

Verifica dell'efficacia di Api Herb® e Vita feed Gold® nel contenimento dell'infezione da *Nosema ceranae*

A. Giacomelli¹, C. Ferrari², M. Milito¹, G. Maisano¹, A. Ermenegildi¹, C. Muscolini¹, E. Aquilini¹, A. Comini¹, V. Spallucci¹, G. Braion¹, F. Corrias¹, G. Ragona¹, F. Taccori¹, I. Tellini¹, M. Pietropaoli¹, F. Scholl¹, P. Scaramozzino¹, G. Formato¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

²Azienda USL RM/G

RIASSUNTO

Nosema ceranae è un fungo unicellulare (microsporidio) che è stato chiamato in causa per spiegare fenomeni di spopolamento degli alveari. Questa malattia, è per molti aspetti ancora poco conosciuta e, soprattutto, non sono noti protocolli terapeutici per contrastarla.

Api Herb® e Vita Feed Gold® sono prodotti naturali in vendita in Italia per la prevenzione ed il controllo della noseemiasi. Nel presente lavoro riportiamo i risultati della efficacia dei 2 suddetti prodotti nel contenere l'infezione di *Nosema ceranae*. Sia Api Herb che Vita Feed Gold hanno manifestato capacità di contenimento dell'infezione.

INTRODUZIONE

La noseemiasi è una patologia delle api adulte dovuta a funghi unicellulari (microsporidi). Da recenti studi è stato visto che tali microrganismi sono frequentemente rinvenibili all'interno degli alveari, soprattutto in determinati periodi dell'anno (inverno e primavera).

Due sono le specie di *Nosema* che interessano l'ape mellifera: *Nosema apis* (*N. apis*) e *Nosema ceranae* (*N. ceranae*). Mentre il primo è stato descritto per la prima volta nel 1909 su *Apis mellifera*, il secondo è stato isolato per la prima volta in Asia nel 1996 dall'ape cerana e nel 2006 è stato riscontrato anche sulla nostra *Apis mellifera*.

In generale, la noseemiasi comporta una riduzione della produzione di miele, una riduzione della longevità delle api adulte, un minor rientro delle bottinatrici negli alveari ed un rallentamento dello sviluppo primaverile delle famiglie.

Il nosema replica a carico della mucosa intestinale delle api, distruggendone la integrità ed alterandone la funzionalità.

Si propaga da ape ad ape mediante le spore, che vengono appunto eliminate attraverso le feci.

L'infezione delle api sane avviene per contatto diretto con le spore eliminate dalle api malate, oppure attraverso l'alimentazione con nettare, polline o miele contaminati.

Mentre il *N. apis* è responsabile di una forma diarroica e quindi è facile sospettare tale affezione in caso di imbrattamento del predellino o dei favi del nido con le feci, il *N. ceranae* è invece un patogeno caratterizzato dal possedere un lungo tempo di latenza ed assenza di sintomatologia specifica, sebbene sia stato chiamato in causa per spiegare casi di spopolamento degli alveari.

Sembrerebbe infatti che, quando si riesce a rilevare dal punto di vista clinico lo spopolamento, la famiglia sia destinata a morire, perché la maggior parte delle bottinatrici è scomparsa e la popolazione delle api nascenti non è più in grado di compensare la perdita delle api adulte.

La diagnosi di noseemiasi viene realizzata mediante esame al microscopio ottico delle feci di api. In un'ape fortemente infetta si possono trovare da 30 a 50 milioni di spore di *Nosema*. Un metodo diagnostico alternativo prevede il ricorso alla PCR, tecnica che è comunque indispensabile per la conferma di specie (e capire quindi se ci troviamo di fronte ad un caso di *N. apis* o di *N. ceranae*).

Gli apicoltori che sospettano tale malattia nei loro alveari possono inviare un campione di alcune decine¹ di api bottinatrici agli Istituti Zooprofilattici perché venga effettuata la ricerca di *Nosema*. A tal proposito, si ricorda che la nosemiosi è a tutt'oggi malattia inserita nell'elenco delle malattie denunciabili e quindi, in caso di positività, andranno comunque sempre avvisati i Servizi Veterinari ASL nel cui territorio ricadono gli apiari infetti.

Per contrastare questa malattia, che purtroppo sembra molto diffusa sul territorio nazionale, è necessario ricercare nuove strategie di lotta rispetto quelle “tradizionali”, dal momento che la fumagillina, antibiotico prodotto dalla fermentazione dell'*Aspergillus fumigatus*, non può essere più utilizzato in Europa².

Partendo da questi presupposti, lo studio che viene qui presentato ha voluto verificare l'efficacia nel controllo dell'infezione in colonie colpite da *N. ceranae* di due prodotti naturali a basso impatto ambientale presenti in commercio in Italia: Api Herb® e Vita Feed Gold®.

MATERIALI E METODI

Api Herb® (figura 1) è un mangime complementare per api commercializzato dalla Ditta Chemicals Laif, a base di essenze vegetali essiccate e vitamine. Si presenta in bustine monodose contenenti 40gr di estratto secco da somministrare alle api previa sospensione in 500 ml di sciroppo zuccherino.

Figura 1 – Bustine di Api Herb®



Vita Feed Gold® (figura 2) è un integratore alimentare biostimolante per api prodotto dalla Ditta Vita Europe, a base di estratti di *Beta vulgaris* varietà *altissima*. Si presenta commercializzato in flaconi da 250 ml e 1000 ml, da diluire in sciroppo zuccherino prima della somministrazione alle api.

Figura 2 - Flacone di Vita Feed Gold®



¹ Almeno 30 api bottinatrici. Queste possono essere catturate facilmente al loro rientro in alveare, dopo aver chiuso la porticina d'entrata dell'arnia.

² Negli USA, ove tale antibiotico è autorizzato, sono piuttosto frequenti le segnalazioni di fenomeni di resistenza del *Nosema spp.* alla fumagillina.

La prova di campo realizzata per verificare l'efficacia dei suddetti trattamenti è stata effettuata su un apiario ubicato nella provincia di Roma costituito da 20 alveari colpiti da *Nosema ceranae*.

Le 20 famiglie sono state divise in tre gruppi omogenei per forza e livello di infezione da *N. ceranae*, così suddivisi:

- Gruppo 1, costituito da 5 famiglie, sottoposte a trattamento con Api Herb®;
- Gruppo 2, costituito da 5 famiglie, sottoposte a trattamento con Vita Feed Gold®;
- Gruppo 3, costituito da 10 famiglie, non sottoposte ad alcun trattamento.

I trattamenti sono stati realizzati come da indicazioni riportate in etichetta.

Api Herb® è stato diluito (figura 3) sospendendo 40g di prodotto (tutto il contenuto della singola busta monodose), in 500ml di sciroppo zuccherino al 50%. Sono stati gocciolati 50 ml della soluzione così ottenuta sia sulle api che sugli spazi interfavo (figura 4 e figura 5).

Figura 3 – Diluizione di Api Herb® con sciroppo zuccherino, prima della somministrazione



Figura 4 - 5 – Somministrazione di Api Herb® all'interno degli alveari



Vita Feed Gold® è stato diluito (figura 6) nella misura di 100 ml di prodotto in 900 ml di sciroppo zuccherino al 50% (soluzione al 10%), sono stati somministrati 100 ml di soluzione per ogni famiglia, gocciolando lo sciroppo medicato direttamente dentro le arnie (figura 7 e figura 8).

Figura 6 –Vita Feed Gold® diluito con sciroppo zuccherino,
prima della somministrazione



Figura 7 e Figura 8 – Somministrazione di Vita Feed Gold® all'interno degli alveari



La somministrazione dei prodotti è avvenuta nel periodo dal 7 agosto al 10 settembre 2009, per un totale di sei settimane di trattamento. Si è deciso, infatti, di trattare 3 settimane in più rispetto quelle consigliate in etichetta per entrambi i prodotti, al fine di verificare se un eventuale prolungamento della somministrazione fosse eventualmente in grado di ottenere una scomparsa del patogeno negli alveari infetti.

Prima, durante e dopo i trattamenti è stato effettuato il prelievo di almeno 30 api bottinatrici per ciascun alveare (figura 9), al fine di valutare il livello d'infezione (calcolato in n° di spore per ape) di *N. ceranae* nelle colonie. Le api prelevate dall'entrata degli alveari sono state immerse in buste presto-chiuse sterili che, dopo essere state opportunamente etichettate, sono state poste in congelatore fino alla realizzazione delle analisi di laboratorio.

Figura 9 – Campionamento delle api bottinatrici per le analisi di laboratorio



La conta delle spore è stata realizzata secondo la metodica OIE (osservazione al microscopio ottico del contenuto intestinale utilizzando camera di Bürker).

Attraverso la *polymerase chain reaction* (PCR) è stata confermata la presenza di *Nosema spp.* e mediante la tecnica RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) è stato possibile discriminare tra *N. ceranae* e *N. apis*.

In tabella 1 sono riassunti i gruppi di trattamento ed i dosaggi di prodotto somministrati.

Tabella 1 – Gruppi di trattamento, dosi e frequenze di somministrazioni effettuate

Gruppi sperimentali	Numero arnie	Trattamento	Dosaggio per alveare	Frequenza di trattamento
Gruppo 1	5	Api Herb®	50ml	1 volta a settimana per 6 settimane
Gruppo 2	5	Vita Feed Gold®	100ml	ogni 3 giorni per 6 settimane
Gruppo 3 (controllo)	10	Nessuno (solo sciroppo zuccherino)	100 ml	1 volta a settimana

ANALISI STATISTICA

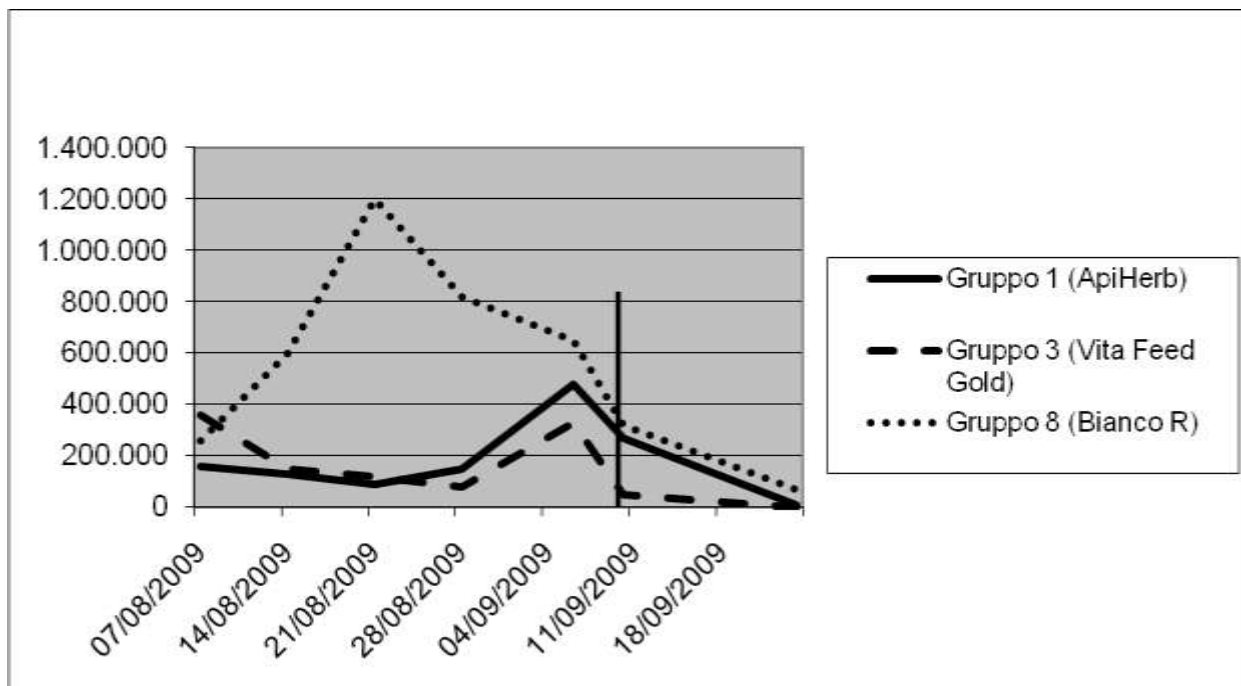
I confronti tra i gruppi di trattamenti sono stati effettuati tramite l'utilizzo della statistica non parametrica di Kruskal-Wallis. Per approfondire l'individuazione delle differenze il gruppo di controllo è stato confrontato con il gruppo di famiglie sottoposte a trattamento con Api Herb® e con quello composto da famiglie sottoposte a trattamento con Vita Feed Gold® attraverso il test di Mann-Whitney per due campioni indipendenti. Il livello di significatività è stato posto pari 0,05.

L'analisi statistica è stata effettuata con le procedure del software STATA/SE 9.0.

RISULTATI E CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti (grafico 1), entrambi i prodotti Api Herb® e Vita feed Gold® sono risultati efficaci nel controllo dell'infezione da *Nosema ceranae*.

Grafico 1 - Risultati dei livello di infezione da *Nosema ceranae* riscontrate nei diversi gruppi, durante le sei settimane di trattamento



Il test di Mann-Whitney effettuato rispetto al gruppo di controllo ha presentato un p-value pari 0,041 per entrambi i trattamenti, confermando una efficacia nel controllo dell'infezione per le famiglie trattate.

Il grafico 1 descrive l'andamento dell'infezione da *Nosema ceranae* nei tre gruppi di trattamento e da tale grafico può essere dedotta l'efficacia dei trattamenti con ApiHerb® (gruppo 1) e Vita Feed Gold® (gruppo 3) rispetto alle famiglie del gruppo di controllo. L'apparente maggiore efficacia dalla terza settimana in poi di Vita Feed Gold® non è supportata dall'analisi statistica. Un numero maggiore di alveari testati potrebbe consentire di confermare questa ipotesi.

Dopo le 6 settimane di trattamento l'infezione fungina ha iniziato ad autolimitarsi, sebbene non sia stato possibile raggiungere l'azzeramento della presenza delle spore durante le 6 settimane di trattamento. La scomparsa delle spore è invece intervenuta in tutti e 3 i gruppi a fine settembre, fenomeno che ha confermato il carattere stagionale di questa patologia.

Dai dati ottenuti in seguito alle prove di campo è risultato evidente come l'infezione da *Nosema ceranae* subisca oscillazioni profonde nel tempo fino a scomparire in alcuni momenti dell'anno.

Entrambi i prodotti testati Api Herb® e Vita Feed Gold® hanno dimostrato la capacità di contenere efficacemente i livelli di infezione da *Nosema ceranae*.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia per la collaborazione l'Azienda Apistica "L'Ape Operaia" di Alivernini Barbara e Francesco Capitani. Si ringraziano i tecnici apistici Aldo Frasca e Damiano Angeletti. Si ringrazia, da ultimo, Lisa Creato per la disponibilità prestata nella realizzazione delle prove di campo.

BIBLIOGRAFIA - Bessi E, Nanetti A., 2005 - Evaluation of three different strategies to nosema control (poster). Abstracts 39th Apimondia International Apicultural Congress, 21-26 August 2005, Dublin, Ireland 2005. Costa C.- La noseiasi (2008) Corso di formazione apistica "Vecchie e nuove conoscenze sulle malattie delle api", IZS Abruzzo e Molise, Teramo 16-19 settembre 2008, pag. 16-19. Fries R. Martín, A. Meana, P. García-Palencia and M. Higes, (2006) Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees, *Journal of Apicultural Research*. 45, pp. 230-233. Furgala B. & M. A. Sugden, (1985) Residual activity of bicyclohexylammonium fumagillin in sucrose syrup and high fructose corn syrup stored at two temperatures. *American Bee Journal* 125(1): 47-48. Higes M. et al. (2007).

Experimental infection of Apis mellifera honeybees with Nosema ceranae (Microsporidia) Journal of Invertebrate Pathology: 94:211–217. **Higes M.**, Martín-Hernández R., Garrido-Bailón E., González-Porto A. V., García-Palencia P., Meana A., Del Nozal M. J., Mayo R. and Bernal J. L. (2009). *Honeybee colony collapse due to Nosema ceranae in professional apiaries*. Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd, Environmental Microbiology Reports: 1-4. **Sommerville D.**, Hornitzky M., (2007). *Nosema disease* NSW DPI Primefact 699. **Lodesani M.**, Maistrello L., Costa C., Leonardi F., Marani G. (2008) – *Efficacy of thymol and resveratrol on the development of Nosema ceranae in honeybees in laboratory conditions*. Proceedings of EurBee3. The 3rd European Congerence of Apidology, Queen's University Belfast, Northern Ireland, 8th-11th September 2008, p.65. **Maistrello L.**, Lodesani M., Costa C., Leonardi F., Marani G., Caldon M., Mutinelli F., Granato A. (2008) - *Screening of natural compounds for the control of nosema disease in honeybees (Apis mellifera)*. *Apidologie* 39: 436-445. **Klee J.**, Besana A., Genersch E., Gisder S., Nanetti A., Tam D.Q., Chinh T.X., Puerta F., Kryger P., Message D., Hatjina F., Korpela S., Fries I., Paxton R. (2007): *Widespread dispersal of the microsporidium Nosema ceranae, an emergent pathogen of the western honey bee, Apis mellifera*. Journal of Invertebrate Pathology **96**, 1-10. **Higes M.**, Martín-Hernández R., Meana A. (2006): *Nosema ceranae, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe*. Journal of Invertebrate Pathology **92**, 81-83.