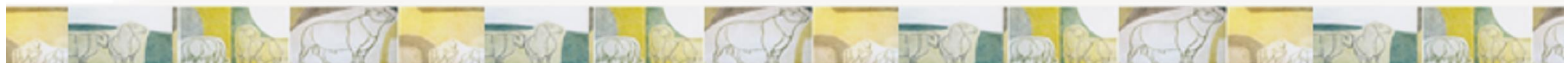


**IMPIEGO DELLA MEDICINA INTEGRATA
(FITOTERAPIA)
IN MODELLI DI PRODUZIONE PRIMARIA
- LT 409 -**

RICERCA CORRENTE 2009

Dario Deni



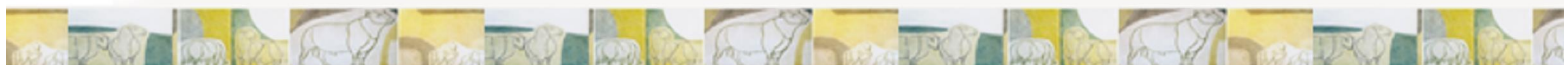
LT0409



É WP1: Impiego della Medicina Integrata con NeemAzal®, acido formico e acido lattico per la lotta alla varroatosi delle api

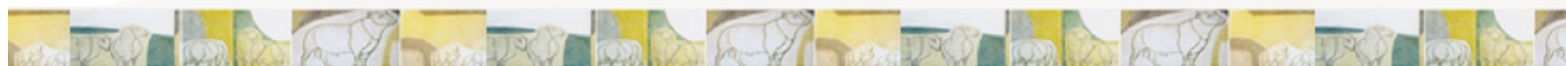


É WP2: Impiego della Medicina Integrata con OE di Neem e OE di Origano spagna per il controllo delle parassitosi gastrointestinali nell'allevamento ovicaprino



LT0409: Unità Operative

U.O. IMS 1	Dario Deni ó Sezione di Arezzo
U.O. IMS 2	Giovanni Formato ó Unità Operativa di Apicoltura (WP1)
U.O. IMS 3	Gabriella Perfetti ó Sezione di Siena (WP2)
U.O. IMS 4	Olga Lai ó D.O. Produzioni Zootecniche (WP2)
U.O. IMS 5	Antonella Cersini- D.O. Biotecnologie (WP1)
U.O. IMS 6	Luigi Giannetti ó D.O. Chimica (WP1)
U.O. IMS 7	Pietro Calderini- Sezione di Rieti (WP2)
U.O. EMS (ENEA)	Andrew Van Der Esch (WP1)



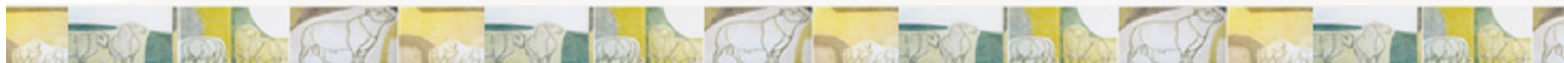
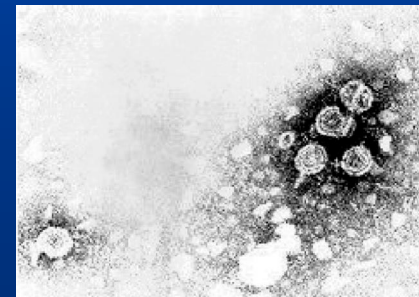
WP1: Impiego della medicina integrata con
NeemAzal®, acido lattico ed acido formico per
la lotta alla varroatosi delle api



WP1 Criticità sanitarie

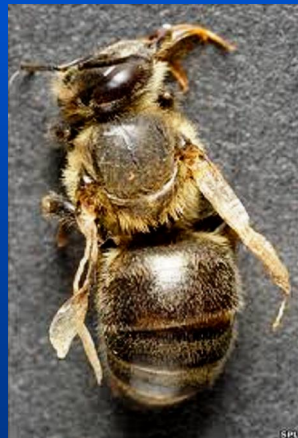
- ó Varroatosi (*Varroa Destructor*): è la malattia che arreca le maggiori perdite economiche nel settore apistico
- ó Malattie correlate: *nosemiasi* e *virosi*, aggravano lo stato di salute delle api
- ó È stata denunciata dalla stessa Commissione Europea la necessità di nuovi acaricidi registrati per il loro impiego in apicoltura

(Communication From the Commission to the European Parliament and the Council on Honeybee Health - Brussels, 6.12.2010 Com(2010) 714 Final)



La varroaí .

interferisce direttamente sul benessere e la sopravvivenza degli alvearií í



358

Y. Le Conte et al.

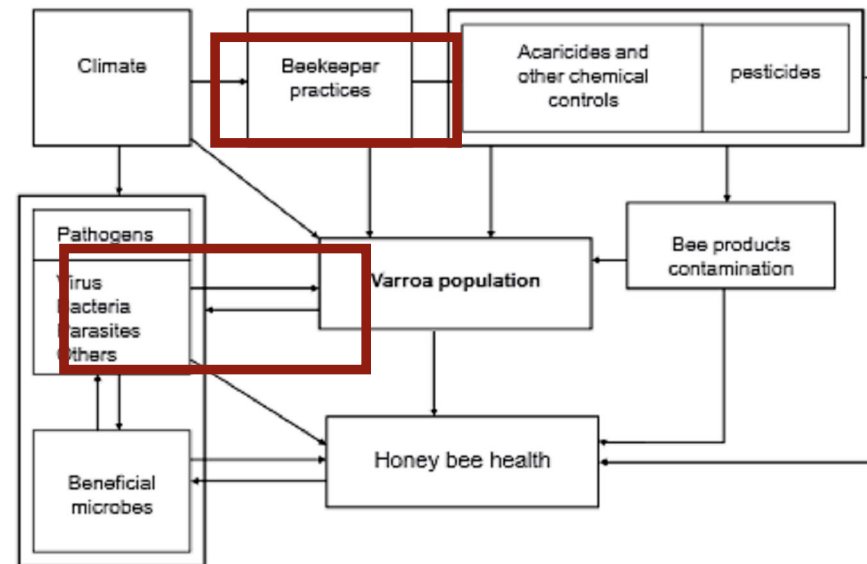


Figure 1. Potential synergistic effects of different stressors on varroa populations and HB health.

í .. lo stesso vale per gli acaricidi di sintesi



VARROATOSI:

Patologia ubiquitaria

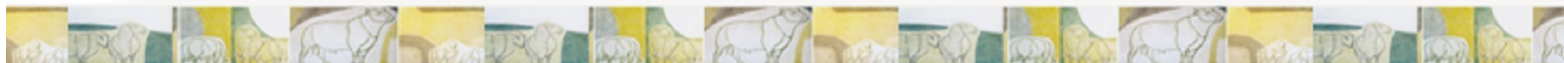
Implica trattamenti farmacologici obbligatori
da effettuare in momenti ben precisi
durante l'anno altrimenti la famiglia non sopravvive

Corretto impiego del farmaco

WP1 Obiettivi

**Individuazione delle modalità d'impiego in campo
di principi attivi acaricidi a basso impatto ambientale:**

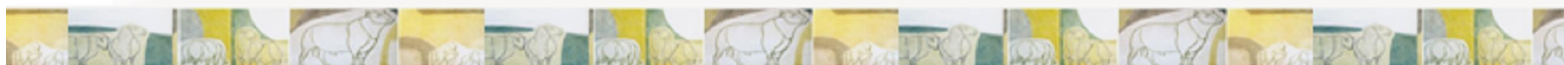
NeemAzal®, acido formico ed acido lattico



WP1 Acaricidi testati nel Progetto

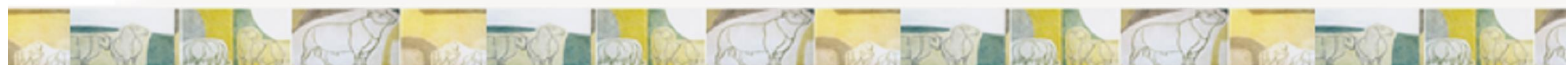


1. **Polvere tecnica di NeemAzal®** somministrato mediante un nuovo metodo di applicazione. Il prodotto acaricida è stato infatti mescolato alla cera al fine di annullare o ridurre gli effetti negativi riportati in letteratura verso le api adulte, la covata e la vitalità delle regine. Il NeemAzal mescolato a cera d'api sembra possa svolgere un'azione di disturbo/acaricida sulle femmine di varroa presenti, per la riproduzione, nelle cellette dell'alveare.
2. **Acido formico**: sostanza farmacologicamente attiva inclusa nella tabella 1 del Reg UE N. 37/2010 in cui rientrano le sostanze innocue per i consumatori. Acido formico in gel (MAQS®): nuova formulazione commerciale in vendita in Inghilterra, Canada ed USA. Acido organico con proprietà acaricida note in bibliografia per la lotta alla varroa, da impiegare in una nuova formulazione che riduca gli effetti negativi noti di tale principio attivo.
3. **Acido lattico**: sostanza farmacologicamente attiva inclusa nella tabella 1 del Reg UE N. 37/2010 in cui rientrano le sostanze innocue per i consumatori. È un acido organico con proprietà acaricida note in bibliografia per la lotta alla varroa. Si vuole testare un prodotto a base di acido lattico prodotto mediante fermentazione naturale, somministrato in assenza di covata, per aumentarne la efficacia acaricida.



WP1 ATTIVITÀ

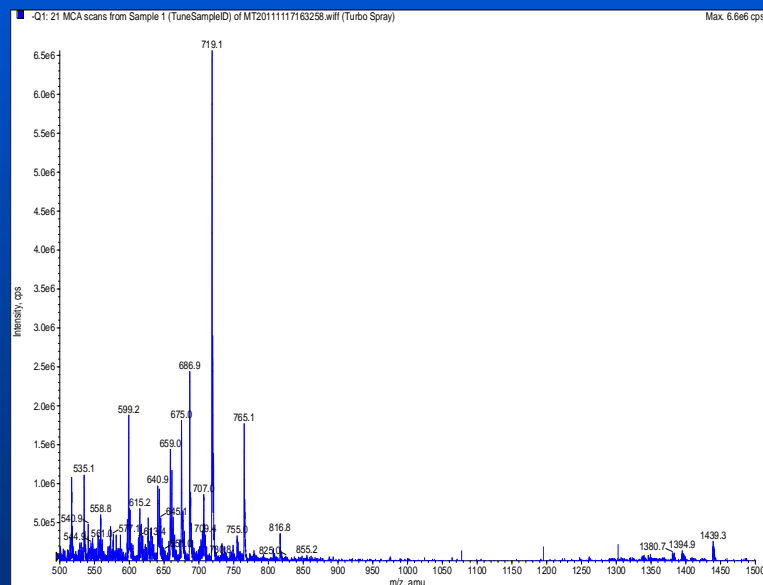
- É Controlli di qualità dei principi attivi testati
- É Individuazione di metodiche per l'analisi dei marker in HPLC per la ricerca del NeemAzal® nella matrice miele
- É Messa a punto di metodi di analisi biomolecolari per la quantificazione del *Nosema ceranae* e dei principali virus delle api
- É Prove in vitro: valutazione della tossicità (DL50) del NeemAzal®, biosaggi su varroa
- É Prove cliniche in apiario: per testare la efficacia acaricida del NeemAzal®, dell'acido formico e dell'acido lattico
- É Predisposizione di un protocollo terapeutico per la prevenzione e lotta alla varroatosi e delle malattie associate
- É Predisposizione di una piattaforma web dell'Unità Operativa di Apicoltura



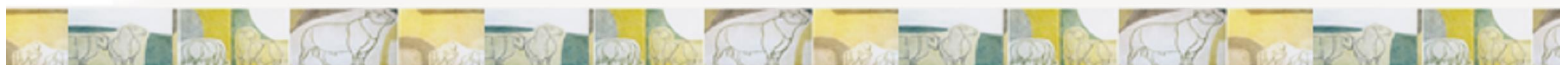
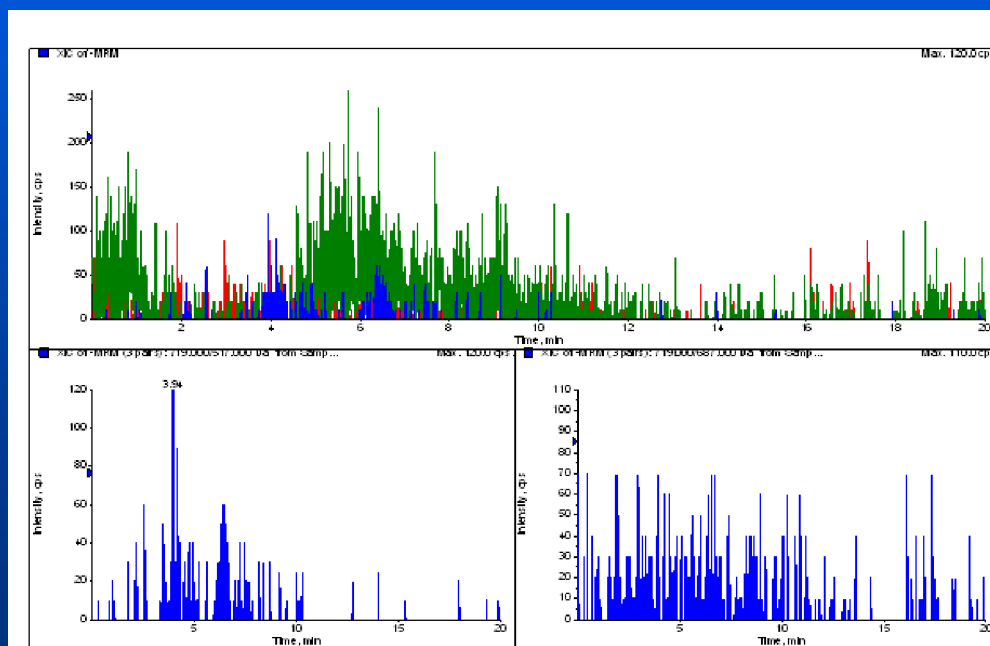
WP1



Individuazione delle metodiche HPLC per la ricerca di NeemAzal- azadiractina dal miele

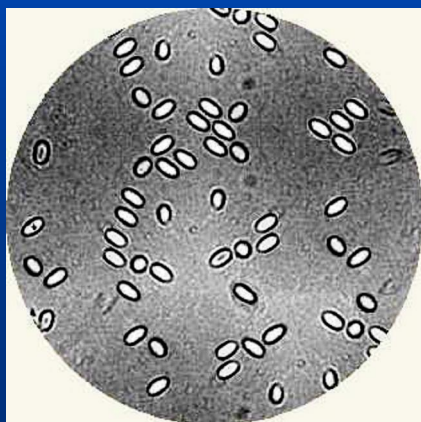


Spettro di massa di una soluzione standard di Azadiractina A 10µg/ml

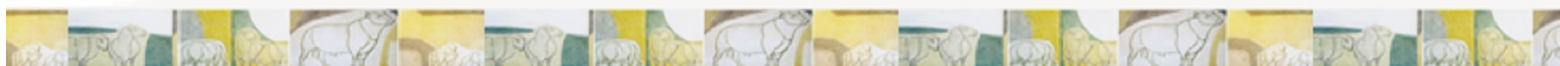
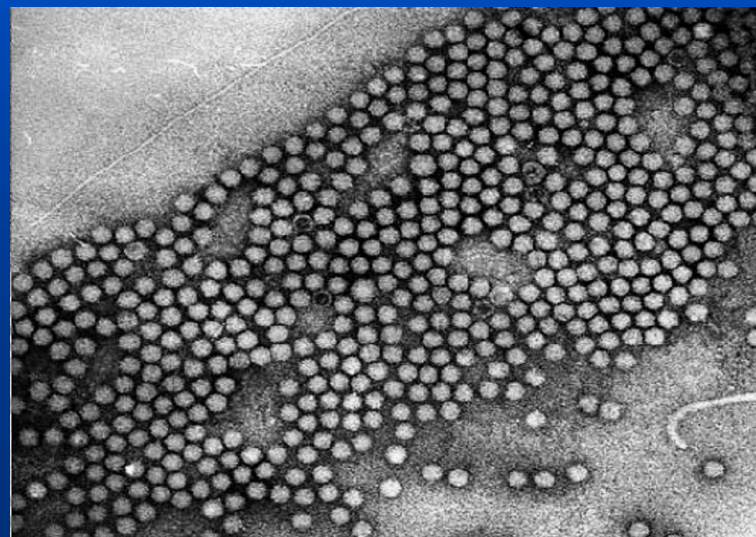


WP1

*Messa a punto di metodi di analisi biomolecolari per la quantificazione del *Nosema ceranae* e dei principali virus delle api*



ABPV (Bakonyi T., 2002), CBPV (Blanchard P., 2008), DWV (Berènyi O., 2006), SBV (Grabensteiner E., 2001), BQCV (Berènyi O., 2006), KBV (Berènyi O., 2006) sono stati selezionati dalla letteratura.



WP1 Prove in vitro

*Valutazione della tossicità (DL50) del NeemAzal®:
biosaggi su varroa*



Valutazione della tossicità (DL50) del NeemAzal®:

Biosaggi su varroa

Materiali e metodi

Sono stati realizzati 9 biosaggi su varroa
nel periodo maggio-ottobre 2011

6 maggio; 1 luglio; 4 luglio; 8 agosto (due prove); 5 settembre; 23 settembre; 26 settembre; 4 ottobre

I biosaggi sono stati realizzati in bottiglie per colture cellulari (cell culture flask) del volume di 50 ml.

Il prodotto testato NeemAzal® è stato aggiunto e mescolato a cera d'ape fusa.

La cera fusa trattata è stata aliquotata nelle flask per colture cellulari, in modo da ricoprire l'intera superficie disponibile con uno strato di circa 3 mm.

Nelle flask del gruppo di controllo non è stato aggiunto alcun prodotto acaricida nella cera.



Dosi somministrate di NeemAzal

40%	20%	10%	5%	2,5%
-----	-----	-----	----	------

TEMPERATURA

26-30 °C

UMIDITÀ RELATIVA

>60% (es. 70%)



Risultati

N° flask	Dose	Varroe morte a:					% Varroe morte a:					Mortalità % corretta* a 6 ore	Mortalità % corretta ² * a 18 ore	Mortalità % corretta ² * a 30 ore
		6 ore	18 ore	30 ore	43 ore	55 ore	6 ore	18 ore	30 ore	43 ore	55 ore			
Gruppo Controllo														
30	0	2	3	9	9	15	7	10	30	30	50	0	0	0
Gruppo NeemAzal														
10	2,50%	3	3	3	7	10	30	30	30	70	100	25,0	22	0
10	5%	1	2	4	5	10	10	20	40	50	100	3,6	11	14
10	10%	1	1	5	6	9	10	10	50	60	90	3,6	0	29
10	20%	1	1	3	4	4	10	10	30	40	40	3,6	0	0
10	40%	0	5	7	9	9	0	50	70	90	90	0	44	57

Mortalità delle varroe nel Biosaggio del 4 luglio 2011



I risultati ottenuti nella presente sperimentazione hanno confermato l'effetto acaricida del NeemAzal® (**mortalità di varroe entro le 55 ore nel Gruppo Neem Oil 40%: 21-80%**) ma non hanno permesso di calcolare una esatta DL50 nei confronti della varroa, per la variabilità dei dati di laboratorio ottenuti.

Tale variabilità è spiegabile sia con l'elevata eterogeneità delle varroe utilizzate in quanto prelevate da infestazioni naturali e sia con la complessità delle condizioni di laboratorio da ricreare per mantenere vitali gli acari per la durata della sperimentazione.



WP1: Prove cliniche in apiario per valutare l'efficacia del trattamento acaricida a base di:

NeemAzal®:

Valutazione dell'efficacia acaricida del NEEMAZAL® (p.a. azadiractina) aggiunto e mescolato alla cera, in diverse concentrazioni .



Acido formico in gel (MAQS®):

Valutazione dell'efficacia acaricida del prodotto MAQS® a base di acido formico in gel.



Acido lattico:

Valutazione dell'efficacia acaricida di acido lattico prodotto mediante fermentazione naturale.



WP1

1. Prova clinica sul NEEMAZAL®

Sono state eseguite n. 2 prove cliniche distinte

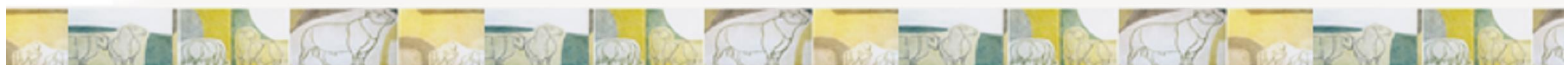
1. Luglio 2012- Ciampino-Roma su 15 alveari (3 gruppi sperimentali)
2. Maggio 2013- Bracciano-Roma su 28 alveari (4 gruppi sperimentali)



Apiario sperimentale IZSLT di Ciampino,
Roma



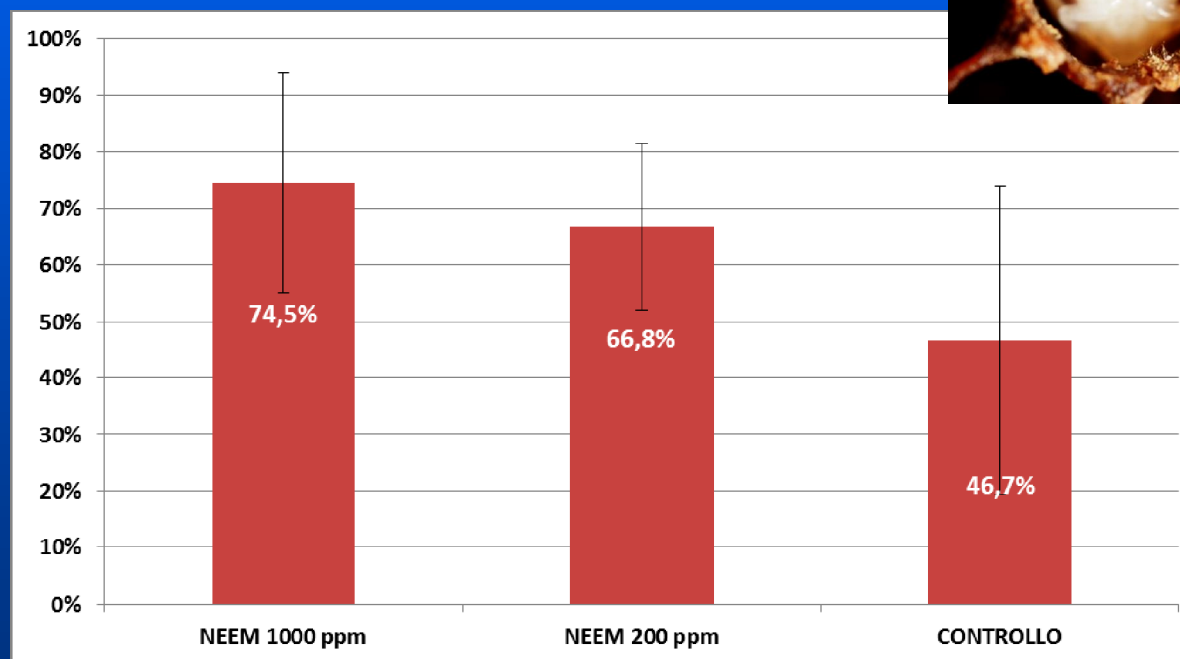
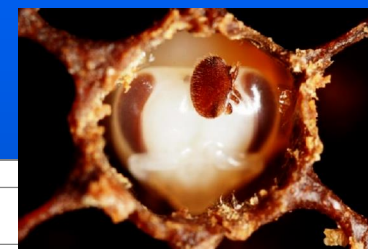
Apiario sperimentale in provincia di Bracciano-
Roma



WP1: risultati prova clinica Roma

NEEMAZAL® anno 2012

Valutazione della efficacia acaricida (%) della somministrazione di NeemAzal disciolto nella cera in concentrazione di 1.000ppm e di 200ppm



Il gruppo Neem 1.000ppm ottiene una efficacia acaricida maggiore. Entrambi i gruppi trattati con Neem nella cera dimostrano una efficacia acaricida superiore al gruppo di controllo

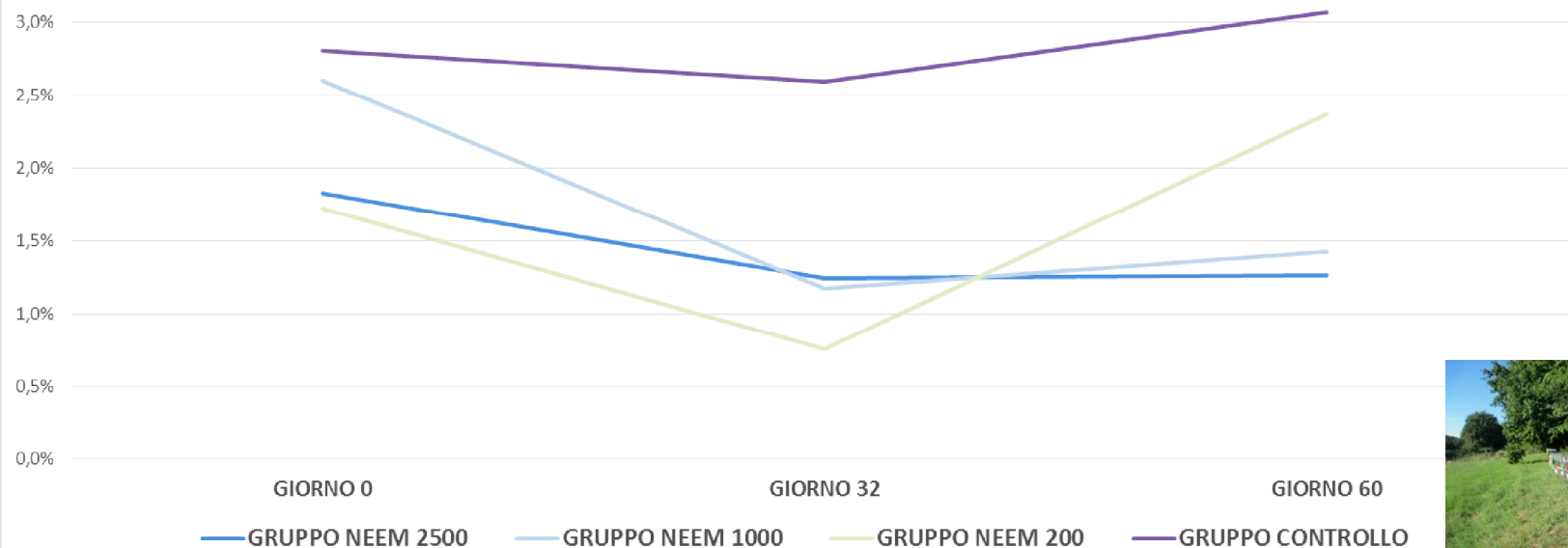
WP1: risultati prova clinica Bracciano

NEEMAZAL® anno 2013

Somministrazione di NeemAzal disciolto nella cera in concentrazione di 2.500ppm, 1.000ppm e di 200ppm

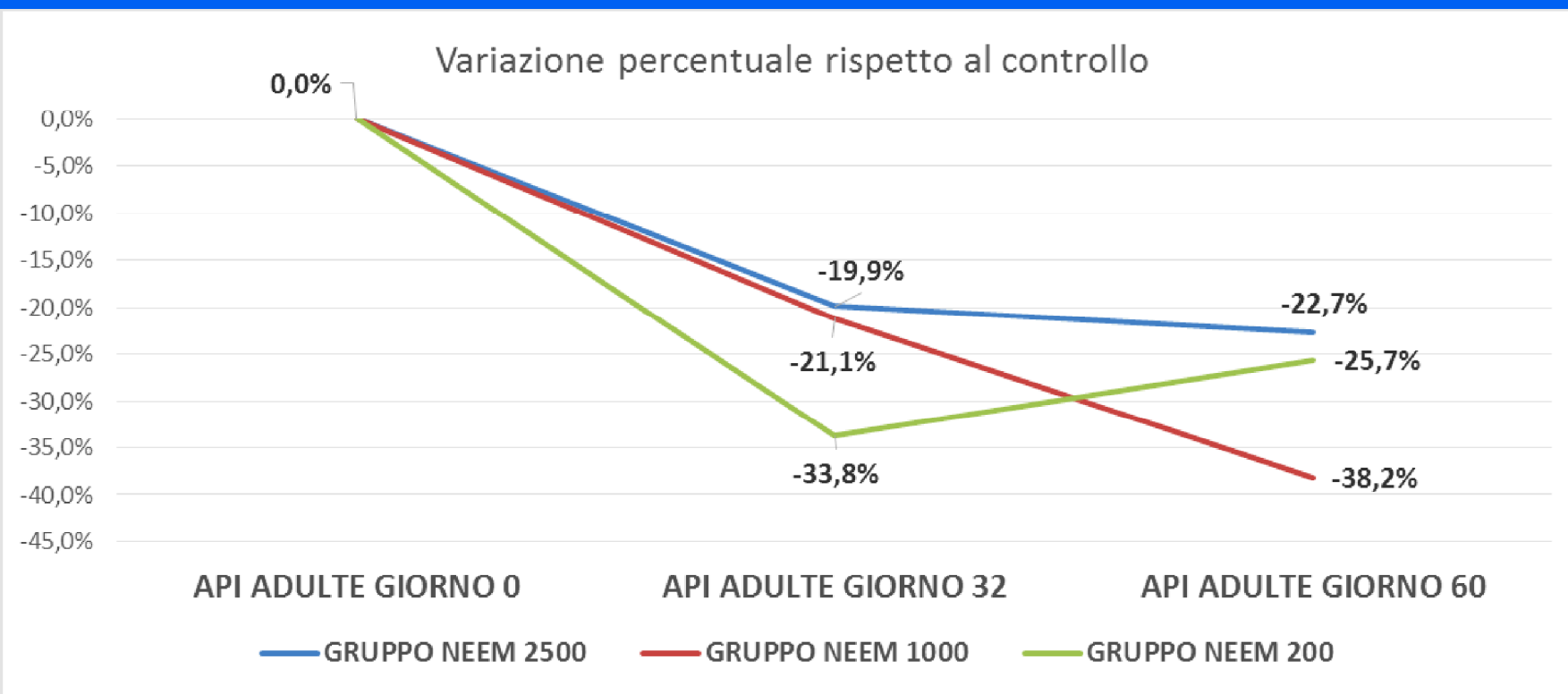


Percentuale di infestazione da varroa (metodica OIE)



Maggiore infestazione da varroa nel gruppo di controllo rispetto ai gruppi trattati con Neem nella cera. Il gruppo Neem 2.500ppm permette una riduzione di infestazione più costante nel periodo di osservazione.

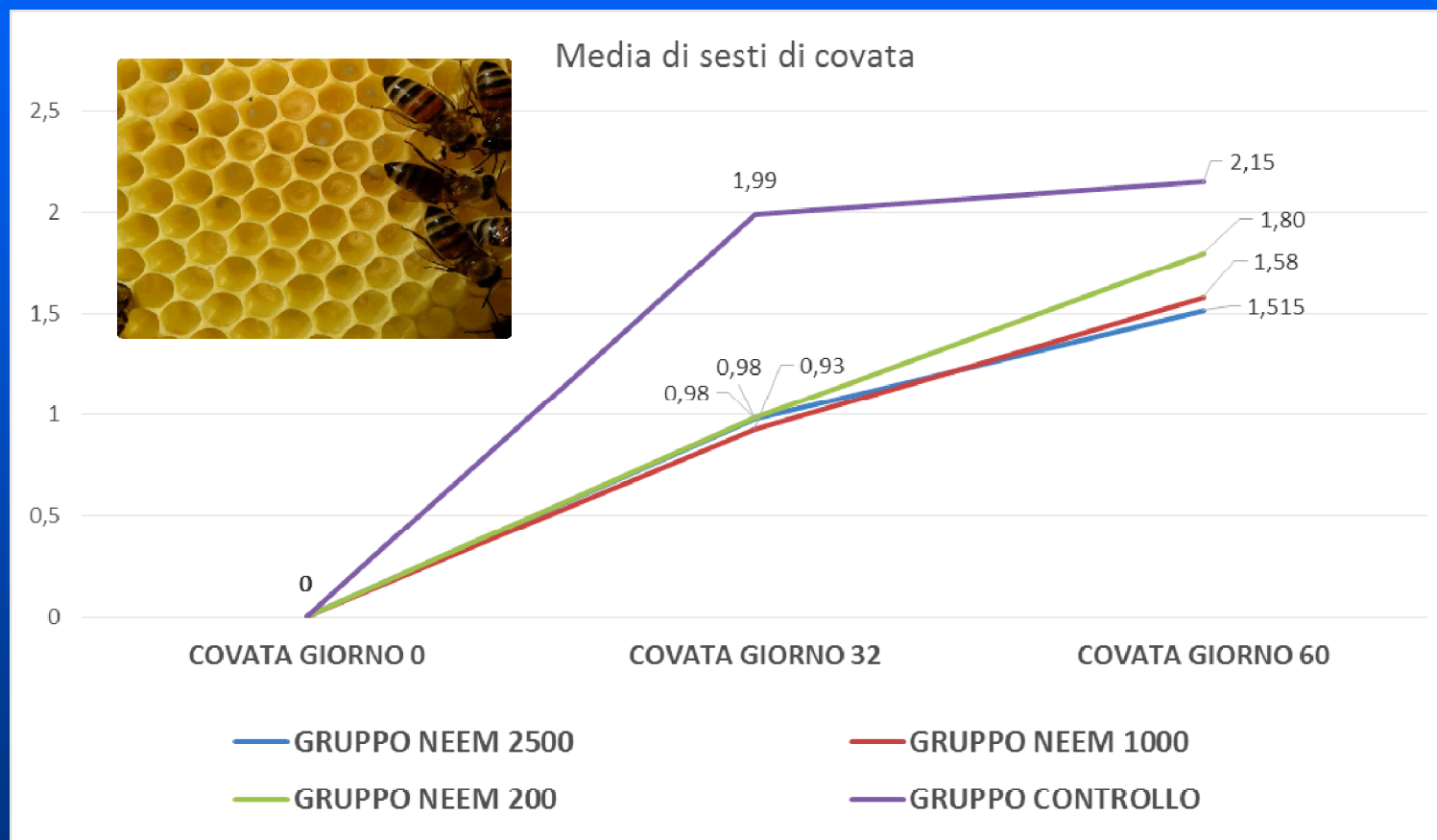
Stima della popolosità degli alveari (giorno 0-32 e 60)



Api adulte
(variazioni rispetto al gruppo di controllo)

Riduzione del numero delle api adulte in tutti i gruppi trattati con Neem nella cera, non dose-dipendente.

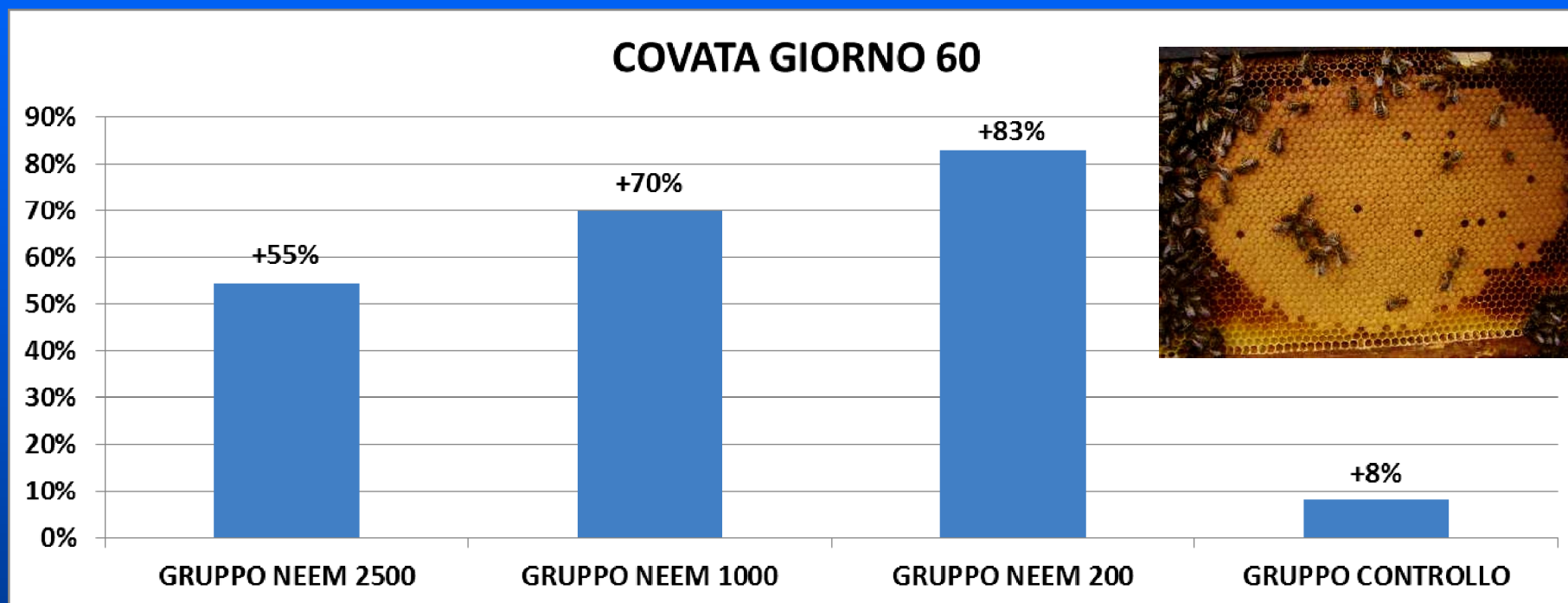
Danni alla covata causati dalla somministrazione di NeemAzal



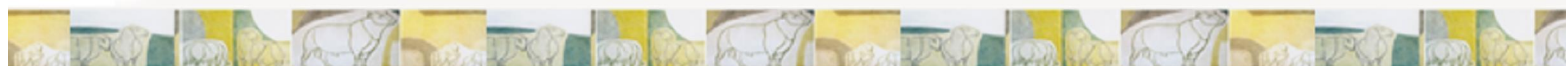
Riduzione della numerosità e della vitalità della covata nei gruppi trattati con Neem nella cera



Ovodeposizione delle api regina dopo 60 giorni dalla somministrazione di NeemAzal nella cera



Deposizione maggiore a due mesi dalla somministrazione del Neem nella cera, in tutti i gruppi trattati, rispetto al gruppo di Controllo. Gruppo Neem 200ppm: >74% rispetto al gruppo di Controllo.

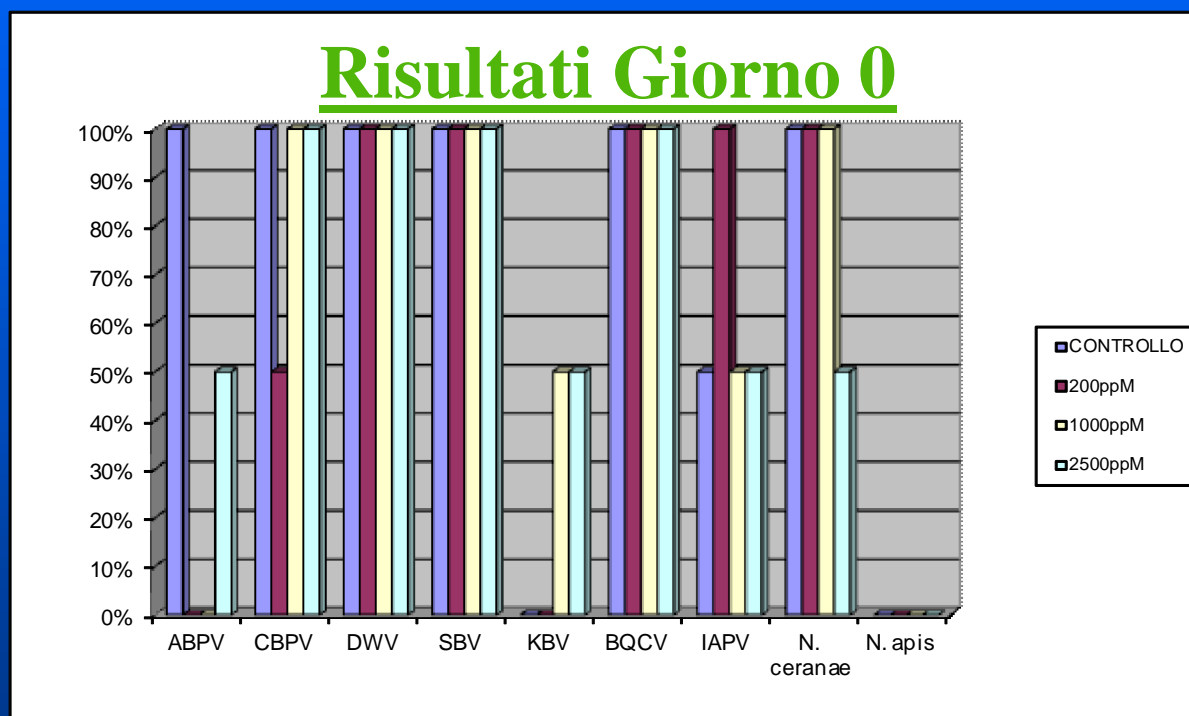


WP1: risultati prova clinica NEEMAZAL®

Valutazione della presenza di *Nosema spp* e delle virosi delle api

Tramite PCR sono stati ricercati 9 virus il *Nosemae ceranae* ed il *Nosemae apis*.

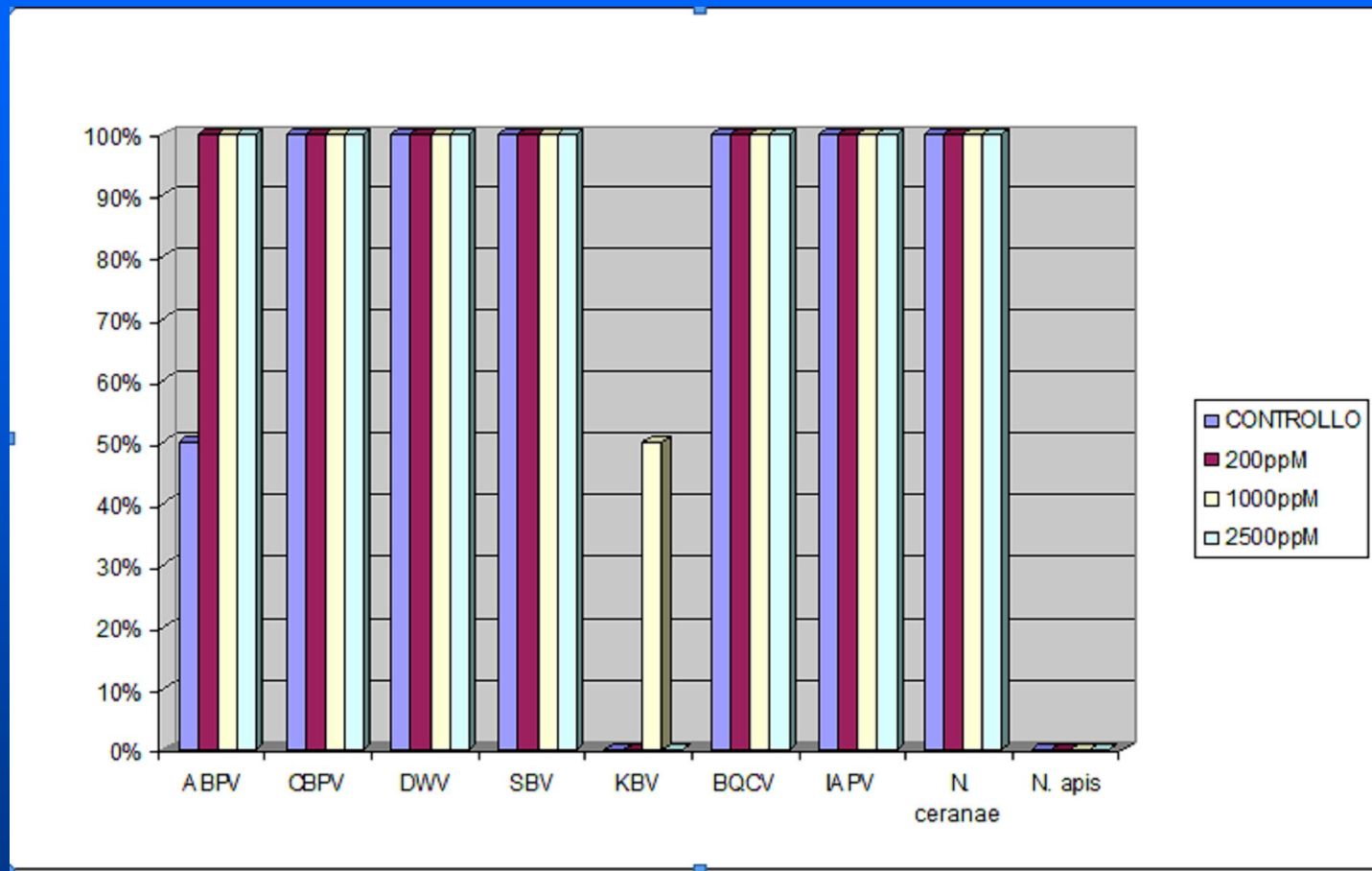
I campionamenti sono stati effettuati al giorno 0, giorno 30 e giorno 60.



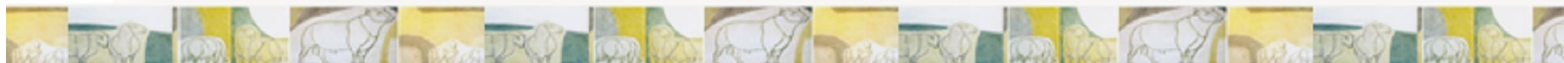
Diffusa presenza di virus e *Nosema ceranae*



Giorno 60

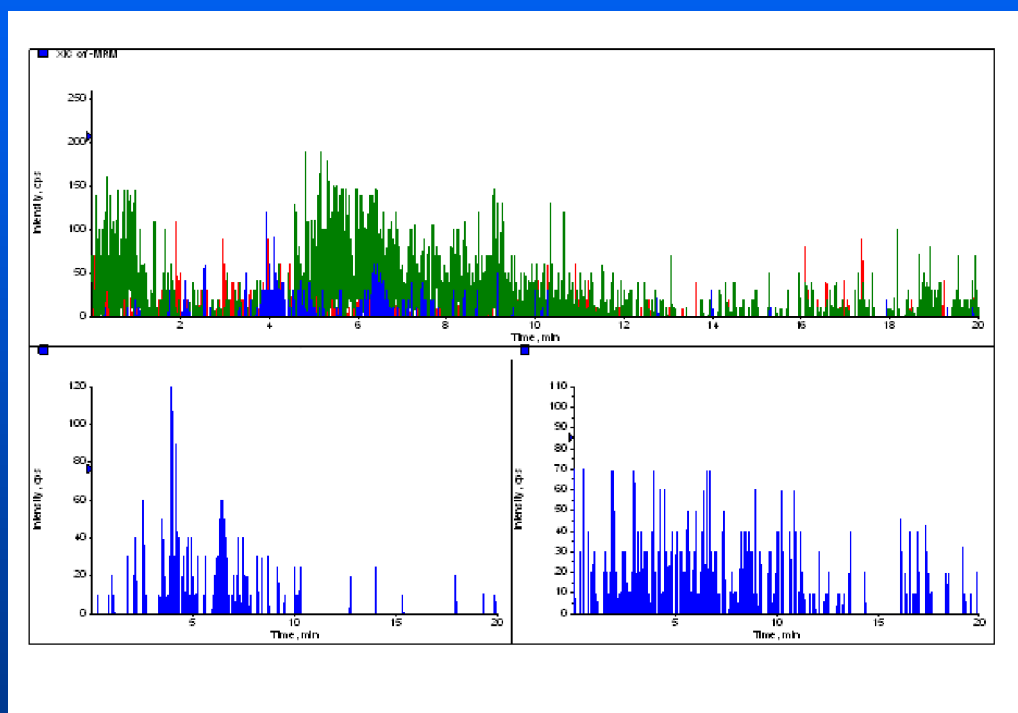


**Mancato contenimento prevalenza di virosi;
Mancato contenimento prevalenza *Nosema ceranae*.**



WP1: risultati prova clinica NEEMAZAL®

Risultati sulla ricerca di Azadiractina in campioni di miele in barattolo



Tracciato cromatografico relativo ad un campione di miele proveniente dalla sperimentazione

**Non sono stati riscontrati residui di Azadiractina
superiori al limite di rilevabilità della metodica applicata**



WP1

2. Prova clinica sull'acido formico in gel (MAQS®)

La prova di campo è stata condotta a luglio 2012 in provincia di Torino su 18 alveari omogenei per forza e privi di patologie evidenti, esclusa la varroatosi



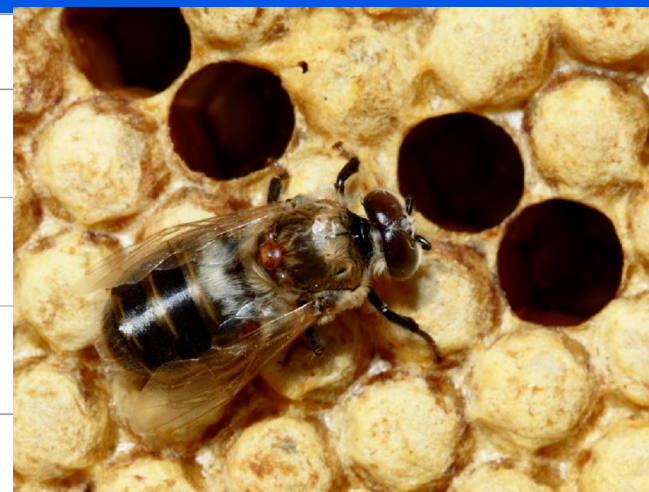
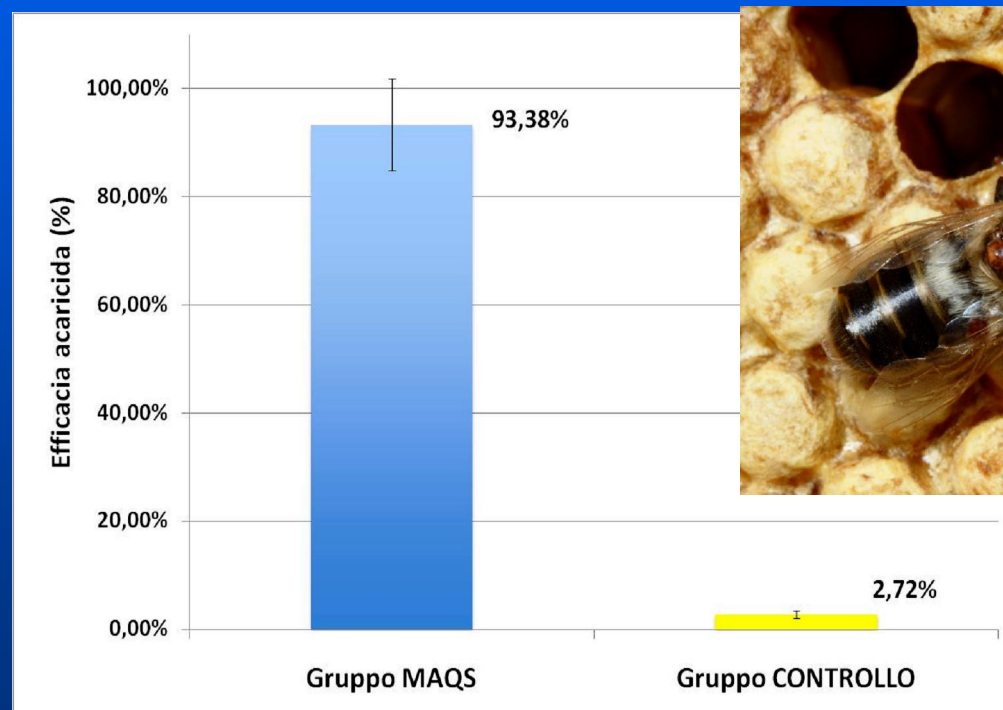
Due gruppi sperimentali
MAQS in presenza di covata: 9 alveari
Gruppo di controllo: 9 alveari



WP1: risultati prova clinica MAQS®

Attività acaricida (%)

La somministrazione per 7 giorni consecutivi di due strisce di MAQS® in presenza di covata ha evidenziato una efficacia acaricida pari al 93,4%.

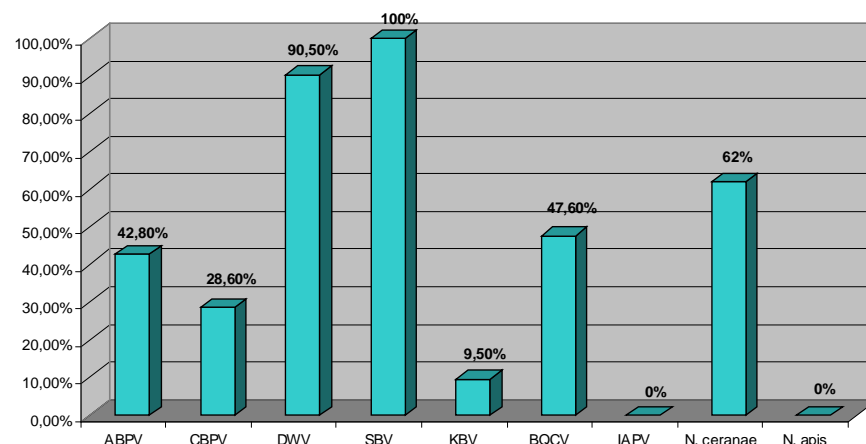


WP1: risultati prova clinica MAQS®

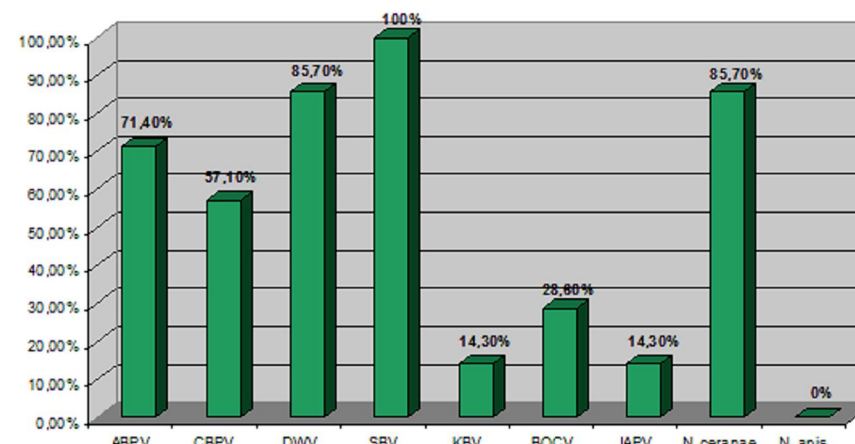


É Valutazione della presenza di *Nosema spp* e virosi delle api

RISULTATI PCR end point CAMPIONI TRATTATI



RISULTATI PCR end point CAMPIONI CONTROLLO



Campioni trattati con MAQS®: si osserva una netta diminuzione nella prevalenza di infezione per il virus della paralisi acuta (ABPV) ed in virus della paralisi cronica (CBPV).

Anche per *N. ceranae* si riscontra una debole riduzione nella prevalenza di infezione, rispetto al gruppo di controllo.



WP1

3. Prova clinica sull'acido lattico (90%) in soluzione acquosa ed ingabbigliamento della regina

Il prodotto a base di Acido lattico è composto da una soluzione acquosa costituita dal 40% in peso di acido lattico al 90%, ottenuto mediante fermentazione naturale.

Provincia di Arezzo, nel periodo estivo
28 colonie

Gruppo acido lattico+ ingabbigliamento della regina:

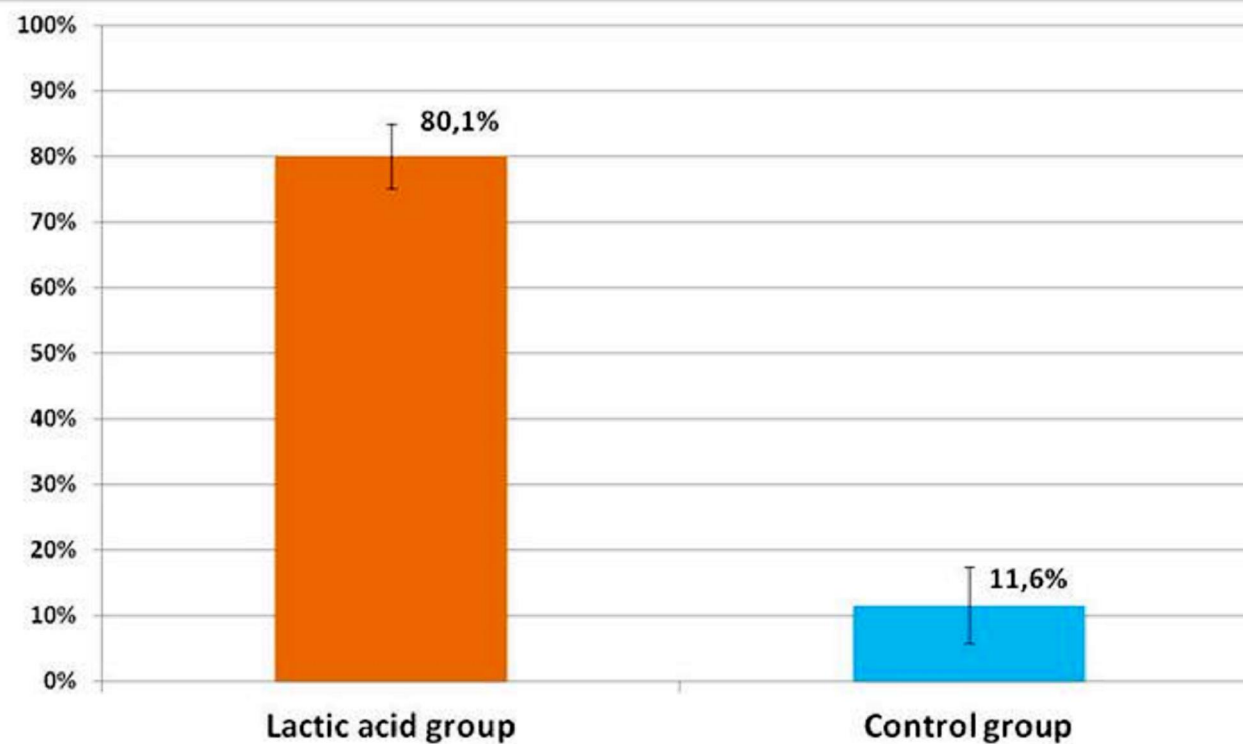
Un trattamento con acido lattico vaporizzato direttamente sulle api dopo 25 giorni di ingabbigliamento della regina (5ml/spazio interfavo occupato da api);



Gruppo di controllo: Un trattamento di acqua vaporizzata direttamente sulle api (5ml/spazio interfavo occupato da api).



Acido lattico ed ingabbigliamento della regina: efficacia acaricida (%)



**Il trattamento con acido lattico ha dimostrato un'efficacia acaricida media di 80,1%,
a fronte di una caduta naturale di varroa dell'11,6%.**

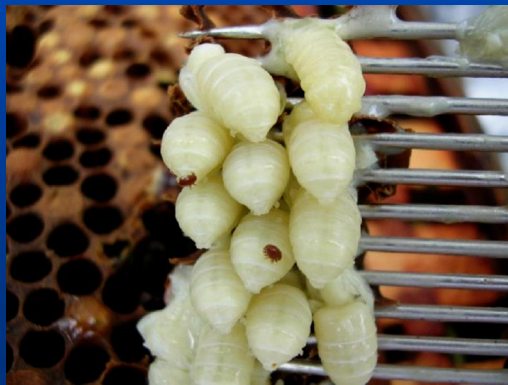


WP1

Protocollo terapeutico per la prevenzione e lotta alla varroatosi e delle malattie associate

Vista la penuria di prodotti acaricidi a basso impatto ambientale registrati per il loro impiego in apicoltura e vista la difficoltà di ottenere dei risultati di efficacia acaricida soddisfacenti ed omogenei con suddetti farmaci, risulta necessario ricorrere all'impiego di strategie di lotta integrata alla varroa.

Tali strategie, definite *Integrated Pest Management* od *IPM*, prevedono l'utilizzo di opportune tecniche apistiche in abbinamento con la somministrazione di sostanze farmacologicamente attive.



WP1



Predisposizione di una piattaforma web della Unità Operativa di Apicoltura IZSLT

www.izslt.it/apicoltura

Accesso all'area riservata

Inserire la password per accedere alla pagina

Accedi

Pannello utente

Inserisci i dati dell'apiario
Premere sul pulsante sottostante per inserire i dati del campionamento effettuato

Aggiungi i dati »

Contatti
Per qualsiasi problema contattaci:
giovanni.tormato@izslt.it

[Scarica il protocollo](#)

CLAUDIA ILARI

File CLAUDIA ILARI Qualizza Inserisci Formato Dati Strumenti Guida Tutte le modifiche salvate

fx

	AH	AI	AJ	AK	AL	AM	AN	AO	AP	AQ
6	135	32	21	823	881	822				
7	290	92	16	1722	2434	2931				
8	72	25	17	1162	4543	5311	9854	41.22		
9	44	24	28	712						
10	55	8	15	560						
11	130	28	51	1143						
12				245						
13	340	150	36	2131						
14	105	25	7	882						
15	157	63	24	1144						
16	160	45	19	1208						
17				0						
18	290	71	46	1211	4745					

EFFICACIA ACARICIDA MEDIA (%)

50,00
47,50
45,00
42,50
40,00

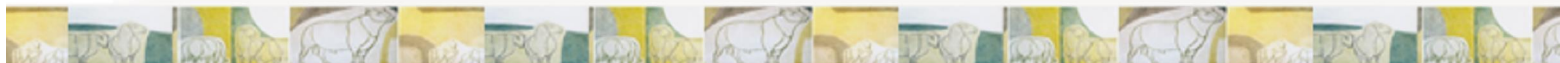
GRUPPO PHOSPHORUS GRUPPO CONTROLLO

38,28

CONTA VARROA FORZA FAMIGLIE NOSEMA E VIROSI



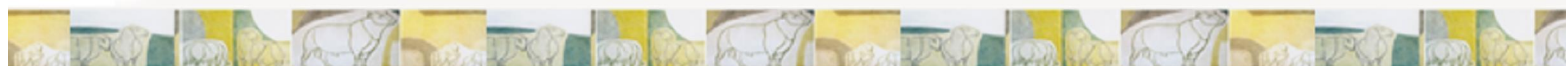
WP2: Impiego della Medicina Integrata con OE di Neem e OE di Origano spagna per il controllo delle parassitosi gastrointestinali nell'allevamento ovicaprino



WP2 criticità sanitarie

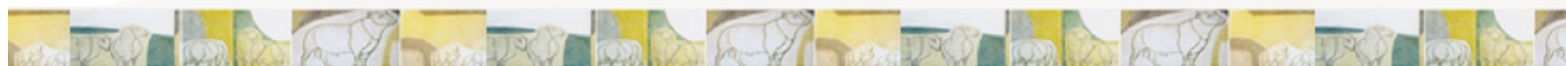
Strongilosi gastrointestinali (Strongilosi g.i.) sono malattie parassitarie estremamente diffuse nei ruminanti domestici e selvatici, ma la maggiore incidenza si verifica negli allevamenti ovicapri.

- É Problemi di sanità e benessere animale
- É Fenomeni farmaco-resistenza
- É Residui farmacologici negli alimenti di origine animale e nell'ambiente
- É Allevamenti biologici (terapia- tempi sospensione)



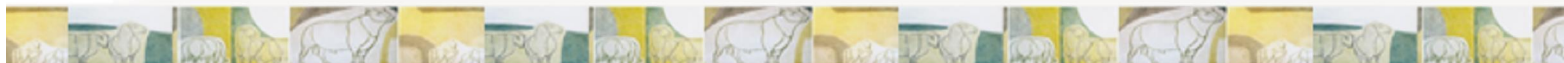
WP2 prove cliniche: obiettivi

- É Valutare efficacia Olio di Neem —————> enteroparassiti
azione nei confronti degli ectoparassiti e immunomodulante
- É Individuare molecole ad attività antiparassitaria con
elevata biodegradabilità, bassa tossicità, non residuare nei
tessuti escrezioni/escrezioni animali, facile reperibilità e
somministrazione
- É Predisporre protocolli terapeutici per allevamenti biologici



WP2 ATTIVITAØ

- É Ricerca bibliografica
- É Prove in vitro: Il disegno sperimentale ha previsto di testare gli OE mediante prove in vitro di efficacia,
- É per poter scegliere tra **Origano Spagna** e **Timo**.
- É Prove in vivo: Valutare direttamente in vivo l'efficacia di Olio di Neem e OE Origano spagna, nei confronti degli strongili g.i., dell'OE;
- É Protocolli terapeutici

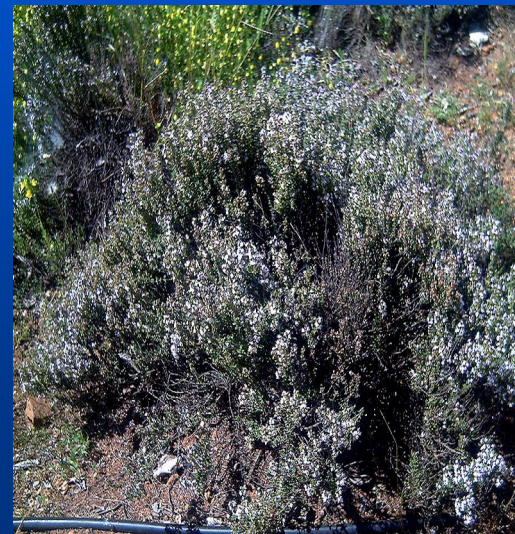


WP2 prove in vitro

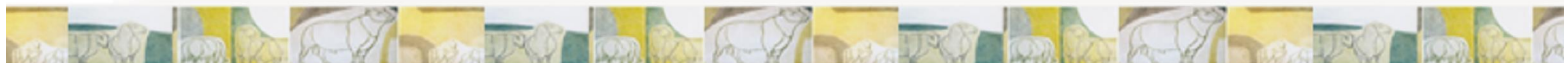
- É OE Origano spagna (*Coridothymus capitatus*): azione insetticida, antiossidante, fungicida, nematocida.
- É OE Timo (*Thymus vulgaris*): azione fungicida, antielmintica, antimicrobica.



Origano Spagna ó Corydothymus capitatus



Thymus vulgaris



WP2 Prove in vitro

Condotte secondo le linee guida della W.A.A.V.P. (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology):

É **Test di inibizione della schiusa** (EHT/EHA)

É **Test di inibizione dello sviluppo larvale** (dallo stadio L1/L2 allo stadio infettante L3) o LDT (larval development test)

É **Test di paralisi/mortalità larvale** o LMT (larval mobility/mortality test)).

Estratti testati: OE di Timo í í í í í . diluito al 50% con PBS
OE Origano spagna í í .. diluito al 50% con PBS.

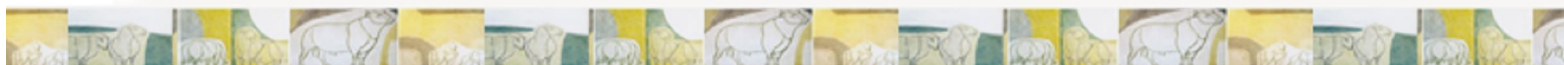
Metodologia

Controllo positivo: sospensione uova + Tiabendazolo (TBZ) diluito in acqua sterile (dose discriminante per nematodi ovini 0.02 µl/ml)

Controllo negativo: sospensione uova + acqua sterile

Concentrazioni utilizzate: diluizioni scalari 0.05; 0.1; 0.2; 0.3; 0.5 µl/ml

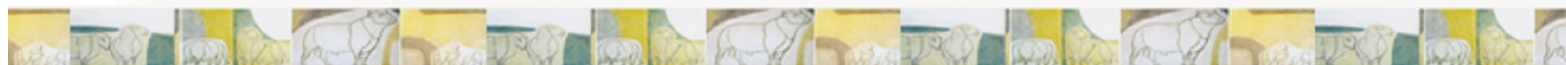
Per ciascuna diluizione sono state effettuate tre repliche.



WP2 Risultati prove in vitro

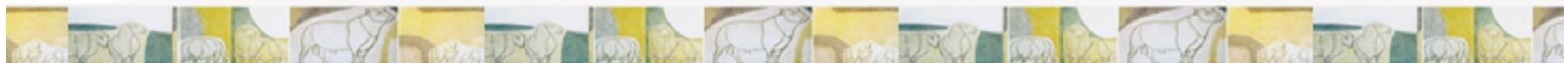
L'efficacia antelmintica nei test *in vitro*, valutata mediante test EHT, LDT e LMT, risulta migliore per il fitoterapico **OE Origano spagna** rispetto all'OE di Timo nelle diluizioni esaminate.

In particolare l'OE Origano Spagna alla diluizione 0.5 g/ml, si è dimostrato capace di inibire di schiusa delle uova, rispetto al controllo negativo, con valore del 37.9 %, mentre per l'OE di Timo la capacità è risultata inferiore (36.2 %). Anche per il test dello sviluppo larvale dallo stadio L1 allo stadio L3, l'OE Origano Spagna ha mostrato un valore di inibizione, rispetto al controllo negativo, del 38.6 %, mentre per OE di Timo è stato del 36.9 %. Il risultato per l'indice di mortalità/paralisi, rispetto al numero di larve presenti nella piastra, si attesta allo 0.054 confrontato al valore 0.051 dell'OE di Timo.



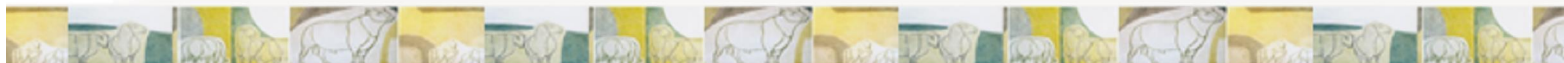
WP2 prove cliniche: protocollo sperimentale

- É I prodotti sono stati preparati da una ditta specializzata, sotto forma di mangime complementare minerale, a cui è stato aggiunto rispettivamente OE **Origano Spagna** alla concentrazione di 1000 mg/kg ed **Olio di Neem** alla concentrazione di 1000mg/kg.
- É Gruppo controllo, l'utilizzo dello stesso mangime complementare minerale, senza aggiunta degli oli essenziali da testare.
- É Somministrazione di **50 gr/capo** di mangime complementare, per otto giorni, ripetuto dopo 30gg.



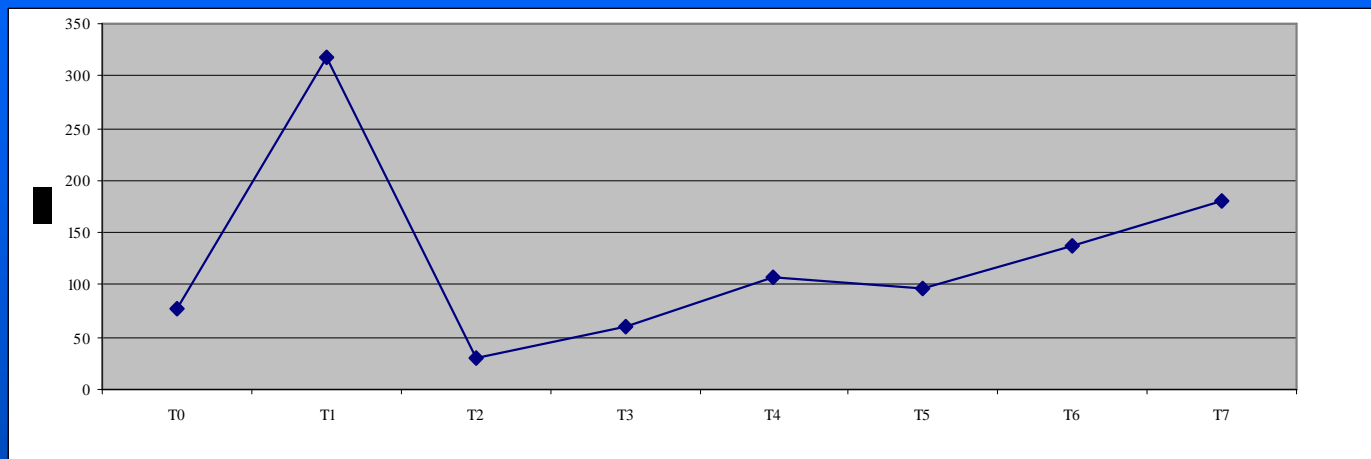
WP2 prove cliniche: protocollo sperimentale

- É N. 2 allevamenti
 - ↗ Capre Cashmere (Provincia di Siena)
 - ↘ Ovini a produzione latte (Provincia di Rieti)
- É Per ciascun allevamento individuati (randomizzazione semplice) n. 30 animali suddivisi in tre gruppi: A) gruppo neem, B) gruppo origano, C) gruppo controllo
- É Prelievo mensile individuale delle feci: (media di 3 prelievi/ die): esame McMaster
- É Prelievi ematici quadrimestrali: esami ematochimici (emocromo con formula, profilo epatico, profilo muscolare, protidogramma, antiossidanti totali, radicali liberi, aptoglobina, attività del complemento, battericidia, lisozima, zinco, CD4+ CD8+)
- É Valutazione ► efficacia: Mc Master + tecnica FERCT (fecal egg count reduction test)
$$\text{FERCT(\%)} = \frac{(\text{EpGpret} - \text{EpGpostt}) \times 100}{\text{EpGpret}}$$

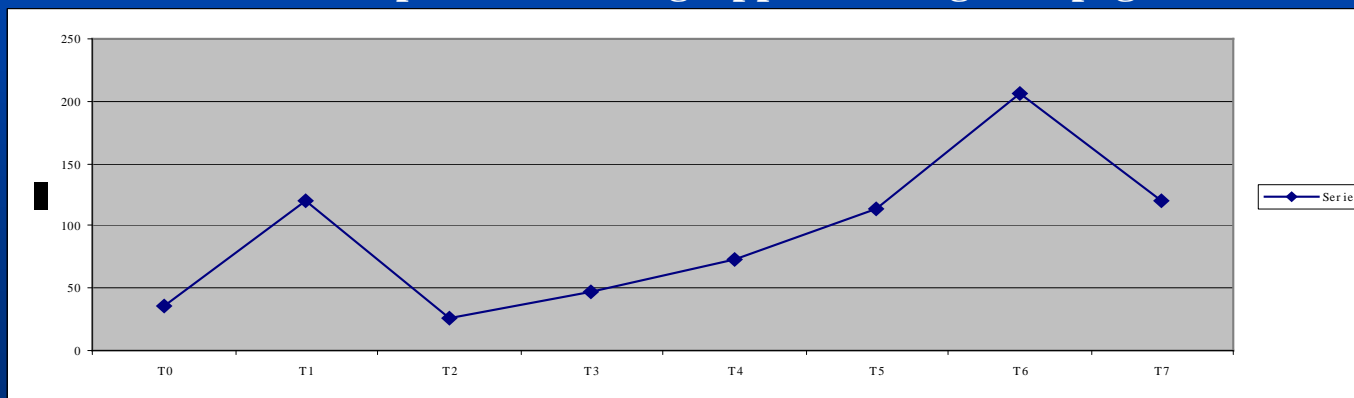


Risultati prov. Siena

andamento nel tempo delle medie gruppo olio di Neem

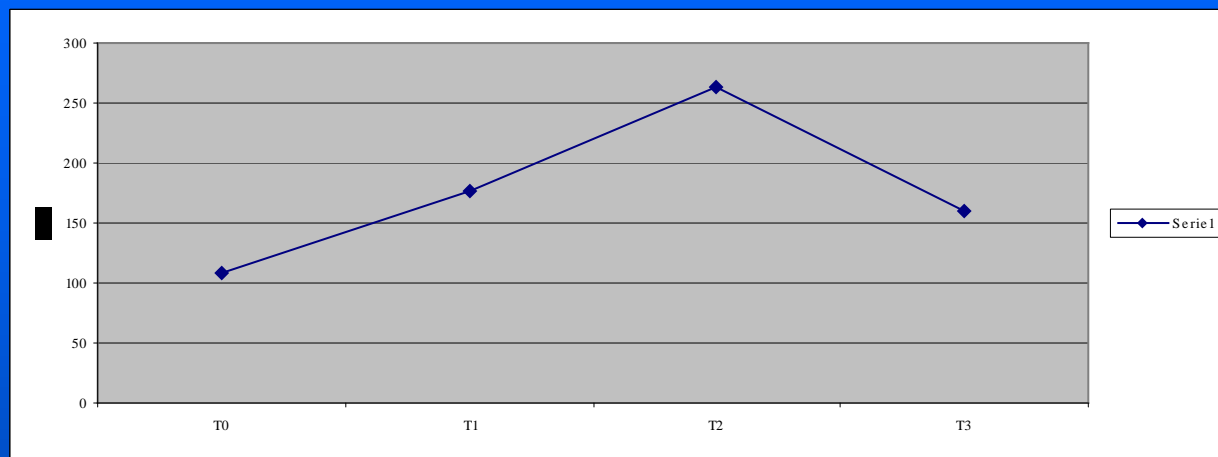


andamento nel tempo delle medie gruppo OE Origano Spagna

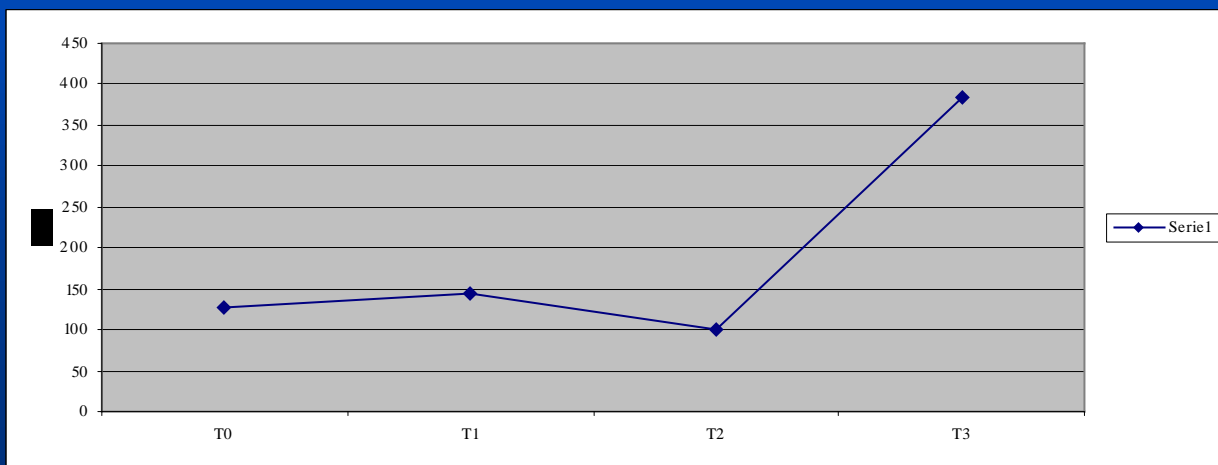


Risultati prov. Rieti

medie gruppo oliodi Neem



medie gruppo OE Origano Spagna



WP2 prove cliniche: risultati

Risultati non esaustivi

1. Basso dosaggio sia in termini di concentrazione del fitoterapico che errore nel rapporto quantità di mangime /peso animale
2. Eventuale metabolizzazione a livello del tratto digerente, soprattutto a livello ruminale, dei principi somministrati che potrebbero venire trasformati in metaboliti inattivi e diluizione dei principi, nella massa delle ingesta
3. Bassi livelli iniziali delle cariche parassitarie, per entrambe le aziende, potrebbero aver reso non facilmente evidenziabile un'eventuale riduzione significativa delle stesse.
4. La numerosità degli animali per gruppo, pur superiore al minimo di sei soggetti raccomandati da Vercruysse et al. (2001), potrebbe essere stata non sufficiente per dimostrare l'efficacia di antiparassitari derivanti da piante.
5. Ampia variabilità della composizione e del contenuto in principi attivi (anche di 100 volte), relativa alla specie botanica utilizzata
6. Non si può escludere che i diversi generi e specie di strongili g.i. (infestazioni poliparassitarie), presentino risposte diverse alle molecole testate e la presenza di infestazioni miste potrebbe aver reso includenti i risultati ottenuti.



Grazie per la vostra cortese attenzione

