C per IAPV) per 1 minuto, 72°C per 1 minuto e infine 72°C per 10 minuti





TARGET AMPLIFICATI MEDIANTE PCR

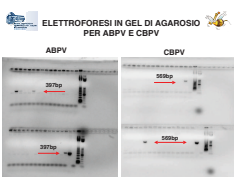
- **ABEY** la proteina VP2
- **ENV** la proteina VP2
- **CBP2** la RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)
- **BDP2** la RNA-dependent RNA polymerase gene (RdRp)
- **KBL** la RNA-dependent RNA polymerase gene (RdRp)
- **ABV** la proteina VP2
- **SVB** la proteina VP2

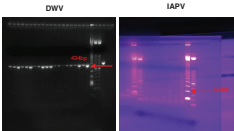


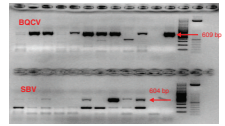
**ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO DEI
PRODOTTI DI PCR**

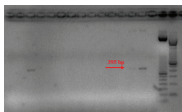
• L'elettroforesi è un metodo molto semplice e rapido per separare ed identificare i frammenti di DNA in base al loro peso molecolare

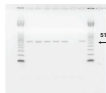
• La localizzazione del DNA nel gel è determinata mediante l'aggiunta, nel gel stesso, di un colorante (GelRed™ 10.000X, Biotium Inc.) che si intercala nelle molecole di DNA producendo una fluorescenza rosso-arancio quando viene colpito da radiazioni ultraviolette (260-302nm)











- Viene effettuata una reazione di PCR con i primari specifici per la β -actina delle api
- La PCR per la β -actina permette di capire se:
 - a) l'estrazione dell'RNA totale sia effettivamente riuscita bene
 - b) l'integrità/integrità dell'RNA
 - c) la presenza/assenza di contaminanti per la Transcriptasi inversa e per la DNA Polimerasi

• Rete di monitoraggio regionale APENET TOSCANA: è inserita nel "Progetto biennale di monitoraggio sullo stato di salute delle api (APENET nazionale)" e comprende i moduli di Firenze, Siena, Arezzo (a partire da giugno 2009) e Lucca (a partire da giugno 2010).

• Ognuno di questi 4 moduli è costituito da 5 apiari. Ciascun apiario è formato da 10 alveari, per un totale di 50 alveari.



sulla moria delle api in 5 aree naturali protette (Parco

- Gli apiai selezionati sono posti in 2 diverse zone per ciascuna delle 5 aree naturali protette: a) una zona a ridotta pressione antropica; b) una zona a forte pressione antropica.

* Gli spalti sono stati controllati 4 volte all'anno a partire da settembre-novembre 2009 fino a settembre-novembre 2010



**APPLICAZIONI DELLA DIAGNOSTICA
MOLECOLARE PER LE VIROSI DELLE API**

• Progetto "Spopolamento e Morte degli alveari" in cui vengono segnalati ed esaminati gli aperei dove si manifestano fenomeni di spopolamento e morte delle api

• Finora sono stati segnalati 14 episodi di spopolamento tra il 2009 ed il 2011

• Progetto "Assistenza tecnica in apicoltura" previsto dal Reg. CE 1254/2007 in cui hanno aderito 66 aziende apistiche tutte in possesso del codice aziendale

• Tutti gli alveari di queste 66 aziende apistiche sono stati controllati nei mesi estivi nel corso del 2010

• Campioni di routine



GRAZIE PER L'ATTENZIONE