

## Patologie rare: un caso di *Nosema apis* in Italia

A. Cersini<sup>1</sup>, V. Antognetti<sup>1</sup>, A. Giacomelli<sup>1</sup>, S. Puccica<sup>1</sup>, M. Pietropaoli<sup>1</sup>,  
M. Milito<sup>1</sup>, G. Cardeti<sup>1</sup>, U. Marchesi<sup>1</sup>, A. Maroni Ponti<sup>2</sup>, M. Pizzariello<sup>1</sup>,  
C. Gobbi<sup>1</sup>, L. Bianchini<sup>3</sup>, D. Amaddeo<sup>1</sup>, F. Scholl<sup>1</sup>, G. Formato<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

<sup>2</sup>Ministero della Salute

<sup>3</sup>Servizi Veterinari ASL RM/F

### INTRODUZIONE

La Nosemiasi è una malattia denunciabile delle api adulte provocata da funghi unicellulari appartenenti alla Classe *Microsporidi*, Famiglia *Nosematidi*, Genere *Nosema*. Finora sono stati descritti due microsporidi che colpiscono l'Ape Europea (*Apis mellifera*): *Nosema apis* e *Nosema ceranae*, responsabili di due forme completamente distinte di malattia.

*N. apis* è responsabile della forma classica della malattia, sebbene attualmente in Italia predomina fortemente *N. ceranae*. La diagnosi di *N. apis* non è facile; infatti l'unico segno evidente è la presenza di escrementi liquidi sui telaini e sul predellino dell'arnia. L'infezione si propaga mediante l'ingestione delle spore durante la trofallassi, durante la pulizia del corpo e mediante il cibo contaminato. Le spore, una volta ingerite, germinano nel lume intestinale dando origine a forme ameboidi, chiamate sferoplasma, dotate di movimenti propri grazie alla produzione del tubo polare che consente la penetrazione nella mucosa intestinale ed in particolare a livello della regione posteriore dei ventricoli. Lo sferoplasma, una volta giunto a contatto con le cellule intestinali, mediante il tubulo polare riesce a penetrare nelle cellule ospiti dove si riproduce molto velocemente con conseguente danneggiamento di tutto l'epitelio intestinale ed incapacità di adsorbire i nutrienti. È anche importante sottolineare che le spore di *N. apis* sono in grado di infettare le ghiandole ipofaringee (ghiandole della nutrizione o ghiandole del latte) delle api nutrici bloccandone la loro secrezione e questo può comportare il

blocco della nutrizione della covata. Inoltre le spore, una volta emesse con le feci, vengono a contaminare le scorte alimentari aumentando la probabilità di propagazione dell'infezione da *N. apis*. È quindi importante la precoce identificazione dei focolai di *N. apis* e la loro gestione che prevedono misure restrittive previste dal Regolamento di Polizia Veterinaria (articoli 154, 155, 156) come il sequestro dell'apiario, una zona di controllo di 3Km intorno all'apiario infetto e suo dissequestro a risanamento avvenuto o distruzione dello stesso apiario colpito.

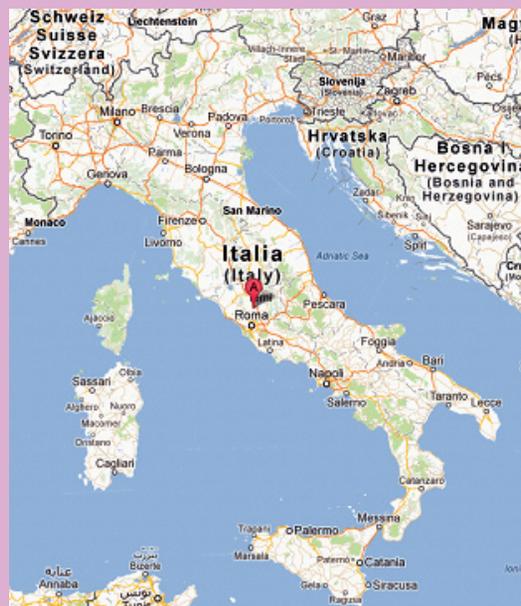


Foto 1 – Localizzazione del focolaio di *Nosema apis*

Il 01/10/ 2011 il Ministero della Salute, ha chiaramente differenziato le misure da adottare in caso di *N. apis* e di *N. ceranae*:



**Foto 2 – Rinvenimento di escrementi diarroidi in telaino infetto da *N. apis***

4

mentre per il *N. apis* verrà applicato alla lettera il RPV per i casi di malattia conclamata (con sintomi di diarrea), per il *N. ceranae* si provvederà ad intervenire mediante il ricorso alle buone pratiche di allevamento ed appropriata alimentazione.

Nel mese di marzo 2012, presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, sono pervenuti dei telaini da nido e delle api morte provenienti da 6 famiglie di un apiario localizzato a Rignano Flaminio (Rm) (Foto 1), decedute durante il periodo invernale 2011 - 2012. L'apiario era complessivamente costituito da 9 alveari e quelli morti erano tutti visibilmente interessati da chiazze diarroidi a livello del predellino di volo e dei telaini del nido (Foto 2 e 3). I campioni sono stati sottoposti sia alle

analisi virologiche per la ricerca dei principali virus delle api, sia alla ricerca di nosemiati per l'identificazione di specie di *Nosema* spp.

#### MATERIALI E METODI

**Matrici impiegate per le analisi molecolari:** 15-20 api adulte.

**Preparazione dell'omogenato:** 15-20 api vengono omogenate in un tampone PBS1x (1ml / ape). Per l'estrazione del DNA totale vengono utilizzati 2 ml di omogenato.

**Estrazione del DNA totale:** I 2ml di omogenato vengono centrifugati in modo tale da raccogliere tutte le spore presenti nel campione. Le spore raccolte vengono messe in contatto con un apposito Buffer di germinazione, incubate a 37°C per 15 minuti in agitazione in modo tale da portarle nella fase di sferoplasma (fase vegetativa). Terminato il periodo di incubazione, alle spore in fase vegetativa, viene aggiunto il Lisozima in modo tale da rompere la parete cellulare. Il campione così trattato è sottoposto all'estrazione del DNA totale mediante l'impiego di un kit commerciale (QIAamp DNA Blood Mini kit-Qiagen).

**PCR diagnostiche utilizzate:** vengono effettuate 2 PCR: la prima specifica per *N. ceranae* e la seconda specifica per *N. apis*.

La PCR specifica per *N. ceranae* permette di identificare ed amplificare una regione di 218-219bp interna al gene codificante per il 16S dell'RNA ribosomiale (16S rRNA) specifica solo per *N. ceranae* (Martin-Hernández R. et al., 2007).



**Foto 3 – Telaino di alveare infetto da *N. apis*: notare la presenza di escrementi diarroidi sul legno**

La PCR specifica per *N. apis* permette l'amplificazione di una porzione di DNA di 321bp interna al gene codificante per il 16S dell'RNA ribosomiale (16S rRNA) specifica solo per *N. apis* (Martín-Hernández R. et al., 2007).

Il kit impiegato per effettuare entrambe le PCR è stato l'Ampli Taq Gold Taq Polymerase (Applied Biosystems) e le amplificazioni sono state effettuate con l'apparecchio Gene Amp® Gene System 9700 (Applied Biosystems) seguendo i profili di amplificazione termici riportati in letteratura (Martín-Hernández R. et al., 2007).

**Rilevazione dei prodotti di PCR mediante elettroforesi in gel di agarosio:** gli amplificati delle due reazioni di PCR sopra descritte (una specifica per *N. ceranae* e l'altra specifica per *N. apis*) sono stati visualizzati mediante elettroforesi in gel di agarosio all'1,5% (p/v) condotta nel tampone Tris-Boric Acid-EDTA (Biorad, Laboratories GmbH). Per la messa in evidenza del DNA è stato aggiunto al gel di agarosio un apposito colorante intercalante, il Gel Red 10,000X (Biotium), e l'acquisizione delle immagini è stata effettuata con Kodak Digital Science ID software. I marcatori di peso molecolare utilizzati per confrontare le dimensioni degli amplificati sono: 100bp Ladder (Invitrogen, Life Technologies) ed il 50bp Ladder (Invitrogen, Life Technologies).

**PCR di conferma positività impiegata per *N. apis*:** i campioni risultati positivi per *N. apis* sono stati di nuovo controllati andando ad amplificare una regione ancora più ristretta di 209bp presente nel DNA relativo alla subunità 16S dell'RNA ribosomiale (16S rRNA) di *N. apis* (Webster T. C. et al., 2004). Il kit impiegato per realizzare la PCR di conferma *N. apis* è stato l'Ampli Taq Gold Taq Polymerase (Applied Biosystems) e la amplificazione è stata effettuata con l'apparecchio Gene Amp® Gene System 9700 (Applied Biosystems) seguendo il profilo di amplificazione termico riportato in letteratura (Webster T.C. et al., 2004).

**PCR impiegata per caratterizzare ed ulteriormente confermare *N. apis*:** i campioni risultati positivi per *N. apis* sono stati caratterizzati andando ad am-

plificare una differente regione di 240bp del gene codificante per il 16S dell'RNA ribosomiale (16S rRNA) che si estende dal nucleotide 644 al nucleotide 883 (Higes M. et al., 2006). Il kit impiegato per questa PCR di caratterizzazione di *N. apis* è stato l'Ampli Taq Gold Taq Polymerase (Applied Biosystems) e la amplificazione è stata effettuata con l'apparecchio Gene Amp® Gene System 9700 (Applied Biosystems) seguendo il profilo di amplificazione termico riportato in letteratura (Higes M. et al., 2006). Gli amplificati relativi a questa PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi ed a estrazione del DNA da gel di agarosio mediante QIAquick® PCR Purification kit (Qiagen) in modo tale da sequenziarli.

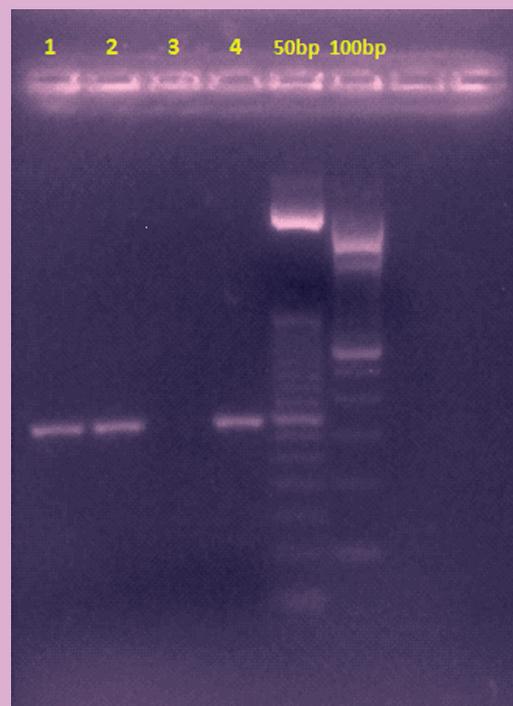


Foto 4 - PCR diagnostica utilizzata per la rilevazione di *Nosema apis*. Pozzetto 1 e 2: campione positivo per *N. apis* (focolaio Rignano Flaminio). Pozzetto 3: controllo negativo. Pozzetto 4: controllo positivo. Pozzetto 5: Ladder 50bp; Pozzetto 6: Ladder 100bp.

**Sequenziamento dei prodotti di PCR impiegata per caratterizzare ed ulteriormente confermare *N. apis*:** i prodotti di PCR estratti da gel di agarosio sono stati sottoposti al sequenziamento impiegando il BigDye® Terminator v1.1

Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) e l'apparecchiatura ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle depositate nella banca dati GenBank mediante BLAST per verificare l'appartenenza a *N. apis*.

## RISULTATI

I campioni alle PCR diagnostiche sono risultati negativi per *N. ceranae* e positivi per *N. apis* (Foto 4). Per la conferma di positività a *N. apis*, questo stesso campione di api è stato nuovamente esaminato mediante la PCR per *N. apis*. Entrambe le PCR specifiche per *N. apis* sono in grado di rilevare due regioni diverse del gene codificante per la subunità 16S dell'RNA ribosomiale (16S rRNA). La positività ad entrambe le PCR specifiche per *N. apis* è stata anche confermata dalla sintomatologia rinvenuta in corso di esame anamnestico. Inoltre il prodotto di PCR di 240bp, relativo alla porzione del gene (nucleotide 644-883) codificante per il 16S dell'RNA ribosomiale (16S rRNA) è stato sequenziato in modo tale da caratterizzare il ceppo di *N. apis*. La sequenza ottenuta è stata confrontata con quelle depositate in GenBank ed è stato rilevato il 100% di omologia di sequenza con la sequenza dotata di accession number FJ789798.1 e relativa al gene 16S ribosomiale del ceppo 3 di *N. apis* (*N. apis* isolate 3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence).

## DISCUSSIONE

I casi di nosemiasi da *Nosema apis* si sono presentati dopo un inverno molto rigido e caratterizzato da abbondanti nevicate. Non è stato necessario adottare le misure restrittive previste dal Regolamento di Polizia Veterinaria in quanto gli alveari infetti erano già tutti morti. I telaini delle famiglie morte sono stati distrutti. Dell'intero apiario solo tre alveari non presentavano segni diarroici da *Nosema apis* e dopo essere stati trattati con mangimi in commercio in grado di intervenire contro il *Nosema spp.* si sono ripopolati per andare poi in produzione. A maggio le api non presentavano più il patogeno all'esame in PCR diagnostica.

In Italia dal 2009 tutte le analisi effettuate per i piani di monitoraggio APENET, APEPARK, come pure le analisi ufficiali realizzate dai laboratori IZZSS non hanno mai evidenziato

casi di nosemiasi da *Nosema apis*.

Solamente nel 2008 è stato riscontrato il caso di nosemiasi da *N. apis* in un apiario ubicato in provincia di Bolzano (peraltro infezione mista: *N. apis*-*N. ceranae*).

E' anche importante segnalare il rinvenimento di un caso dubbio di *N. apis* ad entrambe le PCR specifiche per questo microsporidio da api regine importate dall'Argentina nel mese di marzo 2012 (controlli IZSLT). Non a caso, l'apiario in cui sono stati rinvenuti i casi di nosemiasi da *Nosema apis* nel Lazio, aveva acquistato api dallo stesso importatore.

## CONCLUSIONI

Nel presente lavoro viene riportato un raro isolamento di *Nosema apis* in Italia.

Le nuove misure previste dal Ministero della Salute per la gestione del *Nosema* si sono dimostrate efficaci e facilmente realizzabili nella normale gestione degli alveari. Il rischio di introdurre tale patogeno con l'importazione di api dall'estero è concreto e, purtroppo, probabilmente non sufficientemente preso in considerazione dagli apicoltori importatori e dalle normative comunitarie che non prevedono controlli di questo tipo.

## Ringraziamenti

Si ringrazia l'apicoltore Gianni Raggi dell'apicoltura Monte Soratte (RM) per la collaborazione e la professionalità dimostrata.

## Riferimenti bibliografici

Martín-Hernández R., Meana A., Prieto L., Martínez Salvador A., Garrido-Bailón E., Higes M. Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology*. (2007): pp. 6331-6338  
 Webster T.C., Pomper K.W., Hunt G., Thacker E. M., Jones S.C. *Nosema apis* infection in worker and queen *Apis mellifera*. *Apidologie*. (2004). Volume 35: pp. 49-54  
 Mariano Higes, Martín R., Meana A. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology*. (2006). Volume 92: pp. 93-9

## ERRATA CORRIGE

Le fotografie relative all'articolo "Marker predittivi di collasso delle colonie d'api" di S. Danielli e F. Mutinelli, pubblicato sul numero 7, anno 2012 de l'Apicoltore italiano sono di Alessandro Dalla Pozza.