



LE VIROSI DELLE API E LA DIAGNOSTICA MOLECOLARE

Antonella Cersini
IZSLT, D.O. Biotecnologie

• **1963:**
evidenziazione
primo virus
delle api
(CBPV)

Anni successivi:
identificati e
caratterizzati
non meno di 19
virus



VIRUS DELLE API

Apis mellifera	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	BVY	"		"
	Kashmir (ceppi Australiani) Virus	KBV			RNA
	Egypt Virus	EBV			"
	Virus della Covata a Sacco	SBV			"
	Arkansas Virus	ABV			"
	Virus della Paralisi Lenta	SPV			"
	Black Queen Cell Virus	BQCV			"
	Virus della Paralisi Acuta	APV	30nm		"
	Virus delle Ali Deformi	DWV			"
	Bombus Virus della Paralisi Acuta	APV			RNA
	Virus della Covata a Sacco (ceppo Tahiti)	SBV			RNA
	Kashmir (ceppo Indiano) Virus	KBV			"
	Apis cerana Virus Iridescente	AIV	150nm		DNA

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



ULTERIORI VIRUS RECENTEMENTE SCOPERTI PATOGENI PER LE API

- Sono 2 *Picornavirus-like*, appartenenti alla famiglia *Dicistoviridae*:
 - 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 capsido) è caratterizzato da una omologia di sequenza nucleotidica dell'83% e da una omologia di sequenza amminoacidica dell'89% con il genoma dell'ALPV depositato in GenBank



ULTERIORI VIRUS RECENTEMENTE SCOPERTI PATOGENI PER LE API

- Un *Picornavirus-like*, appartenente alla famiglia *Dicistoviridae*: *Big Sioux River Virus* (BSRV)
- È considerato una nuova specie virale
- Le sequenze codificanti la RdRP e la IRES presentano, rispettivamente, una omologia di sequenza amminoacidica del 78% e del 69% con il *Rhopalosiphum Padi Virus* (RhPV)



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 capsido di *Nudaurelia Capensis beta-tetravirus*

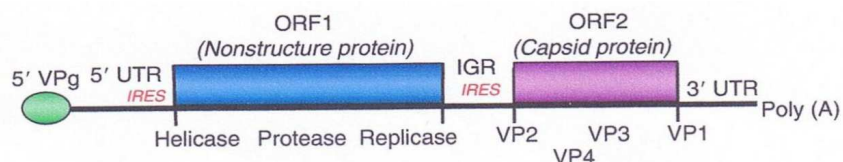


ULTERIORI VIRUS RECENTEMENTE SCOPERTI PATOGENI PER LE API

- 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 di *Kagugo Virus* (KV) che una identità di sequenza amminoacidica 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 BICISTRONICA



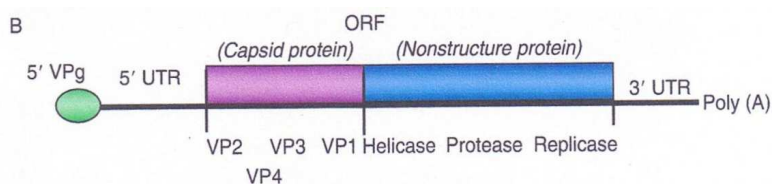
- Acute Bee Paralysis Virus (**ABPV**)
- Black Queen Cell Virus (**BQCV**)
- Kashmir Bee Virus (**KBV**)
- Israeli Acute Paralysis Virus (**IAPV**)

Genere *Cripavirus*

Famiglia *Dicistroviridae*



VIRUS CON GENOMA A ORGANIZZAZIONE MONOCISTRONICA



- Deformed Wing Virus (**DWV**)
- Sacbrood Virus (**SBV**)

Genere *Iflavirus*,

un genere "floating" in
quanto non è stato
assegnato a nessuna
famiglia

CBPV (*Chronic Bee Paralysis Virus*)

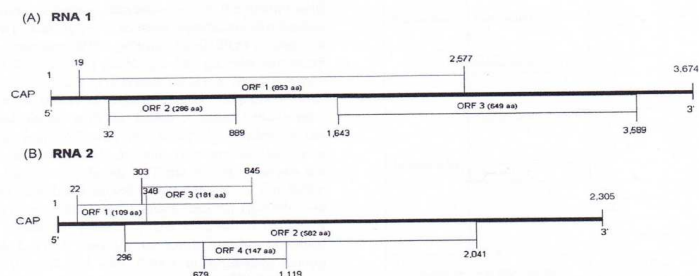


Fig. 2. Diagram of the predicted genome organisation of CBPV RNA 1 (A) and RNA 2 (B). Seven putative ORFs are indicated with their positions and the putative sizes of their protein products.

- Il genoma è bipartito (RNA1 ed RNA2) e sono presenti 3 piccoli RNA (RNA a, b, c) che si ritiene costituiscano il genoma del suo virus satellite (CBPSV: Chronic Bee Paralysis Satellite Virus)
- 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 RdRp di CBPV mostra una elevata omologia di sequenza con le RdRp dei membri della famiglia dei Nodaviridae e dei Tombusviridae



ABPV (*Acute Bee Paralysis Virus*)

Superfamiglia: *Picornavirus-like*

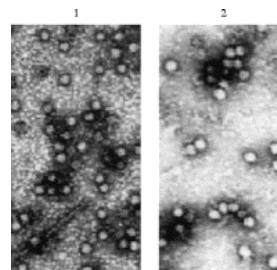
Famiglia: *Dicistroviridae*

Genere: *Cripavirus*



Sintomi:

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

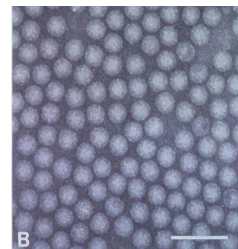


KBV (*Kashmir Bee Virus*)
Superfamiglia: *Picornavirus-like*
Famiglia: *Dicistroviridae*
Genere: *Cripavirus*



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



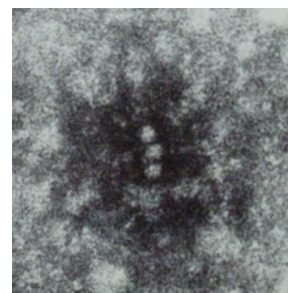
Hung e Shimanuki, 1999

IAPV (*Israeli Acute Paralysis Virus*)
Superfamiglia: *Picornavirus-like*
Famiglia: *Dicistroviridae*
Genere: *Cripavirus*



Sintomi:

annerimento 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. Cardeti - 2010

BQCV (*Black Queen Cell Virus*)

Superfamiglia: *Picornavirus-like*

Famiglia: *Dicistroviridae*

Genere: *Cripavirus*



- Sintomi: colpisce esclusivamente le larve delle api regine determinando l'annerimento sia delle forme larvali che delle pareti 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: *Iflaviridae*

Genere: *Iflavirus*



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



DWV (*Deformed Wing Virus*)

Superfamiglia: *Picornavirus-like*
Famiglia: *Iflaviridae*
Genere: *Iflavirus*



- 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



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 arnie 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) Sana 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



Tipologia Campioni:

- ❖ api adulte: vive, morte, agonizzanti
- ❖ covata a differenti stadi di crescita:
 - larve non opercolate di 2-3 e 5-6 giorni di vita
 - larve opercolate - propuole
 - pupe con occhi bianchi, rosa, marroni
 - api allo sfarfallamento
- ❖ varroa ⇒



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

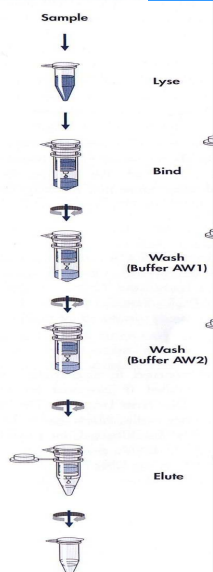
FASI DI LAVORAZIONE



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

ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE DALL'ESTRATTO VIRALE DILUITO 1:2

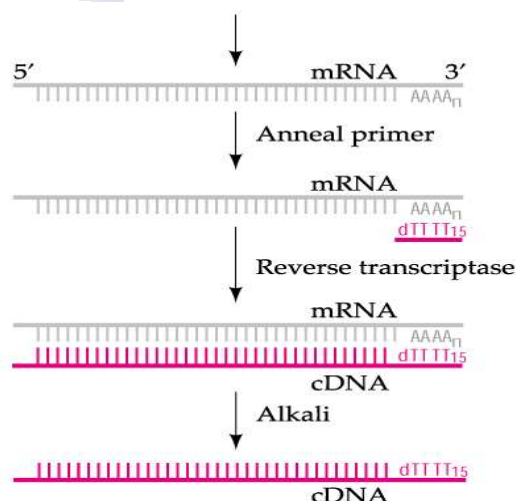
QIAamp Viral RNA Mini Spin Procedure



- Rottura chimica delle membrane plasmatiche e del capsid virale → SDS e sali caotropici (buffer AVL) + Carrier RNA
- Legame dell'RNA totale alla matrice di gel di silice posta nella QIAamp spin column → 8000 rpm per 1 minuto
- Primo lavaggio
- Secondo lavaggio → garantiscono l'eliminazione delle proteine residue e dei sali caotropici
- Eluizione dell'RNA totale dalla matrice di gel di silice → buffer AVE e 8000 rpm per 1 minuto



SINTESI DEL cDNA



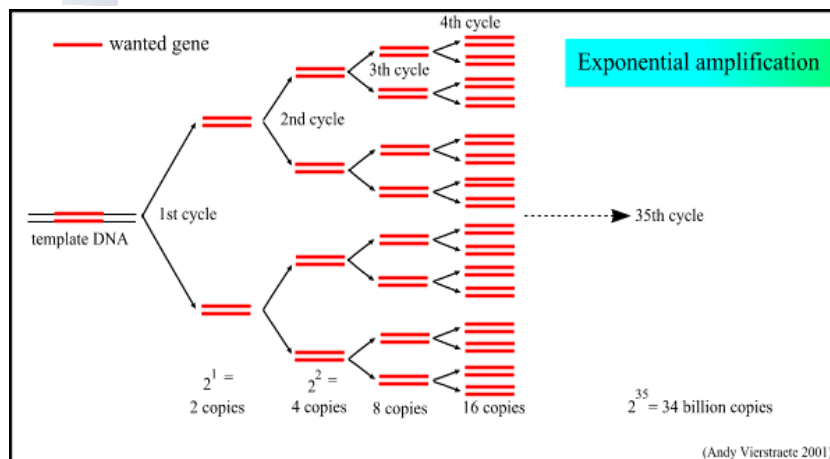
La sintesi del cDNA consiste in una reazione di **retrotrascrizione** effettuata dall'enzima **trascrittasi inversa** che è in grado di convertire l'RNA in molecole di cDNA (DNA copia)

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



Il ciclo di PCR viene ripetuto molte volte (anche 40) e a ogni ciclo la concentrazione della sequenza del virus esaminata raddoppia, per cui al termine dell'ultimo ciclo si avranno miliardi di copie della sequenza virale analizzata

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

- **ABPV**: la proteina VP2
- **DWV**: la proteina VP2
- **CBPV**: la RNA-dependent-RNA polymerase (RdRp)
- **BQCV**: la RNA-dependent-RNA polymerase gene (RdRp)
- **KBV**: la RNA-dependent-RNA polymerase gene (RdRp)
- **IAPV**: la proteina VP2
- **SVB**: la proteina VP2



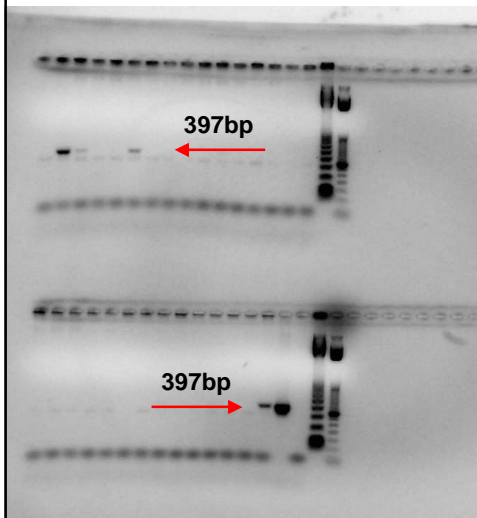
ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO DEI PRODOTTI DI PCR

- 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 (260-360nm)

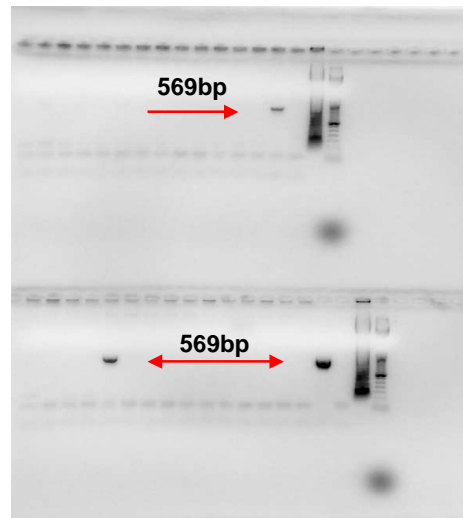
ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO PER ABPV E CBPV



ABPV



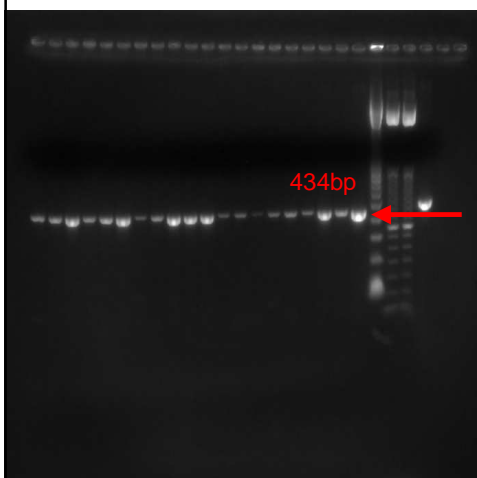
CBPV



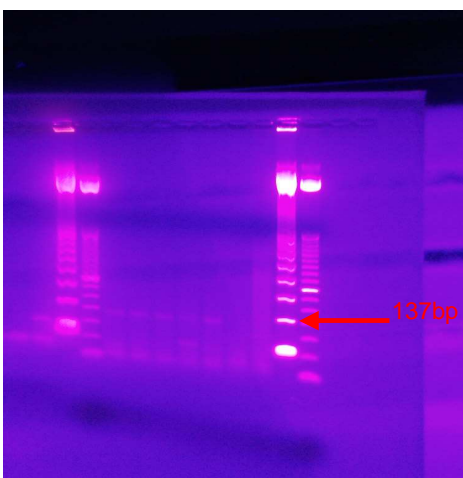
ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO PER IAPV E DWV



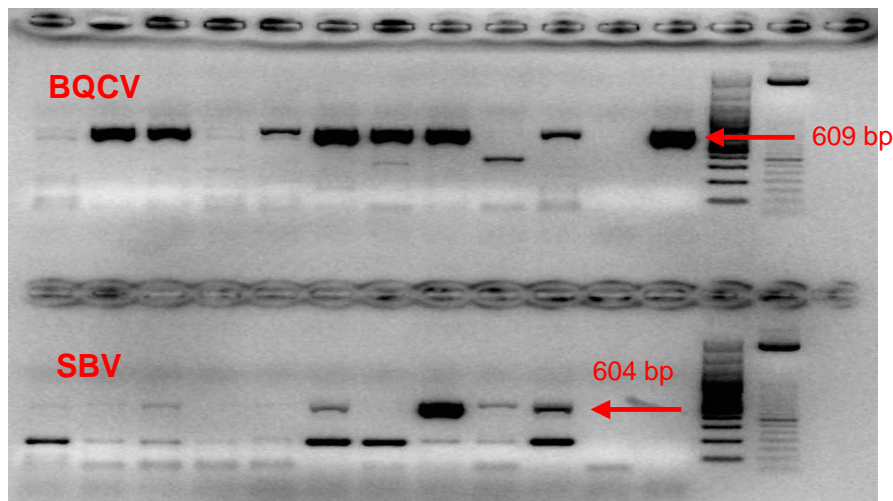
DWV



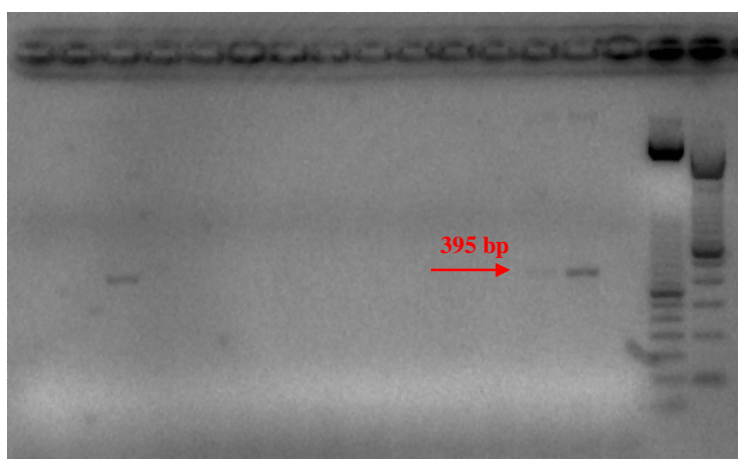
IAPV



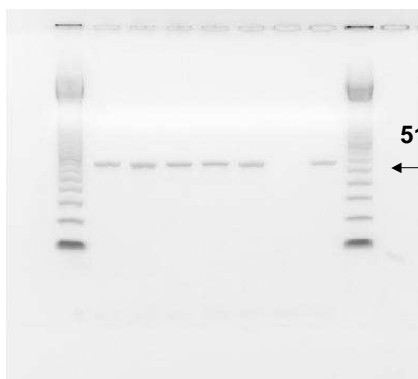
ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO PER BQCV E SBV



ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO PER KBV



CONTROLLO ESTRAZIONE: β -ACTINA DELLE API



514 bp

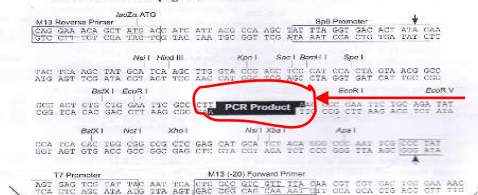
- Viene effettuata una reazione di PCR con i primers specifici per la β -actina delle api
- La PCR per la β -actina permette di capire se:
 - a) l'estrazione dell'RNA totale sia effettivamente riuscita bene
 - b) l'integrità/degradazione dell'RNA
 - c) la presenza/assenza di inibenti per la Trascrittasi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

CONTROLLO DI AMPLIFICAZIONE



Map of pCR[®]II-TOPO[®]

pCR[®]II-TOPO[®] Map The map below shows the features of pCR[®]II-TOPO[®] and the sequence surrounding the TOPO[®] Cloning site. Restriction sites are labeled to indicate the actual cleavage site. The arrows indicate the start of transcription for Sp6 and T7 polymerases. The complete sequence of pCR[®]II-TOPO[®] is available for downloading from our Web site (www.invitrogen.com) or by contacting Technical Service (page 24).



Comments for pCR[®]II-TOPO[®]
3973 nucleotides
LacZ α gene: bases 1-589
M13 Reverse priming site: bases 205-221
Sp6 promoter: bases 239-256
Multiple Cloning Sites: bases 269-383
T7 promoter: bases 406-425
M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448
f1 origin: bases 500-1027
Kanamycin resistance ORF: bases 1361-2155
Ampicillin resistance ORF: bases 2173-3033
pUC origin: bases 3178-3851



Sequenza amplificata dai primers scelti, specifica per un determinato virus e clonata all'interno del plasmide



APPLICAZIONI DELLA DIAGNOSTICA MOLECOLARE PER LE VIROSI DELLE API

- 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**



APPLICAZIONI DELLA DIAGNOSTICA MOLECOLARE PER LE VIROSI DELLE API

- Rete di monitoraggio nazionale APEPARK: è una indagine sulla moria delle api in 5 aree naturali protette (Parco Nazionale delle Dolomiti Bellunesi-Veneto, Parco dei Gessi Bolognesi e dei Calanchi dell'Abadessa-Emilia Romagna, Parco di Migliarino San Rossore Massaciuccoli-Toscana, Riserva Naturale Statale del Litorale Romano-Lazio e Parco dei Monti Simbruini-Lazio)
- Gli apiari 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 apiari sono stati controllati 4 volte/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 apiari dove si manifestano fenomeni di spopolamento e morte delle api
- Finora sono stati segnalati 14 episodi di spopolamento tra il 2009 ed il 2011



APPLICAZIONI DELLA DIAGNOSTICA MOLECOLARE PER LE VIROSI DELLE API

- Progetto “Assistenza tecnica in apicoltura” previsto dal Reg. CE 1234/2007 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