

## Streszczenie

Pszczoły miodne jako organizmy eusocjalne żyją w rodzinach, które stanowią dogodne środowisko do rozprzestrzeniania się wielu patogenów, w tym entomopatogennych wirusów. Dotychczas u pszczół wykryto ponad siedemdziesiąt gatunków wirusów, wśród których największym zagrożeniem są wirusy: zdeformowanych skrzydeł (DWV), ostrego paraliżu pszczół (ABPV), chronicznego paraliżu pszczół (CBPV), choroby woreczkowej czerwii (SBV), choroby czarnych mateczników (BQCV), a także izraelski wirus ostrego paraliżu pszczół (IAPV). Szczególną rolę w szerzeniu się infekcji wirusowych w rodzinie pszczelej odgrywają matki pszczele ze względu na możliwość transowarialnego przenoszenia zakażeń na kolejne pokolenia owadów. Infekcje wirusowe u pszczół mają na ogół przebieg bezobjawowy, dlatego ich rozpoznanie możliwe jest jedynie przy wykorzystaniu czułych i specyficznych metod diagnostycznych.

Celem pracy było opracowanie i walidacja testów multiplex RT-PCR (mRT-PCR) zawierających kontrolę wewnętrzną amplifikacji (IAC) do wykrywania: CBPV, dicistrowirusów (ABPV, IAPV, BQCV) i iflawirusów (DWV, SBV) pszczół oraz ocena występowania zakażeń wirusowych w populacji matek pszczelich pochodzących z polskich pasiek produkcyjnych przy użyciu opracowanych testów molekularnych. Ponadto podjęto próbę oceny wpływu wybranych czynników abiotycznych, do których należą wiek matek pszczelich, liczebność pasiek i ich geograficzne rozmieszczenie, a także czynników biotycznych, jak obecność roztocza *V. destructor* i mikrosporydiów *Nosema* spp. w rodzinie pszczelej na występowanie zakażeń wirusowych u matek.

Do opracowania i walidacji testów Ifla-CBPV i Dicistro mRT-PCR wykorzystano homogenaty pszczół zarówno zdrowych jak i zakażonych wirusami, wirusowe RNA oraz DNA chorobotwórczych dla pszczół bakterii z rodzaju: *Paenibacillus*, *Melissococcus*, *Enterococcus* i *Pseudomonas*. Badania epidemiologiczne przeprowadzono na 239 martwych matkach pszczelich pobranych w latach 2017-2022 w 136 pasiekach produkcyjnych zlokalizowanych na terenie całej Polski, w których obserwowano zwiększoną śmiertelność pszczół, trudności z przyjmowaniem przez rodziny pszczele nowych matek lub ich słabe czerwienie.

Na podstawie sekwencji nukleotydowych konserwatywnych fragmentów genomu krajowych i zagranicznych szczepów dicistro- i iflawirusów pszczół oraz CBPV przeprowadzono modyfikację istniejących par starterów, które następnie zastosowano w testach mRT-PCR. Wirusowe RNA izolowano z tkanek pszczół zestawem Total RNA Mini (A&A Biotechnology,

Polska), który umożliwił pozyskanie materiału genetycznego wirusów o wysokiej jakości i koncentracji. Przeprowadzono optymalizację składu mieszanin i profili temperaturowo-czasowych testów Ifla-CBPV i Dicistro mRT-PCR. Ważnym elementem pracy było zaprojektowanie kontroli IAC umożliwiającej monitorowanie prawidłowego przebiegu analiz molekularnych. Częstość występowania zakażeń wirusowych w badanej populacji matek pszczelich oszacowano metodą Cloppera-Pearsona, natomiast do oceny wpływu wybranych czynników biotycznych i abiotycznych na występowanie infekcji wirusowych u matek zastosowano wielowymiarową technikę eksploracyjną typu correspondence analysis.

Opracowane testy Ifla-CBPV i Dicistro mRT-PCR charakteryzują się 100% czułością i specyficzością diagnostyczną, a także powtarzalnością i odtwarzalnością z limitem detekcji równym 10 PCRU (DWV i SBV) oraz 1 PCRU/próbkę pszczół w przypadku wykrywania CBPV, ABPV, IAPV i BQCV. Na etapie przedwalidacyjnym wykazano odporność testów na czynniki mogące zakłócać przebieg analiz molekularnych. Walidacja potwierdziła przydatność opracowanych testów Ifla-CBPV i Dicistro mRT-PCR do rozpoznawania infekcji powodowanych przez dicistrowirusy, iflawirusy i CBPV u pszczół.

W badanej populacji matek pszczelich najczęściej obserwowano zakażenia powodowane przez DWV (89,9%; CI95%: 85,4-93,5). Infekcje ABPV i BQCV zidentyfikowano odpowiednio u 55,2% (CI95%: 48,7-61,6) i 49,4% (CI95%: 42,9-55,9) owadów, natomiast SBV i CBPV u 28,5% (CI95%: 22,8-34,6) oraz 15,1% (CI95%: 10,8-20,2) badanych matek. Obecność IAPV odnotowano jedynie u 1,3% (CI95%: 0,3-3,6) królowych. Po raz pierwszy w Polsce zdiagnozowano u matek pszczelich DWV, CBPV i IAPV. Monoinfekcje występowały u 13,8% (CI95%: 9,7-18,8) królowych, natomiast infekcje mieszane obserwowano u 84,1% (CI95%: 78,8-88,5) owadów i były one głównie powodowane przez DWV i ABPV. Ponadto zidentyfikowano koinfekcje wirusami należącymi do 6 różnych gatunków. Prewalencja DWV u badanych matek wynosiła od 84,8% (CI95%: 71,1-93,7) w południowo-zachodniej części Polski do 95,8% (CI95%: 78,9-99,9) w regionie mazowieckim. Z kolei matki zakażone ABPV stanowiły 34,8% (CI95%: 21,4-50,2) badanych osobników w regionie południowo-zachodnim i 73,5% (CI95%: 55,6-87,1) w regionie północnym. W przeciwieństwie do ABPV, BQCV występował u 29,4% matek (CI95%: 15,1-47,5) z regionu północnego, podczas gdy w regionie południowo-zachodnim odsetek zakażonych królowych sięgał 60,9% (CI95%: 45,4-74,9). W poszczególnych regionach Polski prewalencja zakażeń SBV u matek wynosiła od 8,3% (CI95%: 1,0-27,0) dla regionu mazowieckiego do 44,1% (CI95%: 27,2-62,1) w regionie

północnym. Najwięcej infekcji CBPV wykryto w regionie południowo-zachodnim (34,8%; CI95%: 21,4-50,2). Jedynie pojedyncze osobniki z regionu wschodniego, południowego oraz mazowieckiego były zakażone IAPV.

Zakażenia powodowane przez dicistrowirusy, SBV i CBPV są powiązane z wiekiem matek pszczelich oraz regionem stacjonowania rodzin, z których pochodziły badane osobniki. Powyższych zależności nie stwierdzono w przypadku infekcji DWV, które ponadto nie były związane z obecnością innych zakażeń wirusowych u matek. Wielkość populacji pszczół utrzymywanej w poszczególnych regionach kraju nie miała wpływu na występowanie dicistrowirusów, iflawirusów i CBPV u badanych matek. Nie obserwowano związku pomiędzy obecnością mikrosporydiów z rodzaju *Nosema* i roztocza *V. destructor* w rodzinach pszczelich, a występowaniem infekcji wirusowych u matek, niezależnie od ich wieku. Stwierdzono jedynie współzależność między obecnością SBV i CBPV oraz brakiem zakażeń DWV i ABPV u matek z rodzin wolnych od *V. destructor*. Natomiast w rodzinach, w których robotnice nie były zainfekowane *Nosema* spp., u matek rzadziej wykrywano zakażenia BQCV.

Opracowane testy Ifla-CBPV oraz Dicistro mRT-PCR, zawierające IAC, umożliwiają jednoczesne wykrywanie zakażeń powodowanych przez wirusy pszczół należące do różnych rodzin taksonomicznych. Infekcje wywoływane przez ifla- i dicistrowirusy pszczół występują powszechnie u matek pszczelich w krajowych pasiekach produkcyjnych. Czynnikiem, który ma wpływ na występowanie zakażeń wirusowych u matek pszczelich jest zarówno ich wiek, jak i geograficzna lokalizacja pasiek. Wdrożenie opracowanych testów molekularnych do rutynowej diagnostyki laboratoryjnej umożliwi pszczelarzom podjęcie odpowiednich działań profilaktycznych ograniczających rozprzestrzenianie się infekcji wirusowych w rodzinach pszczoły miodnej.

## Summary

Honeybees are eusocial organisms living in colonies which constitute a favorable environment for spreading of different pathogens including entomopathogenic viruses. Hitherto, over seventy virus species have been detected in bees, among them deformed wing virus (DWV), sacbrood virus (SBV), acute bee paralysis virus (ABPV), Israeli acute paralysis virus (IAPV), black queen cell virus (BQCV) as well as chronic bee paralysis virus (CBPV) are the biggest threats to the bee health. The honeybee queen plays an important role in the spread of viral infections within the colony due to her ability to transovarial virus transmission to the next generations of insects. Viral infections in honeybees have mainly an asymptomatic course, therefore their detection is only possible by the use of sensitive and specific diagnostic methods.

The aim of this study was a development and a validation of the multiplex RT-PCR (mRT-PCR) assays containing an internal amplification control (IAC) for the detection of CBPV, dicistroviruses (ABPV, IAPV, BQCV) and iflaviruses (DWV, SBV) of bees. Another purpose of this research was a detection and an assessment of the prevalence of viral infections in honeybee queens using developed molecular methods. An attempt was also undertaken to assess an impact of the selected abiotic factors such as a queen's age, a number of existing apiaries in Poland and their geographical location, as well as a presence of *Varroa destructor* (*V. destructor*) and *Nosema* spp. in the bee colony (the biotic factors) on the occurrence of viral infections in queens.

The bee homogenates prepared from healthy and virus-positive insects, viral RNA as well as DNA of pathogenic for bees bacteria from *Paenibacillus*, *Melissococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* genus were used for the development and the validation of the Ifla-CBPV and Dicistro mRT-PCR assays. In addition, 239 samples of dead honeybee queens collected between 2017 and 2022 from 136 production apiaries from Poland were used in the epidemiological studies. These apiaries were characterized by an increased bee mortality, difficulties in the replacement of the queen bees in the colony or impaired egg laying.

During the development of the virus specific mRT-PCR assays, the nucleotide sequences of previously designed primer sets within the conserved regions of the virus

genomes were modified using sequences of Polish and foreign CBPV, bee dicistro- and iflaviruses strains. A viral RNA was isolated from bee tissues employing a Total RNA Mini kit (A&A Biotechnology, Poland) which allowed to obtain nucleic acids of a high yield and quality. Furthermore, the optimization of a composition of the PCR mixtures and temperature-time profiles of the Ifla-CBPV and Dicistro mRT-PCR assays were performed. An important part of this work was a design of the IAC to monitor the correct performance of molecular analyses. The prevalence of the viral infections in the studied population of honeybee queens was estimated using a Clopper-Pearson method. Likewise, a multivariate exploratory technique of the correspondence analysis-type was used to assess the influence of selected biotic and abiotic factors on the occurrence of viral infections in the bee queens.

The developed Ifla-CBPV and Dicistro mRT-PCR assays containing IAC possess 100% diagnostic sensitivity, specificity as well as repeatability and reproducibility with the limit of detection equal to 10 PCRU/bee sample for DWV and SBV, while in the case of CBPV, ABPV, IAPV and BQCV it was 1 PCRU. In addition, at the pre-validation stage, both tests proved resistance to different factors which could hinder molecular analyses. The validation of the Ifla-CBPV and Dicistro mRT-PCRs confirmed their usefulness for a detection of honeybee infections caused by CBPV, bee dicistro- and iflaviruses.

Honeybee queens collected from the domestic commercial apiaries were mainly infected by DWV (89.9%; CI95%: 85.4-93.5). ABPV and BQCV infections were identified in 55.2% (CI95%: 48.7-61.6) and 49.4% (CI95%: 42.9-55.9) of tested insects, respectively. SBV and CBPV were found in 28.5% (CI95%: 22.8-34.6) and 15.1% (CI95%: 10.8-20.2) of the queens. The presence of IAPV was solely detected in 1.3% (CI95%: 0.3-3.6) of animals. For the first time in Poland, DWV, CBPV and IAPV were detected in the honeybee queens. Monoinfections were found in 13.8% (CI95%: 9.7-18.8) of the queen samples, while in 84.1% (CI95%: 78.8-88.5) of bees mixed infections, mainly caused by DWV and ABPV, were recognised. In addition, co-infections caused by viruses belonging to 6 different virus species were also identified. In the analyzed bee population, DWV prevalence ranged from 84.8% (CI95%: 71.1-93.7) in the southwestern part of Poland to 95.8% (CI95%: 78.9-99.9) in the Mazovia region. On the other hand, the ABPV-infected queens accounted for 34.8% (CI95%: 21.4-50.2) of the tested individuals in the southwestern region and for 73.5% (CI95%:

55.6-87.1) in the northern Poland. In contrary to ABPV, BQCV infections were observed in 29.4% (CI95%: 15.1-47.5) queens from the northern region, while in the southwestern part of the country the percentage of infected queens reached 60.9% (CI95%: 45.4-74.9). The frequency of SBV occurrence in bees in individual Polish regions ranged from 8.3% (CI95%: 1.0-27.0) for Mazovia to 44.1% (CI95%: 27.2-62.1) in the northern region. Of note is that, CBPV prevalence was the highest in the southwestern part of the country (34.8%; CI95%: 21.4-50.2). Only single insects from the eastern, southern and Mazovia regions were infected with IAPV.

The presence of the bee dicistroviruses, SBV and CBPV in queens is related to their age and geographical location of apiaries from which they originated. These relationships were not observed for DWV infections, which were also not associated with the occurrence of other virus species in queens. The number of hives present in each region of the country had no influence on prevalence of infections in queens caused by dicistroviruses, iflaviruses and CBPV. Likewise, there was no relationship observed between the presence of *V. destructor* mite and microsporidian parasites from *Nosema* genus in bee colonies and virus occurrence in queens regardless of their age. The relationship was only found between the presence of SBV and CBPV and the absence of DWV and ABPV infections in queens originated from colonies free from *V. destructor*. Similar relationship was also observed between the absence of BQCV in queens originated from *Nosema* - free colonies.

The developed Ifla-CBPV and Dicistro mRT-PCR assays containing IAC allowed for simultaneous detection of infections caused by bee viruses belonging to different virus families. Ifla- and dicistroviruses of bees occur commonly in the honeybee queens in Polish production apiaries. Their presence is related to the age of the insects and the geographic location of apiaries. The implementation of molecular methods into a routine diagnostics of bee viral diseases will allow beekeepers to introduce appropriate prophylactic measures to limit the spread of viral infections in colonies of honeybees.