

PRIMEIRA DETECÇÃO DO VÍRUS DA PARALISIA AGUDA ISRAELENSE EM *APIS MELLIFERA* DO SUL DO BRASIL

LARIANE DA SILVA BARCELOS¹; MATHEUS IURI FRÜHAUF²; NADÁLIN YAN-
DRA BOTTON³; LEONARDO CLASEN RIBEIRO⁴; AMANDA DE OLIVEIRA BAR-
BOSA⁵; GEFERSON FISCHER⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – larianebarcelos@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – matheus.ifruhauf@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – nadalinyb@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – leonardo.clasen@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – barbosa.oamanda@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – geferson.fischer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Apis mellifera* contribui diretamente na polinização de inúmeras plantas utilizadas como alimento (MALERBO-SOUZA et al., 2003; VIDAL et al., 2010), o que torna esses insetos essenciais à sobrevivência humana e animal. Além disso, representa uma importante fonte de renda, fornecendo produtos como o mel, propolis e cera, o que impacta a economia brasileira desde níveis de subsistência até larga escala (GIANNINI et al., 2015). Entretanto, desde o início do século XXI, perdas em colônias de abelhas melíferas vêm preocupando apicultores e pesquisadores (NEUMANN; CARRECK, 2010). Já descritas na América do Norte (CURRIE et al., 2010), países da África (PIRK et al., 2014), América do Sul (PIRES et al., 2016) e Europa (LAURENT et al., 2015), as mortes em massa de operárias seguem sem explicação definitiva.

A manutenção da espécie na natureza e em apiários de produção, portanto, tornou-se uma prioridade, unindo pesquisadores de todo o mundo na busca por respostas e soluções frente a esse problema (EVANS; CHEN, 2021). Dentre as causas envolvidas na perda de abelhas estão incluídas as infecções virais, como o vírus da paralisia aguda israelense (IAPV, do inglês *Israeli Acute Paralysis Virus*) (CHAGAS et al., 2019). Nesse contexto, o Laboratório de Virologia e Imunologia da Universidade Federal de Pelotas (LABVIR/UFPEL) realiza regularmente o diagnóstico de diversas enfermidades que acometem *A. mellifera*, fomentando a vigilância epidemiológica da espécie.

Relacionado ao Distúrbio do Colapso de Colônias, uma grave ocorrência que culmina no desaparecimento e/ou morte das operárias (COX-FOSTER et al., 2007), o IAPV ainda não havia sido detectado no sul do Brasil. De genoma RNA, esse vírus faz parte da família *Dicistroviridae* (ICTV, 2021) e provoca sinais clínicos ligados a paralisia de membros e asas (MAORI et al., 2007). Além disso, já foi relatado evento de *spillover* para espécies de abelhas sem ferrão (WANG et al., 2018). O presente relato tem como objetivo descrever sua detecção, o que acende um sinal de alerta para a apicultura do sul brasileiro.

2. METODOLOGIA

Foram coletadas, de forma aleatória, abelhas de colônias de *Apis mellifera*, provenientes de apiários distribuídos nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. As amostras foram mantidas refrigeradas até a chegada ao laboratório, quando foram submetidas a congelamento sob a temperatura de -80°C. Congeladas, seccionou-se o abdomen de seis abelhas adultas de cada colmeia, gerando

um *pool* a partir do qual se realizou a extração de RNA, utilizando o reagente TRIzol® (Life Technologies, Carlsbad, CA), conforme as instruções do fabricante. Após quantificação com o kit *RNA High Sensitivity Assay*, através do fluorímetro QuBit® 3.0 (Thermo Fischer Scientific, USA), as amostras foram submetidas à síntese do DNA complementar (cDNA), com o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems®), etapa necessária para posterior realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

As amostras foram, então, submetidas a Reação em Cadeia da Polimerase (GoTaq® *Colorless Master Mix*), utilizando o par de *primers* IAPV F: AGACACCA-ATCACGGACCTCAC e IAPV R: AGATTTGTCTGTCTCCCAGTGCACAT), gerando um amplicon de 475 pares de bases (HOU et al., 2014). Como controle de extração, foi utilizado o gene endógeno Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (SCHARLAKEN et al., 2008) e na PCR foram utilizados fragmentos de gBlock® (Integrated DNA Technologies) como controle positivo e água ultrapura como controle negativo. As condições do termociclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos. Ao fim dos ciclos, a extensão final foi realizada a 72°C por 7 minutos. Os resultados foram visualizados em transiluminador, após eletroforese a 120V por 40 minutos, com gel de agarose sob concentração de 1,5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na PCR uma das amostras analisadas apresentou-se positiva para o vírus da paralisia israelense (IAPV), algo inesperado, uma vez que o vírus nunca havia sido descrito em colmeias da região. A ausente ou baixa ocorrência de IAPV em colmeias de *Apis mellifera*, no entanto, pode ser em consequência de falhas no diagnóstico, uma vez que esse vírus apresenta uma alta taxa de mutação (REDDY et al., 2014), o que dificulta a eficácia de métodos diagnósticos.

A identidade do vírus detectado foi confirmada através de reação de sequenciamento (*Sanger dideoxy sequencing*) e analisada utilizando a ferramenta de alinhamento BLASTn (*Geneious by Dotmatics*). Houve maior similaridade (>99%) com a cepa BJ2 do IAPV (NCBI No: MG599488.1), semelhante aos resultados encontrados por Truong et al. (2019), em estudo realizado na Coreia do Sul. O IAPV foi descrito pela primeira vez em 2004, ocasião em que perdas severas assolaram a apicultura israelense (MAORI et al., 2007). Em pouco tempo, pesquisadores encontraram uma correlação entre a infecção pelo vírus e casos de distúrbio do colapso de colônias (CCD, do inglês *Colony Collapse Disorder*) (COX-FOSTER et al., 2007).

O CCD é caracterizado pela perda massiva e repentina de abelhas adultas, comumente deixando uma colmeia com ninho e reserva alimentar abandonados ou mantidos apenas pela rainha e poucas operárias recém emergidas dos alvéolos. Culmina na ruína da colmeia, afetando diretamente a produção apícola e/ou polinização da área (CHEJANOVSKY, 2020; HRISTOV et al., 2020). A causa, no entanto, ainda não foi elucidada. A correlação de grandes perdas apícolas com infecções virais (COX-FOSTER et al., 2007), por microsporídios (VEJSNAES et al., 2010) e uso de pesticidas (HRISTOV et al., 2020) indicam que o CCD possa ter origem multifatorial.

Dados recentes publicados pela Associação Brasileira de Estudos das Abelhas (A.B.E.L.H.A.) mostram que a produção brasileira de mel subiu 8,5% em 2019, o que, juntamente de outros dados, demonstra que a atividade apícola está em

expansão no Brasil (MALISZEWSKI, 2020). Os estados do Sul têm se mantido em destaque ao longo dos anos na produção e exportação de produtos advindos da apicultura (KLOSOWSKI et al., 2020), no entanto, produtores do sul brasileiro relataram, recentemente, a morte de milhões de abelhas (GRIGORI, 2019), afetando a cadeia produtiva local. Além dos fatores econômicos, a presença de abelhas impacta diretamente na manutenção e biodiversidade de inúmeros alimentos (VIDAL et al., 2010). Nesse contexto, ameaças à sobrevivência da espécie, assim como à produtividade e rendimento da cadeia apícola, devem ser tratadas com seriedade.

4. CONCLUSÕES

A detecção de um agente patogênico como a IAPV, sobretudo em região de forte atividade apícola, representa um alerta. Relatos na literatura indicam o possível envolvimento desse vírus em casos de morte de abelhas, o que pode contribuir na busca pelas causas de perdas recentes enfrentadas pela cadeia apícola brasileira. A busca por respostas e soluções frente a esse problema deve manter-se como uma prioridade, estimulando novos estudos aplicados às *A. Mellifera*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHAGAS, D.B.; MONTEIRO, F.L.; HÜBNER, S.D.O.; et al. Vírus que acometem *Apis mellifera* e sua ocorrência no Brasil. **Ciência Rural**, v.49, n.9, 2019.
- CHEJANOVSKY, N. Advances in Honey Bee Virus Research. **Viruses**, v.12, n.10, p.1149-1152, 2020.
- COX-FOSTER, D.L.; CONLAN, S.; HOLMES, E.C.; et al. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. **Science**, v.318, p.283–286, 2007.
- CURRIE, R.W.; PERNAL, S.F.; GUZMÁN-NOVOA, E. Honey bee colony losses in Canada. **Journal of Apicultural Research**, v.49, n.1, p.104-106, 2010.
- EVANS, J.D.; CHEN, Y. Colony collapse disorder and honey bee health. **Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner**, v.1, p.229-234, 2021.
- GIANNINI, T.C.; CORDEIRO, G.D.; FREITAS, B.M.; et al. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. **Journal of economic entomology**, v.108, n.3, p.849-857, 2015.
- GRIGORI, P. **Apicultores brasileiros encontram meio bilhão de abelhas mortas em três meses**. Agência Pública, 2019. Acessado em 05 agosto 2022. Online. Disponível em: <https://apublica.org/2019/03/apicultores-brasileiros-encontram-meio-bilhao-de-abelhas-mortas-em-tres-meses/>
- HOU, C.; RIVKIN, H.; SLABEZKI, Y.; et al. Dynamics of the presence of israeli acute paralysis virus in honey bee colonies with colony collapse disorder. **Viruses**, v.6, n.5, p.2012-2027, 2014.
- HRISTOV, P.; SHUMKOVA, R.; PALOVA, N.; et al. Factors associated with honey bee colony losses: A mini-review. **Veterinary sciences**, v.7, n.4, p.1-17, 2020.
- ICTV: **International Committee on Taxonomy of Viruses**. Atualizado em 2021. Acessado em 03 agosto 2022. Online. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/>
- KLOSOWSKI, A.L.M.; KUASOSKI, M.; BONETTI, M.B.P. Apicultura brasileira: inovação e propriedade industrial. **Revista de política agrícola**, v.29, n.1, p.41-58, 2020.
- LAURENT, M.; HENDRIKX, P.; RIBIERE-CHABERT, M.; et al. A pan-European epidemiological study on honeybee colony losses 2012–2014. **EPILOBEE Report**, v.1, 2015.

- MALERBO-SOUZA, D.T.; NOGUEIRA-COUTO, R.H.; COUTO, L.A.; et al. Atrativo para as abelhas *Apis mellifera* e polinização em café (*Coffea arabica* L.). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.272-278, 2003.
- MALISZEWSKI, E. Produção de mel no Brasil cresceu 8,5% em 2019. **A.B.E.L.H.A. Associação Brasileira de Estudos das Abelhas**. 2020. Acessado em 05 agosto 2022. Online. Disponível em: <https://abelha.org.br/producao-de-mel-no-brasil-cresceu-85-em-2019/>
- MAORI, E.; LAVI, S.; MOZES-KOCH, R.; et al. Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra-and inter-species recombination. **Journal of General Virology**, v.88, n.12, p.3428-3438, 2007.
- NEUMANN, P.; CARRECK, N.L. Honey bee colony losses. **Journal of Apicultural Research**, v.49, p.1–6, 2010.
- PIRES, C.S.S.; DE MELLO PEREIRA, F.; DO RÊGO LOPES, M.T.; et al. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, n.5, p.422–442, 2016.
- PIRK, C.W.; HUMAN, H.; CREWE, R.M.; et al. A survey of managed honey bee colony losses in the Republic of South Africa–2009 to 2011. **Journal of Apicultural Research**, v.53, n.1, p.35-42, 2014.
- REDDY, K.E.; NOH, J.H.; KIM, Y-H.; et al. Analysis of the nonstructural and structural polyprotein regions, and complete genome sequences of Israel acute paralysis viruses identified from honeybees (*Apis mellifera*) in Korea. **Virology**, v.444, n.1-2, p.211–217, 2013.
- SCHARLAKEN, B.; DE GRAAF, D.C.; GOOSSENS, K.; et al. Reference gene selection for insect expression studies using quantitative real-time PCR: The head of the honeybee, *Apis mellifera*, after a bacterial challenge. **Journal of insect Science**, v.8, n.1, p.1-10, 2008.
- TRUONG, A-T.; KIM, B.; KIM, s.; et al. Rapid detection of Israeli acute paralysis virus using multi-point ultra-rapid real-time PCR (URqPCR). **Journal of Apicultural Research**, v.58, n.5, p.746–753, 2019.
- VEJSNAES, F.; NIELSEN, S.L.; KRYGER, P. Factors involved in the recent increase in colony losses in Denmark. **Journal of Apicultural Research**, v.49, n.1, p.109-110, 2010.
- VIDAL, M.D.G.; JONG, D.D.; WIEN, H.C.; et al. Pollination and fruit set in pumpkin (*Cucurbita pepo*) by honey bees. **Brazilian Journal of Botany**, v.33, p.106-113, 2010.
- WANG, H.; MEEUS, I.; PIOT, N.; et al. Systemic Israeli acute paralysis virus (IAPV) infection in bumblebees (*Bombus terrestris*) through feeding and injection. **Journal of invertebrate pathology**, n.151, p.158-164, 2018.