

PROGETTI DI “RICERCA CORRENTE 2019”
RELAZIONE FINALE

N. identificativo progetto: IZS LT 04/19 RC

Progetto presentato da:

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE

LAZIO E TOSCANA “M. ALEANDRI”

Area tematica: Sanità e benessere animale

Titolo del progetto: Studio sulla diffusione dei virus responsabili di paralisi nelle api in Italia, con particolare riferimento all'Italia Centrale

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute

Responsabile Scientifico: Antonella Cersini

SINTESI

Titolo: Studio sulla diffusione dei virus responsabili di paralisi nelle api in Italia, con particolare riferimento all'Italia Centrale

Parole chiave: ABPV, KBV, IAPV, CBPV, SBPV, DWV, DWV-B, LSV-1, LSV-2 virus, prevalenza

Testo

Le malattie infettive emergenti delle api sono uno dei fattori chiave del declino di questi insetti impollinatori e, tra i patogeni coinvolti, sono presenti i virus responsabili delle paralisi: il virus della paralisi acuta (ABPV), il virus Kashmir (KBV), il virus israeliano della paralisi acuta (IAPV), appartenenti alla famiglia *Dicistroviridae* che costituiscono un complesso (AKI) e, dal punto di vista genetico, sono strettamente correlati tra di loro; il virus della paralisi cronica (CBPV), non ancora assegnato ad una specifica famiglia e genere, ma dotato di una elevata omologia di sequenza con i membri della famiglia *Nodaviridae* e *Tombusviridae*; il virus della paralisi lenta (SBPV), appartenente alla famiglia *Flaviviridae*, non ancora rilevato in Italia. Un ulteriore virus indagato è il DWV-B o DWV ricombinante che sta scalzando il DWV-A in quanto si moltiplica efficacemente nella *Varroa destructor* e quindi si diffonde con grande velocità in *Apis mellifera*. Questi virus sono responsabili delle perdite improvvise delle colonie con conseguenti danni economici per gli apicoltori ed impoverimento della flora per l'attività fondamentale svolta dagli Apoidei come impollinatori. Con questo progetto ci si propone di effettuare studi di prevalenza delle diverse forme virali responsabili delle sindromi paralitiche delle api in Italia e, con particolare riferimento, al Centro Italia. I dati di prevalenza che si otterranno saranno di supporto agli apicoltori in quanto andranno ad incrementare le conoscenze sullo stato sanitario dei loro alveari utili a migliorare la loro gestione per ridurre il possibile impatto dei virus, considerato il fatto che i virus responsabili delle forme di paralisi sono molto resistenti sia nell'ambiente, nel nettare e nel polline e possono infettare non soltanto le api ma anche tutti gli altri insetti impollinatori selvatici. Inoltre abbiamo iniziato a sviluppare protocolli molecolari per la ricerca di ulteriori due virus appartenenti al genere *Halictivirus*, famiglia dei *Sinivirus* che recentemente sono stati scoperti nell'intestino di *Apis mellifera*: *Lake Sinai Virus 1* (LSV-1) e *Lake Sinai Virus 2* (LSV-2)

SUMMARY

Key words: ABPV, KBV, IAPV, CBPV, SBPV, DWV, DWV-B, LSV-1 LSV-2, virus, prevalence

Testo in inglese

Honey bees' emerging infectious diseases are one of the key factors in the decline of these pollinating insects. Among the pathogens involved are the viruses responsible for paralysis: *Acute Paralysis Virus* (ABPV), *Kashmir Bee Virus* (KBV), *Israeli Acute Paralysis Virus* (IAPV). These viruses belong to the family *Dicistroviridae* and form a complex (AKI). Genetically, they are closely related to each other. Another pathogen, *Chronic Paralysis Virus* (CBPV), is not yet assigned to a specific family and genus, but has a high sequence homology with members of the family *Nodaviridae* and *Tombusviridae*. *Slow Bee Paralysis Virus* (SBPV), is part of the family *Flaviviridae*, not yet detected in Italy. An additional virus investigated is *Deformed Wing Virus B* (DWV-B) or recombinant DWV, which is undermining DWV-A as it multiplies efficiently in *Varroa destructor* and spreading with great speed in *Apis mellifera*. All these viruses are responsible for sudden colony losses which result in economic damage to beekeepers and depletion of the flora due to the fundamental activity carried out by Apoidea as pollinators. The aim of this project is to study the prevalence of the different viral forms responsible for bee paralytic syndromes in Italy, with particular reference to Central Italy. The prevalence data that obtained will be of support to beekeepers increasing the health's status' knowledge of the hives. Furthermore this

could lead to an improved management of the hives to reduce the possible impact of viruses considering the fact that these pathogens are very resistant in environment, nectar and pollen, and can infect also all other wild pollinating insects. Moreover, we started to develop 2 new molecular protocols to identify 2 new viruses belonging to the genus *Halictivirus*, family *Sinaivirus*. This 2 viruses were recently found in *Apis mellifera*'s intestine and are *Lake Sinai Virus 1* (LSV-1) and *Lake Sinai Virus 2* (LSV-2)

INTRODUZIONE

Le malattie infettive emergenti delle api sono uno dei fattori chiave del declino di questi insetti impollinatori e, tra i patogeni coinvolti, sono presenti i virus responsabili delle paralisi: il virus della paralisi acuta (ABPV), il virus Kashmir (KBV), il virus israeliano della paralisi acuta (IAPV), appartenenti alla famiglia *Dicistroviridae* che costituiscono un complesso (AKI) e, dal punto di vista genetico, sono strettamente correlati tra di loro; il virus della paralisi cronica (CBPV), non ancora assegnato ad una specifica famiglia e genere, ma dotato di una elevata omologia di sequenza con i membri della famiglia *Nodaviridae* e *Tombusviridae*; il virus della paralisi lenta (SBPV), appartenente alla famiglia *Flaviviridae*, non ancora rilevato in Italia. Questi virus sono responsabili delle perdite improvvise delle colonie con conseguenti danni economici per gli apicoltori ed impoverimento della flora per l'attività fondamentale svolta dagli Apoidei come impollinatori. Un ulteriore virus responsabile delle morie autunnali è il DWV virus ed in questa ricerca abbiamo indagato la coesistenza di due forme di DWV ormai circolanti nel mondo dato che sul territorio italiano non ci sono dati tra il DWV-A (DWV normale) ed il DWV-B o DWV-ricombinante, quest'ultimo generatosi dalla ricombinazione tra il *Varroa destructor* virus ed il DWV – A. Con questo progetto ci si propone di effettuare studi di prevalenza delle diverse forme virali responsabili delle sindromi paralitiche delle api in Italia e, con particolare riferimento, al Centro Italia. I dati di prevalenza che si otterranno saranno di supporto agli apicoltori in quanto andranno ad incrementare le conoscenze sullo stato sanitario dei loro alveari utili a migliorare la loro gestione per ridurre il possibile impatto dei virus, considerato il fatto che i virus responsabili delle forme di paralisi sono molto resistenti sia nell'ambiente, nel nettare e nel polline e possono infettare non soltanto le api ma anche tutti gli altri insetti impollinatori selvatici.

In dettaglio, gli obiettivi di questa ricerca possono essere riassunti nei seguenti punti: a) messa a punto di protocolli sia reverse Real Time PCR che di reverse PCR per la diagnosi dei principali virus delle api (ABPV, CBPV, DWV-A, DWV-B, IAPV, KBV, BQCV, SBPV); b) valutare la presenza e la prevalenza di *Slow Bee Paralysis Virus* (SBPV) e *Deformed Wing Virus B* (DWV-B) in campioni di api pervenuti presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana (IZSLT) e raccolti da diverse regioni d'Italia sia nel corso di diverse Ricerche Correnti condotte negli anni 2018-20, in cui è stato esaminato lo stato di salute delle api, e sia in campioni di routine raccolti nel 2021-22 segnalati come morie anomale.

MATERIALI E METODI

Sviluppo dei protocolli di RT-PCR Real Time PCR per i virus Acute Bee Paralysis virus (ABPV), Chronic Bee Paralysis virus (CBPV) e Deformed Wing virus (DWV)

Sono stati sviluppati tre protocolli di RT-PCR Real Time PCR per i virus ABPV, CBPV, DWV, DWV-B, BQCV e SBV.

Tutti questi protocolli si basano sulla sintesi del cDNA seguita dalle specifiche reazioni di Real Time PCR per i tre virus sopra riportati.

Nell'allegato 1 è riportato il protocollo dettagliato relativo alle RT-Real Time PCR CBPV e DWV dove lo si sta adattando nel format utilizzato per la stesura delle procedure operative.