

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PATÓGENOS QUE AFETAM ABELHAS *APIS MELLIFERA*

ALICE VALENTE GONÇALVES PORTILHA¹; LARIANE DA SILVA BARCELOS²;
MATHEUS IURI FRÜHAUF³; GEFERSON FISCHER⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – alicevgportilha@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – larianebarcelos@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – matheus.ifruhauf@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – geferson.fischer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As abelhas *Apis mellifera* são agentes polinizadores muito importantes para a preservação do ecossistema, biodiversidade e aumento da produtividade agrícola (BARCELOS et al., 2013; RICKETTS et al., 2008). Existem vários patógenos que acometem as colônias de abelhas, provocando perdas na indústria apícola, dentre os quais pode-se citar o microsporídio *Nosema* spp., o vírus deformador de asas (DWV, do inglês *Deformed Wing Virus*) e o vírus da realeira negra (BQCV, do inglês *Black Queen Cell Virus*) (MCMENAMIN; FLENNIKEN, 2018; POTTS et al., 2010).

A infecção viral causada pelo DWV pode ser transmitida através do acasalamento, gerando descendentes contaminados, mas que nem sempre apresentam sinais clínicos (DE MIRANDA; GENERSH, 2010). No entanto, quando concomitante à infecção pelo ácaro *Varroa destructor*, vetor de transmissão viral, as abelhas podem apresentar deformações nas asas e redução da longevidade (OLIVEIRA, 2015; WOODFORD et al., 2022). Já na infecção por BQCV, geralmente assintomática, pode ocorrer o escurecimento do opérculo, levando princesas em estágio larval à morte (ŠIMENC et al., 2021).

Há duas espécies de *Nosema* spp. que afetam negativamente a longevidade em colônias de abelhas: o *N. apis* e *N. ceranae*, e os sinais clínicos são diferentes dependendo do agente. Infecções por *N. apis* são responsáveis pela nosemose tipo A, que causa diarreia e manchas fecais na colmeia, redução na produção de mel e aumento da mortalidade durante o inverno. A nosemose tipo C, causada por *N. ceranae*, resulta em fraqueza e pode culminar em colapso da colmeia afetada (HIGES et al., 2020; MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2018).

A interação sinérgica entre *N. ceranae* e BQCV em abelhas operárias eleva a mortalidade em casos de coinfecção (DOUBLET et al., 2015). A aplicação de métodos diagnósticos de alta especificidade, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), mostra-se conveniente na vigilância epidemiológica (CAGIRGAN; YAZICI, 2020). Ao permitir a detecção de mais de um agente simultaneamente, a PCR *multiplex* otimiza a rotina laboratorial e foi o método utilizado neste estudo, cujo resumo objetivo relatar a identificação de casos múltiplos de coinfecção por três patógenos: *N. ceranae*, DWV e BQCV em apiários do sul do Brasil.

2. METODOLOGIA

2.1 Coleta: Para a elaboração deste trabalho, abelhas de oito colmeias localizadas em Porto Alegre (RS) foram coletadas, de forma aleatória, armazenadas e refrigeradas até a chegada ao Laboratório de Virologia e Imunologia da Universidade Federal de Pelotas (LABVIR/UFPel), onde foram congeladas a -80°C.

2.2 Preparo: Das oito amostras compostas por cerca de 20 abelhas adultas, foram selecionadas, aleatoriamente, seis abelhas inteiras ainda congeladas, das quais os abdomens foram seccionados e macerados.

2.3 Extração de RNA e cDNA: Foi realizada extração de RNA com o agente TRI-zol™ (Life Technologies, Carlsbad, CA), conforme as instruções do fabricante. As amostras foram submetidas à síntese do DNA complementar (cDNA), com o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™).

2.4 rtPCR: Neste estudo foram utilizadas duas PCR *multiplex* para detecção dos vírus e uma PCR duplex para detecção de *Nosema* spp. Os pares de primers utilizados para a duplex foram *N. Apis* (F:GCATGTCTTGACGTACTATGTA, R:CGTT-TAAAATGTGAAACAACATATG) com amplicon de 321pb, e *N. Ceranae* (F:CGA-CGATGTGATATGAAAATATTAA, R:TCATTCTCAAACAAAAAACCG) com amplicon de 218pb (MARTÍN-HERNÁNDEZ et al., 2007). Os pares de primers utilizados na *multiplex* estão descritos na tabela 1, a seguir.

Tabela 1. Pares de primers *multiplex* utilizados no estudo

	Multiplex 1			Multiplex 2		
Vírus	ABPV	CBPV	SBV	IAPV	BQCV	DWV
Primer F	TCTGAT GATG- CTGAA GAGAG AAA	CAAC- CTG- CCT- CAACA- CAG	AAGGG- CGGTG- GAC- TATG	AGACA- CCAAT- CACG- GACCT- CAC	AGTGG- CGGA- GATGTA- TGC	GAGA- TTGAAG CGCATG AACAA
Primer R	AAT- CAT- CATTG- CCGG- CTCTA	AA- TCTGG- CAAGG- TTGAC- TGG	CCAC- TAGG- TGATCC ACACT	AGA- TTTG- TCTG- TCTCCC AGTG CACAT	GGAGG- TGAAG- TGGCTA- TATC	TGAATT- CAGTG- TCG- CCCATA
Amplicon	514pb	296pb	135pb	475pb	294pb	130pb

Fonte: Hou et al., 2014; Teixeira et al., 2008; Tsevegmid et al., 2016.

As condições de termociclagem das duas *multiplex* foram as mesmas: 94°C por 3 minutos, seguidas de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos, com extensão final de 72°C por 7 minutos. Já para o duplex, as condições de termociclagem foram: 94°C por 2 minutos, seguido de 10 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 40 segundos. Após esta etapa, 20 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 45 segundos, 72°C por 50 segundos com extensão final de 72°C por 7 minutos. Todas as PCRs realizadas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizadas em transiluminador UV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema *multiplex* é uma alternativa rápida e econômica para detecção de vários agentes em uma única amostra (SGUAZZA et al., 2013), e foi o método utilizado em nosso trabalho para detecção de múltiplos casos de coinfeção por três patógenos. Das amostras analisadas, mostrou-se alta prevalência de coinfeção por DWV, BQCV e *Nosema ceranae*. Não foi encontrada infecção por *Nosema apis*.

Segundo Tentcheva et al. (2004), os resultados de seu estudo fornecem evidências de que múltiplas infecções são detectadas frequentemente nas colônias de abelhas, apesar da falta de sinais clínicos. No presente estudo, obteve-se mais de 80% de coinfeção desses 3 agentes (DWV, BQCV, *N. ceranae*), resultado que está em conformidade com o estudo de Chen et al. (2005), no qual das 29 rainhas examinadas nos Estados Unidos e na Geórgia, 93% tiveram múltiplas infecções por mais de dois vírus.

No estudo de Matthijs et al. (2020) também é relatado que grande parte das colônias estudadas na Bélgica estão coinfecadas com três patógenos ou mais. Neste mesmo estudo foi constatado que apenas *N. ceranae* foi detectada em mais da metade das amostras, assim como o *V. destructor*. Embora este não tenha sido detectado nas amostras aqui analisadas, a reprodução desses ácaros vem aumentando nos apiários do Rio Grande do Sul devido a importação de abelhas de outras regiões, fazendo-se importante a monitorização das colmeias, uma vez que a associação desses patógenos pode levar à perda das colônias (GARCIA, 2014; SCHAFASCHEK et al., 2019). Este fato reforça a importância do estudo das infecções com múltiplos patógenos perante a saúde das abelhas (MATTHIJS et al., 2020).

Os resultados aqui apresentados comprovam a presença desses patógenos (DWV, BQCV, *N. ceranae*) na região sul do Brasil, o que está de acordo com o encontrado por Chagas et al. (2021), estudo em que das 92 colônias analisadas, 57% (53/92) estavam infectadas por *N. ceranae* e mais de 30% (30/92) por BQCV. Apesar da carência de dados frente a incidência de DWV nas *A. mellifera* do sul do Brasil, a vigilância realizada pelo LABVIR/UFPEL pode demonstrar, através do presente trabalho, a presença desse vírus na região.

4. CONCLUSÕES

Múltiplos casos de coinfeções em abelhas têm sido evidenciados em diversas regiões do mundo, sendo este um dos principais fatores do declínio populacional das mesmas. Este problema está relacionado com a perda de colônias, assim, afetando não só o ecossistema, como também a produtividade agrícola. Desse modo, é de suma importância aprofundar estudos sobre as infecções com múltiplos patógenos que afetam a saúde das abelhas. Ademais, é possível concluir que o PCR *multiplex* utilizado no trabalho, por detectar mais de um agente simultaneamente, demonstrou ser um método eficaz, rápido e econômico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARCELOS, C., COSTA, M. F., DE OLIVEIRA, M. C. P., CAÑEDO, A. D., GOLIN, R. O. Revisão bibliográfica sobre as sequências de primers para detecção de Deformed Wing Virus em abelhas da espécie *Apis mellifera* L. **V SIEPE**, Bagé, 2013. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 5, n. 2, 2013.
- CAGIRGAN, A. A., YAZICI, Z. Development of a multiplex RT-PCR assay for the routine detection of seven RNA viruses in *Apis mellifera*. **Journal of Virological Methods**, v. 281, p. 113858, 2020.
- CHAGAS, D. B., MONTEIRO, F. L., BARCELOS, L. D. S., FRÜHAUF, M. I., RIBEIRO, L. C., Lima, M. D., Hübner, S. D. O., FISCHER, G. Black queen cell virus and Nosema ceranae coinfection in Africanized honey bees from southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, p. 892-897, 2021.

- CHEN, Y., PETTIS, J. S., FELDLAUFER, M. F. Detection of multiple viruses in queens of the honey bee *Apis mellifera* L. **Journal of invertebrate pathology**, v. 90, n. 2, p. 118-121, 2005.
- DE MIRANDA, J. R.; GENERSCH, E. Deformed wing virus. **Journal of invertebrate pathology**, v. 103, p. S48-S61, 2010.
- DOUBLET, V., LABARUSSIAS, M., DE MIRANDA, J. R., MORITZ, R. F., PAXTON, R. J. Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. **Environmental microbiology**, v. 17, n. 4, p. 969-983, 2015.
- GARCIA, F. W. **Identificação de Vírus que Afetam Apis Mellifera Associados ao Ácaro Ectoparasita Varroa Destructor em Apiários do Rio Grande do Sul**. 2014. Dissertação - Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa.
- HIGES, M., et al. Nosema apis and Nosema ceranae tissue tropism in worker honey bees (*Apis mellifera*). **Veterinary pathology**, v. 57, n. 1, p. 132-138, 2020
- RICKETTS, T.H. et al. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns?. **Ecology letters**, v. 11, n. 5, p. 499-515, 2008.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. et al. Nosema ceranae in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. **Environmental microbiology**, v. 20, n. 4, p. 1302-1329, 2018.
- MATTHIJS, S. et al. Nationwide Screening for Bee Viruses and Parasites in Belgian Honey Bees. **Viruses**, v. 12, n. 8, p. 890, 2020.
- MCMENAMIN, A.J.; FLENNIKEN, M.L. Recently identified bee viruses and their impact on bee pollinators. **Current opinion in insect science**, v. 26, p. 120-129, 2018.
- Oliveira, M. C. P. V. D. **Clonagem e expressão da protease 3C do vírus defomador da asa (deformed wing virus-DWV)**. 2015. Trabalho de conclusão de curso - Faculdade de Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, 2015
- POTTS, S. G., et al. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in ecology & evolution**, v. 25, n. 6, p. 345-353, 2010
- SCHAFFASCHEK, T. P., HICKEL, E. R., DE OLIVEIRA, C. A. L., DE TOLEDO, V. D. A. A. Infestation and Reproduction of Varroa destructor Anderson and Trueman and Hygienic Behavior in Colonies of *Apis mellifera* L. (Africanized Honeybee) with Queens of Different Genetic Origins. **Sociobiology**, v. 66, n. 3, p. 448-456, 2019.
- SGUAZZA, G. H., REYNALDI, F. J., GALOSI, C. M., PECORARO, M. R. Simultaneous detection of bee viruses by multiplex PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 194, n. 1-2, p. 102-106, 2013.
- ŠIMENC, L; KNIFIC, T; TOPLAK, I. The Comparison of Honeybee Viral Loads for Six Honeybee Viruses (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, LSV3 and SBV) in Healthy and Clinically Affected Honeybees with TaqMan Quantitative Real-Time RT-PCR Assays. **Viruses**, v. 13, n. 7, p. 1340, 2021.
- TENTCHEVA, D., et al. (Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and Varroa destructor mite populations in France. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 12, p. 7185-7191, 2004.
- WEINSTEIN TEIXEIRA, E., CHEN, Y., PETTIS, J., D EVANS, J. First metagenomic analysis of microorganisms in honey bees from Brazil. **B. Indústr. Anim.**, p. 355-361, 2008.
- WOODFORD, L., et al. Quantitative and Qualitative Changes in the Deformed Wing Virus Population in Honey Bees Associated with the Introduction or Removal of Varroa destructor. **Viruses**, v. 14, n. 8, p. 1597, 2022.