

# Risultati del primo anno di attività del progetto APENET-Toscana

Giovanni Formato\*, Claudio Spano, Franco Corrias, Giuseppe Ragona, Antonella Cersini, Giusy Cardeti, Flavia Taccori, Irene Tellini, Aldo dal Prà, Andrea Lombardi, Alice Piazza, Giusy Brocherel, Marcella Milito, Alessandra Giacomelli, Arianna Ermenegildi, Valeria Antognetti, Marco Pietropaoli, Marina Cittadini, Ugo Marchesi, Martina Fortini, Giovanni Ragionieri, Mila Nocentini, Francesco Scholl, Giovanni Brajon

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana*

*\*Corresponding author: giovanni.formato@izslt.it*

## Introduzione

La Regione Toscana, attraverso il Dipartimento dello Sviluppo Economico ha promosso nel 2009, in seguito a numerose riunioni preliminari, un progetto biennale di monitoraggio regionale dello stato di salute delle api. Tale progetto, chiamato “APENET-Toscana”, è coordinato dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana (IZSLT) ed è realizzato in collaborazione con l'Amministrazione Provinciale di Siena e con le associazioni degli apicoltori: ARPAT (Associazione Regionale Produttori Apistici Toscani), AAPT (Associazione Apicoltori Province Toscane), Toscana Miele-APA (Associazione Produttori Apistica).

Obiettivo del progetto APENET-Toscana è quello di monitorare lo stato sanitario delle api in Toscana contribuendo, al tempo stesso, ad integrare i dati del Progetto nazionale APENET<sup>1</sup>. L'inserimento di moduli aggiuntivi toscani nel sistema nazionale ha avuto fin da subito l'obiettivo di integrare le competenze del settore produttivo con quello ambientale e sanitario.

Nel presente lavoro sono riportati i risultati del progetto relativi al primo anno di attività, da giugno 2009 a maggio 2010.

## Materiali e metodi

Nel primo anno sono state coinvolte nel monitoraggio le province di Firenze, Arezzo e Siena (Fig. 1). In queste sono stati individuati specifici “moduli”, ciascuno costituito da 5 apiari da 10 alveari per un totale di 50 alveari a modulo. All'interno di ogni modulo, è stato inoltre scelto un apiario all'interno di un'area naturale protetta.

L'avvio del monitoraggio è stato preceduto da appositi incontri con i Servizi Veterinari delle tre province coinvolte.

Il monitoraggio ha previsto la realizzazione di visite negli apiari in 4 diversi momenti dell'anno: inizio estate 2009, fine estate 2009, autunno 2009, primavera 2010.

Complessivamente, sono stati effettuati 56 sopralluoghi da tecnici appositamente addestrati per rilevare: caratteristiche geografico-ambientali, capacità gestionali degli apicoltori, forza degli alveari, eventuali comportamenti anomali delle api, fenomeni di mortalità o spopolamenti degli alveari.

Infine, sono stati prelevati campioni di api adulte, cera e polline per i seguenti accertamenti di laboratorio:

<sup>1</sup> Il progetto nazionale APENET è finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, che ne ha affidato il coordinamento al Centro di Referenza Nazionale per l'apicoltura (IZS delle Venezie). Tale progetto si pone anche l'obiettivo di integrare i risultati ottenuti dalle altre iniziative di monitoraggio a carattere regionale o locale (come, ad esempio, il progetto APENET-Toscana).

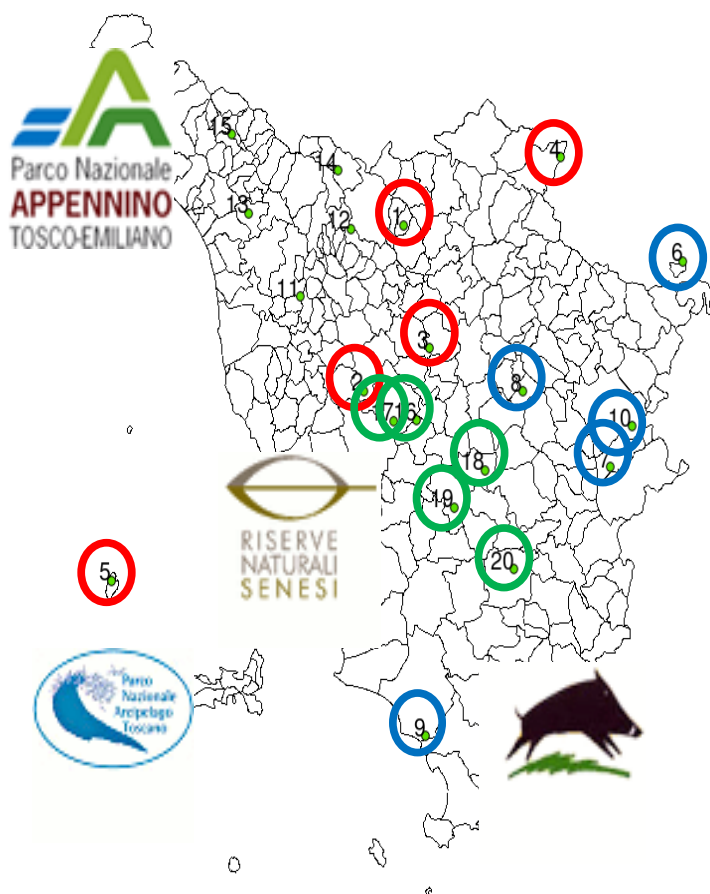


Figura 1 - Distribuzione degli apiari afferenti ai tre moduli toscani coinvolti nel primo anno di attività.

- N. 123 analisi chimiche per ricerca di neonicotinoidi, pesticidi organoclorurati e organofosforati da cera mediante gas cromatografia;
- N. 493 analisi al microscopio ottico per diagnosi di *Nosema* spp.;
- N. 154 analisi mediante *Polymerase Chain Reaction* (PCR) per diagnosi di nosemiasi dalle api adulte;
- N. 118 analisi mediante *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) per differenziare *Nosema ceranae* (*N. ceranae*) da *Nosema apis* (*N. apis*);
- N. 53 analisi delle proteine da polline mediante tecnica volumetrica Kjeldahl;
- N. 53 esami palinologici da polline mediante osservazione delle spore al microscopio ottico;
- N. 848 analisi mediante *Polymerase Chain Reaction* (PCR), per l'identificazione dei virus delle api della paralisi acuta (ABPV), della paralisi cronica (CBPV), della cella reale nera (BQCV), dell'ala deforme (DWV), della covata a sacco (SBV), del virus della paralisi acuta israeliana (IAPV) e del Kashmir virus (KBV);
- N. 38 osservazioni al microscopio elettronico a trasmissione per diagnosi di virusi;
- N. 21 esami ispettivi da favo da nido;
- N. 21 test immunoenzimatici per diagnosi di peste americana ed europea mediante kit AFB/EFB (Ditta Chemicals Laif);
- N. 42 esami colturali per diagnosi di peste americana ed europea secondo le procedure OIE (Manual of Standards, 2008);
- N. 7 analisi mediante PCR per diagnosi di peste americana.

In caso di diagnosi di malattie contemplate dal Regolamento di Polizia Veterinaria, i Servizi Veterinari delle Aziende USL hanno sempre avuto a disposizione il supporto tecnico dei medici veterinari dell'IZSLT.

## Risultati

In tutti i moduli non sono stati osservati fenomeni di morie massive degli alveari. La mortalità media

evidenziata sui 150 alveari monitorati è stata pari al 28% (42 alveari morti su 150) dal mese di ottobre 2009 ad aprile 2010. Nello specifico, è stata regi-

strata una mortalità media del 38% nel modulo di Arezzo, del 30% nel modulo di Siena e del 16% nel modulo di Firenze (Fig. 2).

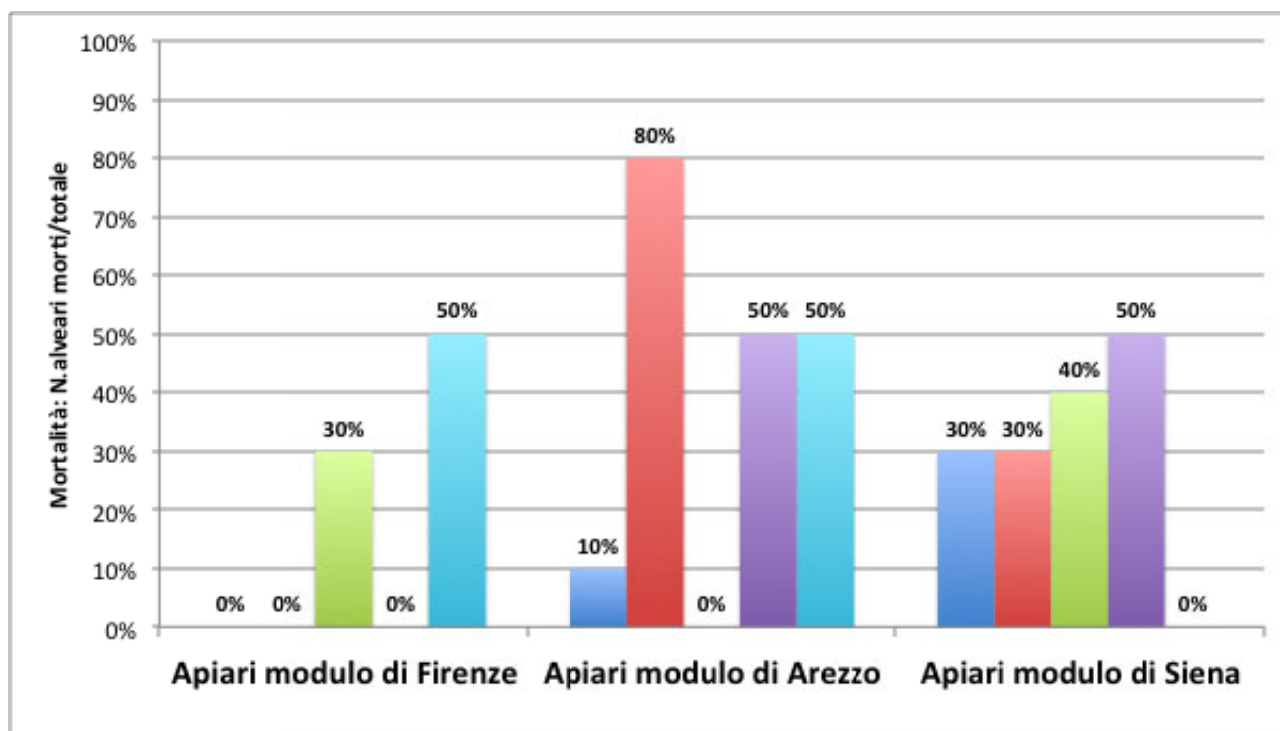


Figura 2 - Mortalità evidenziata nei 3 moduli durante il primo anno di monitoraggio.

La ricerca di residui di pesticidi dalla cera ha dato sempre esito negativo per i neonicotinoidi, mentre in 2 apiari del modulo di Firenze ed in 2 apiari del

modulo di Arezzo sono state rilevate tracce di acaricidi (clorfenvinphos, coumaphos, fluvalinate) nei prelievi di settembre e novembre (Tab. 1).

Tabella 1 - Risultati della presenza di acaricidi nella cera dei moduli di Firenze ed Arezzo.

	Apiario	Apiario
Modulo di Firenze	fluvalinate 100 ppb	fluvalinate 18 ppb e coumaphos 4 ppb
Modulo di Arezzo	coumaphos 87 ppb e clorfenvinphos 153 ppb	coumaphos 40 ppb

Il contenuto medio in proteine totali riscontrate nel polline analizzato è risultato pari al 18%: il valore più basso (12,8%) è stato registrato nel modulo di Siena, mentre quello più alto nel modulo di Arezzo (24,4%). Le morie registrate nei diversi apiari non sono risultate essere correlate al tenore in proteine evidenziato nel polline.

Dall'analisi palinologica è stato possibile estrapolare informazioni sull'ordinamento colturale delle varie zone: in particolare, sono state evidenziate coltivazioni intensive di mais concentrate nell'area del Comune di Borgo San Lorenzo nel Mugello, dove sono presenti la maggior parte di allevamenti bovini

della provincia di Firenze e coltivazioni prevalentemente cerealicole nelle altre zone.

Non è stato possibile associare a tale analisi trattamenti su specifiche colture con agrofarmaci, dal momento che non sono mai stati riscontrati fenomeni di intossicazione delle api.

I risultati dei principali virus delle api alla PCR hanno evidenziato una presenza di tali patogeni in tutti gli apiari oggetto dell'indagine. I virus di più frequente riscontro sono stati quello dell'ala deforme (Deformed Wing Virus, DWV - 53,06%) e della covata a sacco (Sac Brood Virus, SBV - 45,58%), seguiti dal virus della cella reale nera (Black Queen

Virus, BQCV - 26,53%), dal virus della paralisi acuta (Acute Bee Paralysis Virus, ABPV - 25,85%) e dal virus della paralisi cronica (Chronic Bee Paralysis, CBPV - 18,37%). Il virus della paralisi acuta israeliana (Israeli Acute Paralysis Virus, IAPV),

chiamato in causa nei fenomeni di moria degli alveari in altri Paesi e recentemente isolato in Italia, non è invece mai stato evidenziato; lo stesso risultato è stato osservato per il virus Kashmir (Kashmir Bee Virus, KBV).

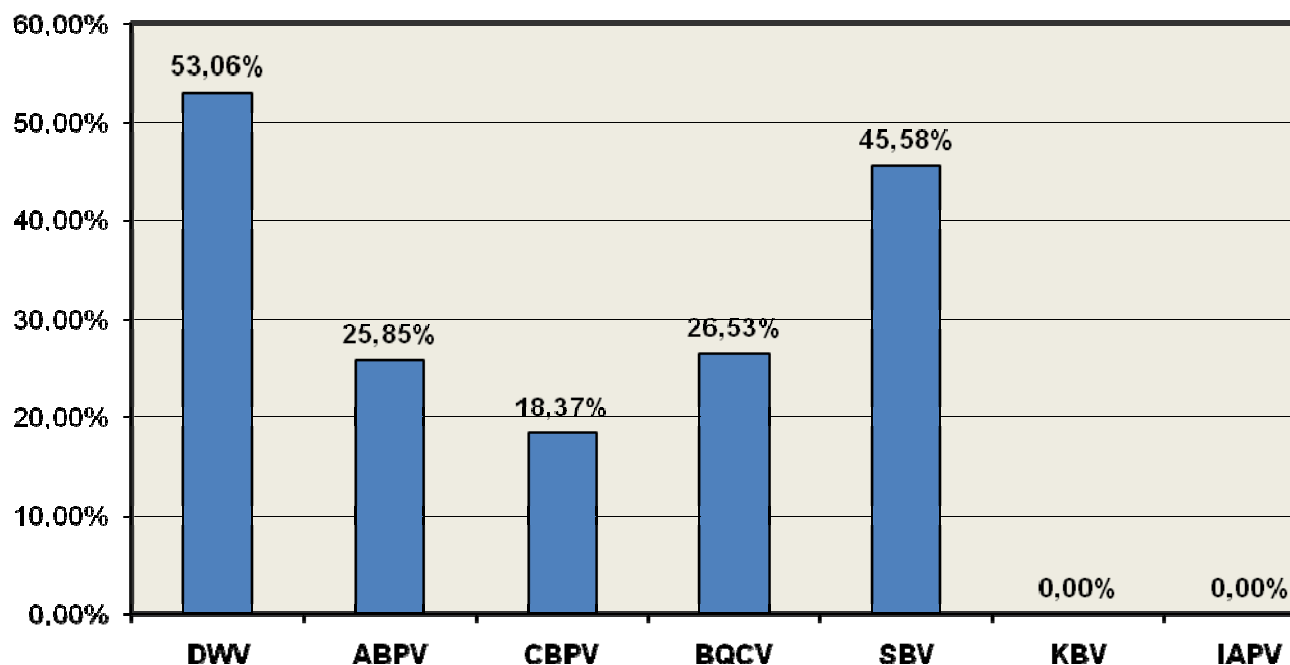


Figura 3 - Prevalenza delle virosi evidenziate in Toscana.

Per quanto concerne la nosemiasi, in nessun campione è stato evidenziato *N. apis*, mentre *N. ceranae* è stato rinvenuto, sebbene non costantemente du-

rante il corso dell'anno, in tutti gli apiari (Tab. 2). In Figura 4 è riportato graficamente l'andamento dell'infezione nei diversi moduli.

Tabella 2 - Percentuale di alveari positivi (metodo PCR-RFLP) a *Nosema ceranae* nel corso delle visite in apiario.

	GIUGNO 2009	AGOSTO - SETTEMBRE 2009	OTTOBRE - NOVEMBRE 2009	MARZO - APRILE 2010
MODULO di FIRENZE	46%	20%	18,75%	54,76%
MODULO di SIENA	36%	8%	0%	7,89%
MODULO di AREZZO	26%	0%	11,43%	31,43%
Media	36%	9,65%	14,28%	32,17%

*Varroa destructor* è stata segnalata 21 volte dai tecnici apistici; tali segnalazioni sono state realizzate solo in caso di rilevazione di infestazioni massive dell'acaro (riscontro del parassita sulle api adulte). Sono stati infine diagnosticati 3 casi di peste americana nelle province di Siena, Arezzo e Firenze, per un totale di 7 alveari coinvolti.

### Considerazioni e conclusioni

Durante il primo anno di attività del progetto APENET-Toscana, non sono state riscontrate morie massive dovute ad avvelenamento da fitofarmaci e questo anche grazie al bando dei neonicotinoidi nella concia delle sementi di mais emanato dal Ministero della Salute in accordo con il Ministero

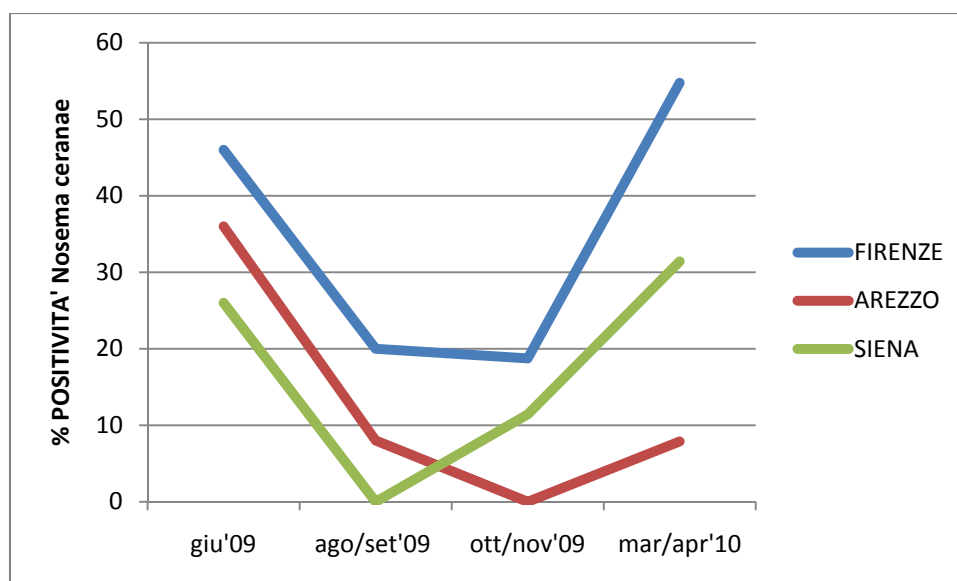


Figura 4 - Andamento dell'infezione da *Nosema ceranae* nei 3 moduli durante le 4 visite in apiario.

dell'Agricoltura ed in vigore da settembre 2008 a giugno 2011.

La peste americana è risultata negli apiari una causa marginale di morie degli alveari, mentre i virus ed il *Nosema ceranae* si confermano agenti patogeni fortemente diffusi negli alveari toscani.

Il riscontro di virus in api asintomatiche riconferma quanto riportato in letteratura e cioè lo stato di latenza dei virus nelle api; l'intervento di altri fattori concomitanti determinerebbe l'insorgenza di patologia conclamata.

*N. ceranae* risulta essere responsabile di una malattia endemica, peraltro poco od affatto nota agli apicoltori. L'andamento del livello d'infezione nel corso dell'anno conferma come *N. ceranae* sia un patogeno fortemente condizionato da fattori esterni, la maggioranza dei quali (ad esempio: le condizioni climatiche, altri patogeni contemporaneamente presenti nelle api come *Varroa destructor* o le virosi, la numerosità delle bottinatrici negli alveari o la genetica delle regine) ancora da approfondire.

I dati raccolti evidenziano comunque la necessità di adeguare il Regolamento di Polizia Veterinaria (R.P.V. - D.P.R. 8 febbraio 1954 n. 320) anche per tale patologia, essendo la nosemiasi inserita nell'elenco delle malattie denunciabili delle api. Nel R.P.V., ad esempio, potrebbe risultare opportuno distinguere espressamente gli interventi da adottare in caso di nosemiasi da *N. apis* rispetto a quella da adottare in caso di nosemiasi da *N. ceranae*; questo anche in considerazione del fatto che ai tempi della stesura del Regolamento di Polizia Veterinaria era noto solo *N. apis*.

Nella cera sono stati ritrovati residui di acaricidi anche per sostanze ritirate da tempo dal commercio. Non è chiaro se questo è dipeso dalla cera contaminata e riciclata o dall'uso illecito di principi attivi non registrati per l'apicoltura.

In Toscana è stato fatto un grosso sforzo fin dall'inizio per impostare il monitoraggio con il coinvolgimento di tutte le competenze produttive e sanitarie locali.

Nonostante siano stati evidenziati alcuni elementi di criticità quali il raccordo tra i diversi settori e l'integrazione tra la rete nazionale e quella regionale, è possibile considerare il progetto qui presentato un utile indicatore di salute degli apiari toscani. Inoltre, grazie a questo monitoraggio, sono state raccolte per la prima volta, importanti informazioni sulle malattie delle api in Toscana.

#### Ringraziamenti

Si ringraziano i tecnici apistici che hanno provveduto a realizzare le rilevazioni ed i campionamenti presso le diverse aziende apistiche soggette a monitoraggio: Giorgio Andreozzi (Toscana Miele), Federica Mencherini (AAPT), Paolo Piazza (ARPAT), Nicola Quilici (Toscana Miele), Serena Rocchi (Provincia di Siena) e Mirko Sbragi (AAPT).

#### Bibliografia

BAKONY T., FARKAS R., SZENDOR A., DABOS-KOVACS M., RUSVAI M., 2002 - Detection of acute bee paralysis virus by RT-PCR in honey bee and

- Varroa destructor* field samples: rapid screening of representative Hungarian apiaries. *Apidologie*, Vol. 33: 63-74.
- BERÉNYI O., BAKONYI T., DERAKHSHIFAR I., KOGLBERGER H., NOWOTNY N., 2006 - Occurrence of six honeybee viruses in diseased austrian apiaries. *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 72: 2414-2440.
- BLANCHARD P., OLIVIER V., ISCACHE A.L., CELLE O., SCHURR C.F., LALLEMAND P., RIBIÈRE M., 2008 - Improvement of RT-PCR detection of chronic bee paralysis virus (CBPV) required by the description of genomic variability in French CBPV isolates. *Journal Invertebrate Pathology*, Vol. 97: 182-185.
- BLANCHARD P., SCHURR F., CELLE O., COUGOULE N., DRAJNUDEL P., THIÉRY R., FAUCON J.P., RIBIÈRE, 2008 - First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). *M. Journal of Invertebrate Pathology*, Vol. 99, Issue 3: 348-350.
- CHEN Y.P., EVANS J.D., 2007 - Historical presence of Israeli acute paralysis virus in the United States. *American Bee Journal*, Vol. 147: 1027-1028.
- SHEN M., CUI L., OSTIGUY N., COX-FOSTER D., 2005 - Intricate transmission routes and interactions between-picorna-like viruses (Kashmir virus and Sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *Journal of General Virology*, Vol. 86: 2281-2289.
- COX-FOSTER D.L., CONLAN S., HOLMES E.C., PALACIOS G., EVANS J.D., MORAN N.A., QUAN P.L., BRIESE T., HORNING M., GEISER D.M., MARTINSON V., VANENGELSDORP D., KALKSTEIN A.L., DRYSDALE A., HUI J., ZHAI J., CUI L., HUTCHINSON S.K., SIMONS J.F., EGHOLM M., PETTIS J.S., LIPKIN W.I., 2007 - A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, Vol. 318: 283-287.
- OIE Terrestrial Manual, 2008 - Nosemosis of honey bees. Chapter 2.2.4: 410-414.
- MAORI E., LAVI S., MOZES-KOCH R., GANTMAN Y., PERETZ Y., EDELBAUM O., TANNE E., SELA I., 2007 - 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*. Vol. 88: 3428-3438.
- PALACIOS G., HUI J., QUAN P.L., KALKSTEIN A., HONKAVUORI K.S., BUSSETTI A.V., 2008 - Genetic analysis of Israel Acute Paralysis Virus: distinct cluster are circulating in the United States. *Journal of Virology*, Vol. 82: 6209-6217.
- KLEE J., M. BESANA A., GENERSCH E., GISDER S., NANETTI A., TAM D.Q., CHINH T.X., PUERTA F., RUZ J.M., KRYGER P., MESSAGE D., HATJINA F., KORPELA S., FRIES I., PAXTON R.J., 2007 - Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of invertebrate Pathology*, 96: 1-10.
- HIGES M., MARTIN-HERNANDEZ R., MEANA A., 2006 - *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of invertebrate pathology*, 94: 81-83.