

# La nosemiassi

Riconoscere e gestire le patologie delle api nel rispetto della sicurezza dei prodotti dell'alveare

*Roma, 9 ottobre 2013*

*Firenze, 11 ottobre 2013*



Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

## Nosemiasi o nosemosi

- Malattia denunciabile delle api adulte provocata da funghi unicellulari appartenenti alla classe dei *Microsporidi*, fam. *Nosematidi*, gen. *Nosema*
- Malattia contagiosa, denunciabile sostenuta da un protozoo neosporidio, dell'ordine dei *Microsporidi*, il *Nosema apis*
- Malattia delle api adulte dovuta ad un microsporidio, un fungo unicellulare

Alice Munn,<sup>2</sup> Maria Polyzoidou,<sup>2</sup> & Alexander Bell<sup>2</sup>

And 100 Percent Pure Aluminum

\* *For more information, contact Scott Lee, 800-441-2244, [www.leeandco.com](http://www.leeandco.com)*

附: 各章参考文献

www.elsevier.com/locate/jbiotec

	Controlled	Controlled for SES	Controlled for SES and SES <sup>2</sup>	Controlled for SES and SES <sup>2</sup> and SES <sup>3</sup>	Model with SES and SES <sup>2</sup>
<i>P. salinus</i>	+	+	ns	+	
<i>P. salinus</i> and <i>P. salinus</i> and <i>P. salinus</i>	+	+	+	+	ns
<i>P. salinus</i> and <i>P. salinus</i> and <i>P. salinus</i> and <i>P. salinus</i>	+	+	+	+	+
<i>P. salinus</i>	+	+	ns	ns	
<i>P. salinus</i> and <i>P. salinus</i>	+	+	ns	ns	

1a) *Spizella monticola* (L.) 400mm. (Age unknown) 1st June 1971 per gl.  
1b) *Spizella monticola* (L.) 400mm. (Age unknown) 1st June 1971 per gl.

© 2004 Blackwell Publishing Ltd *Journal of Internal Medicine* 255: 101–108

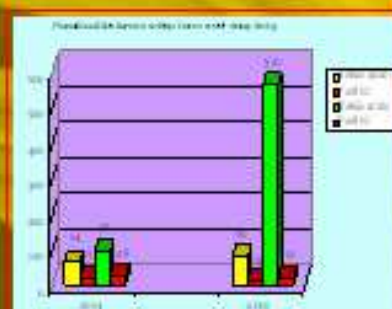
**-management, monitoring & verification of management actions** - **monitoring** = **spazio riforestazione**

- rendszeri költségvetés: 1000000000 forint, államháztartáson kívüli forrás: 0 forint, államháztartáson belüli forrás: 0 forint



2000/001 001

39 campioni di api appartenenti a 39 apiari nel 2004 e 51 campioni da 55 apiari nel 2005. Il contenuto di 39 addieni per campione diluito con un'eguale quantità di fisiologica è stato esaminato al microscopio ottico a 400X ed in caso di positività è stata eseguita la conta in camera di Bürker secondo la metodologia PRV.



## RESULTS

PI. presente negli anni 2004-2005 rispettivamente nel 29,7% (29,8% annuo) e 26% (3,8% annuo) dagli esperti

La ricerca di Nossima apia è risultata positiva nel 14% degli apieri in entrambi gli anni. Le aree colpite sono state nel 2004 e nel 2005 rispettivamente il 10% ed il 6%.



## CONCLUSIONI

L'incidenza di PA in provincia di Firenze è risultata in linea con precedenti indagini condotte nel territorio confermando che la metodica diagnostica adottata è risultata efficace per il controllo di questa malattia negli apiari. L'individuazione del limite critico di 3000 UFC/ml nel miele di nido è stato utile per valutare il reale rischio epidemico ed approntare interventi mirati basati sul miglioramento della gestione apistica senza dover ricorrere all'impiego di farmaci. Nel secondo anno di controllo questi interventi hanno ridotto la positività per PA alle metà negli apiari e a circa un decimo nelle arnie.

## DIFFERENTIALS

## **Peste americana e Nosemiasi in provincia di Firenze**

Giovannelli Licia<sup>1</sup>, Franco Corrias<sup>2</sup>, Giovanni Brajon<sup>2</sup>, Massimo Mari<sup>2</sup>, Alice Piazza<sup>2</sup>, Ilaria Paladini<sup>2</sup> e Alessandra Belli<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Azienda Sanitaria Locale USL 10 Firenze, Zona Mugello

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

### ***Obiettivo***

Aggiornare l'incidenza di Peste Americana (PA) e Nosemiasi (NA) in provincia di Firenze e proporre strategie di prevenzione che tengono conto di un ridotto impiego dei farmaci convenzionali.

### ***Materiali e metodi***

Sono state controllate per PA 96 arnie appartenenti a 64 apiari nel 2004 e 561 arnie da 81 apiari nel 2005.

Da ogni arnia è stato prelevato un campione di miele di nido per la ricerca di *Paenibacillus larvae* (PL) mediante semina diretta su agar sangue. Se la ricerca di PL ha evidenziato presenza di spore superiori a 1000 UFC/ml, l'arnia è stata considerata esposta a futuri sviluppi di malattia. Al fine di evitare lo sviluppo di sintomatologia e le conseguenti misure, sono state suggerite migliorie di allevamento di tipo igienico sanitario quali ricambio della cera e delle arnie, disinfezioni più frequenti, produzioni di sciami nuovi. La ricerca di NA con esame microscopico è stata effettuata su 39 campioni di api appartenenti a 29 apiari nel 2004 e 181 campioni da 55 apiari nel 2005.

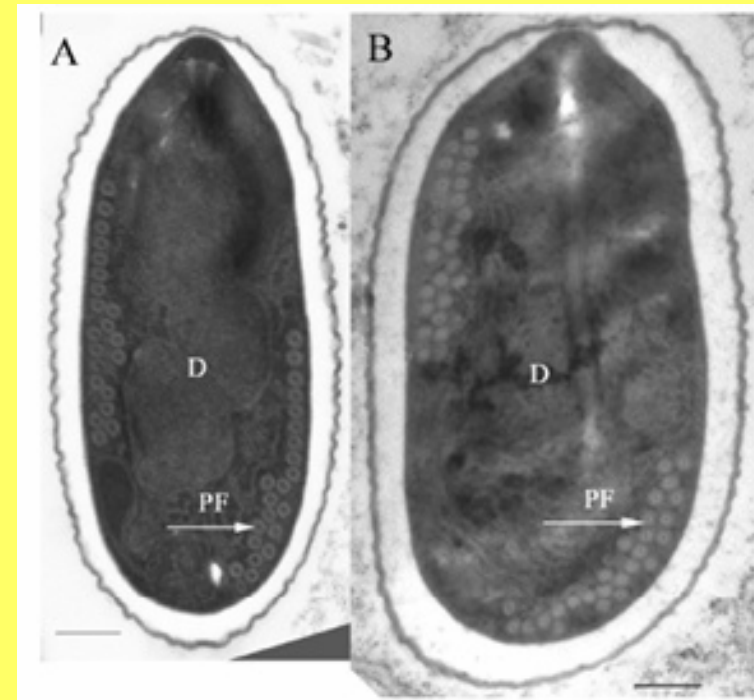
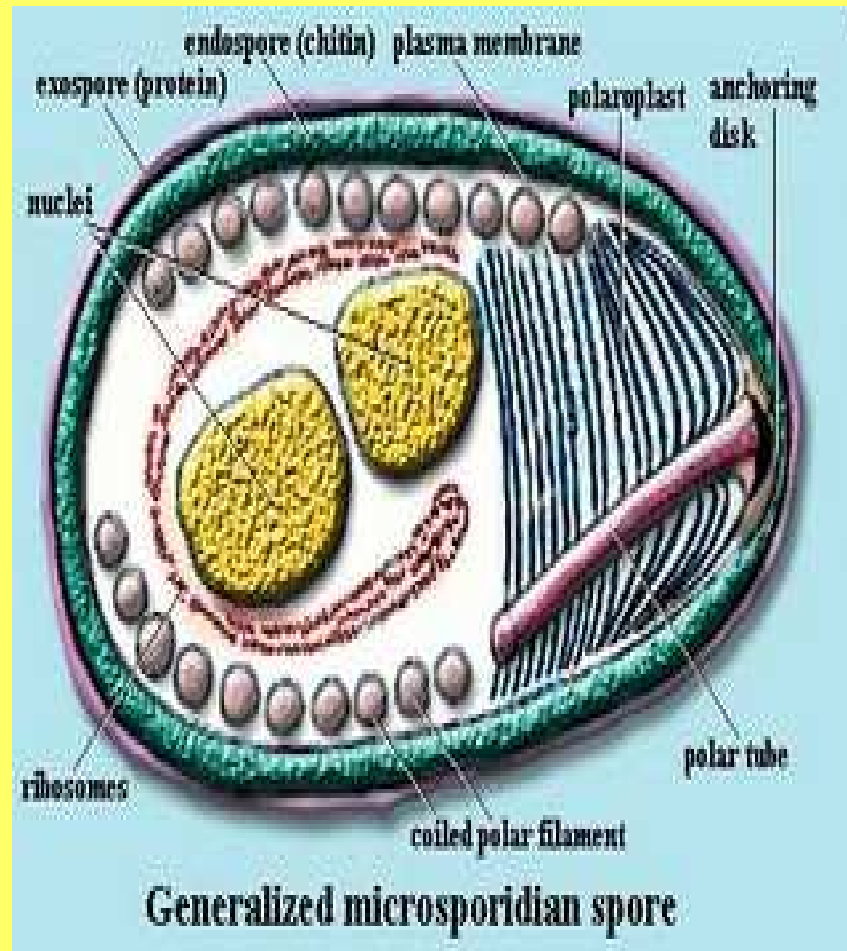
Le arnie e gli apiari sono stati scelti con criterio randomizzato mediante stratificazione della distribuzione per comuni di appartenenza e sono stati significativi rispetto ai dati relativi al censimento degli impianti in provincia di Firenze.

# Microsporidio

- Parassita, intracellulare obbligato di molti insetti e altri invertebrati, si diffonde attraverso spore e possiede strutture che gli consentono di penetrare nelle cellule ospiti (filamenti polari)



# Microsporidio



# Microsporidio

- Nosema vive e si moltiplica nelle cellule epiteliali del tubo digerente delle api adulte, non vengono colpiti gli stadi larvali, le api regine in minima parte.



# Generalità

Regno **Funghi**

Classe **Microsporidia**

Genere **Nosema**

***Nosema  
apis***

(Zander, 1909)

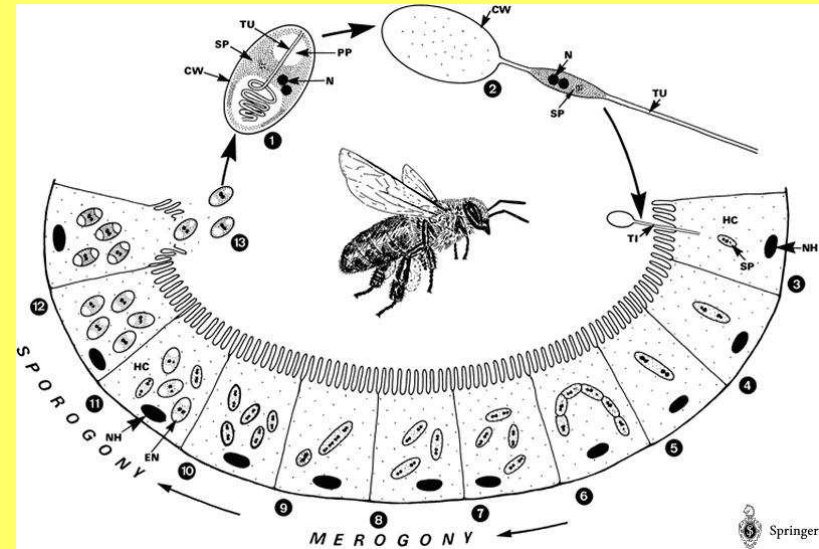
***Nosema  
ceranae***

(Fries *et al.*, 1996)

(Higes *et al.*, 2006)

*Apis  
mellifera*

*Apis cerana*



# Nosema spp.

- *Nosema apis*, noto da oltre un secolo, distribuito ovunque.
- *Nosema ceranae*, 1994 comparsa in Cina in *Apis cerana*. Sperimentalmente infettiva anche in *apis mellifera*, nel 2006 fu identificata in Spagna e da lì presto anche nel resto d'Europa.
- *Nosema bombi*

# patogenesi

- Le spore sono presenti anche e soprattutto nelle deiezioni
- La diffusione ad altre api e la germinazione nel lume intestinale sono molto estese
- La mucosa e le funzioni digestive sono compromesse

# contagio

- Propagazione nell'alveare con gli escrementi per via orale al resto della popolazione
- Diffusione da alveare e da apiario attraverso saccheggio, utilizzo miele contaminato come alimento, strumenti e attrezzi infetti, cambiamenti di arnia dei maschi, deriva delle operaie
- Regine infette

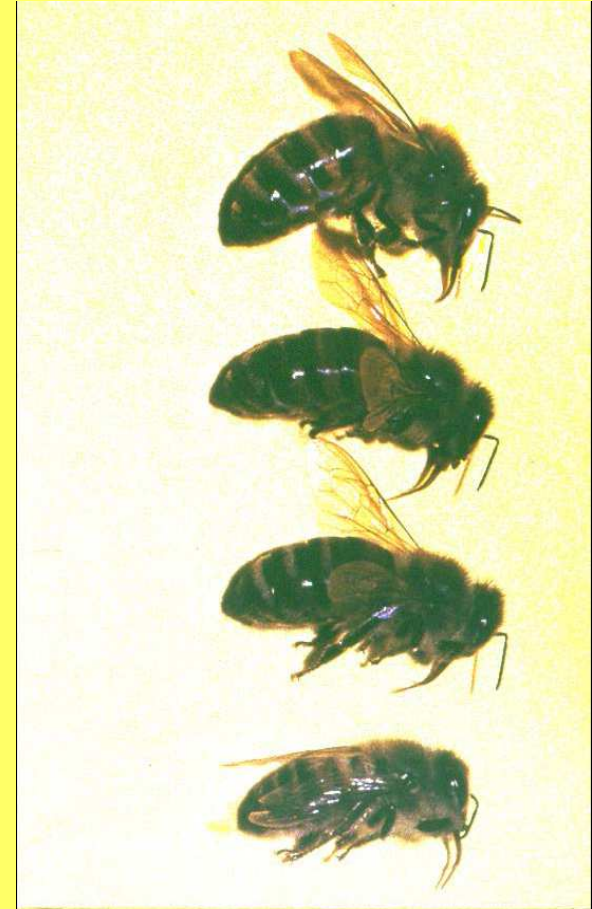
# Contagio - spore

- Si conservano tanto più a lungo quanto più la temperatura è bassa, da alcuni giorni fino a cinque anni
- Nelle feci diarroiche fino a due anni
- In acqua a 60°C pochi minuti
- Nel suolo fino 70 giorni
- Nel miele da uno-due mesi fino un anno

# sintomatologia

- Disturbi intestinali, diarrea
- Predellini imbrattati
- Appaiono mortalità, spopolamenti, andamenti incoordinati. Attività principali vengono interrotte gradualmente
- Addomi gonfi, molli, ali deformi e zampe retratte
- Associazione di virosi



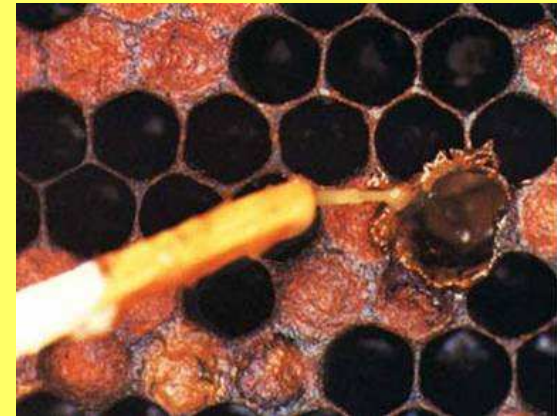


# Diagnosi

- Clinica-sintomatologica
- Laboratorio, microscopia ottica  
identificazione/conta spore
- Laboratorio, biologia molecolare
- Corretto ed adeguato campionamento

## ANALISI DI LABORATORIO

- Ispettive
- Microscopiche
- Colturali
- Molecolari
- Chimiche



# ELEMENTI DIAGNOSTICI



Mesointestino  
biancastro, dilatato e  
ripieno di materiale  
acquoso

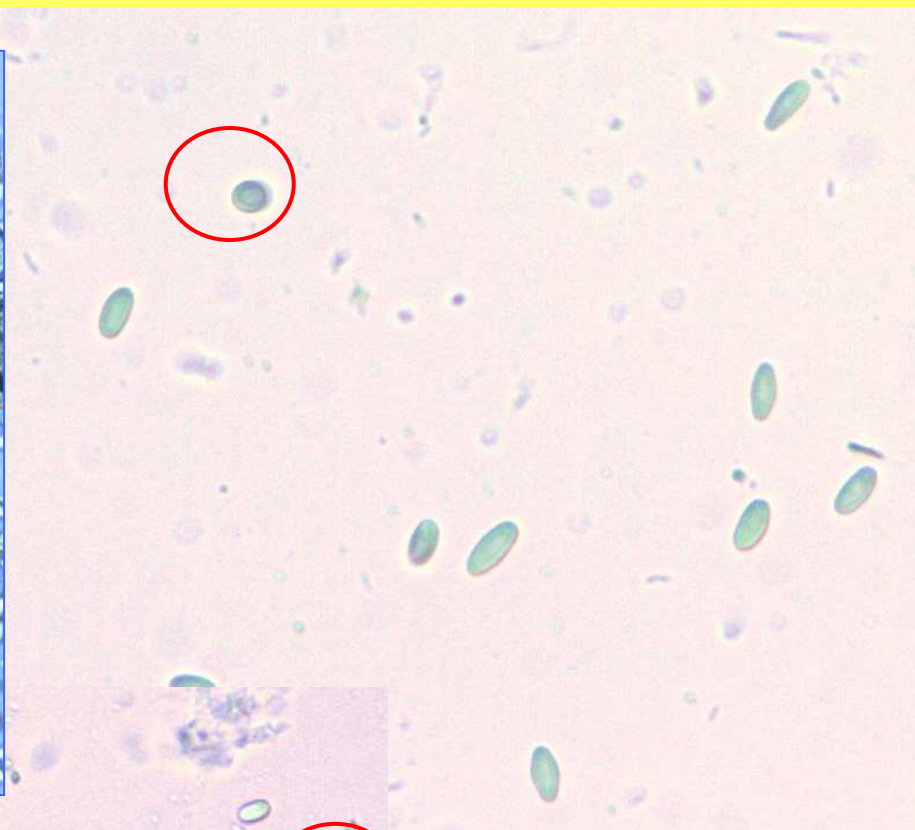
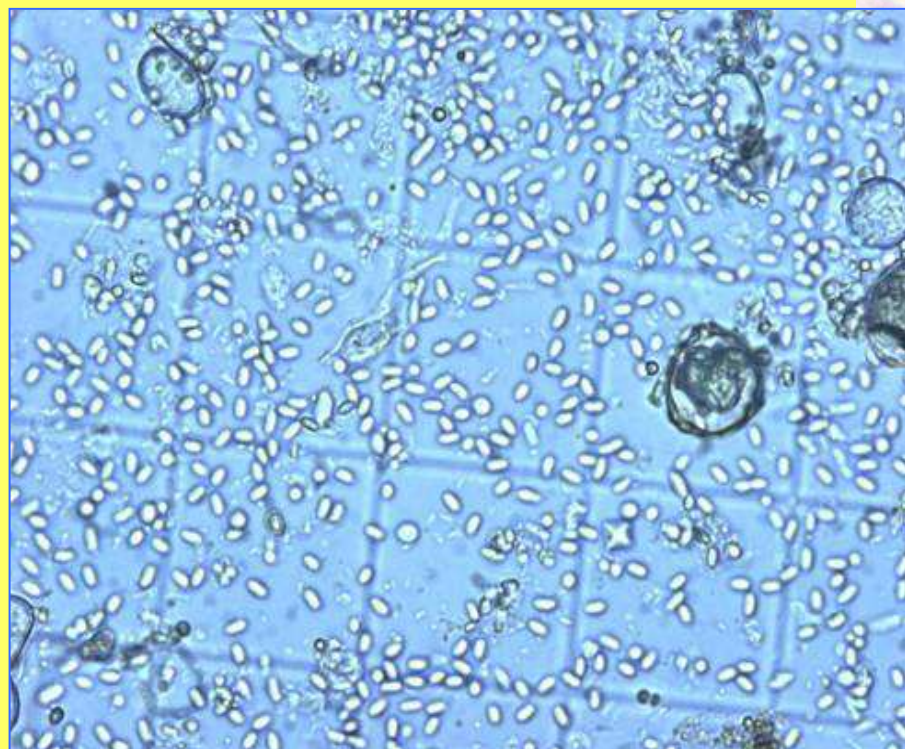


- Diagnosi clinica difficoltosa

- Presenza di feci diarroiche sui telaini o all'entrata dell'alveare
- Api con addome dilatato
- Api morte o malate nelle vicinanze dell'alveare
- Diminuzione della covata e delle dimensioni della colonia, soprattutto in primavera
- Spopolamento progressivo senza rilievo di api morte (lontano dall'alveare)

**NOSEMA  
APIS**

**NOSEMA  
CERANAE**

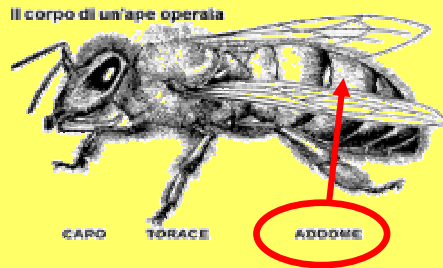


# CAMPIONAMENTO

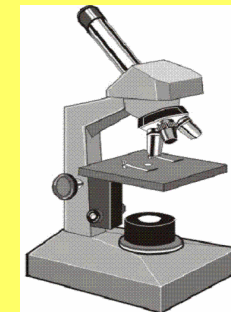
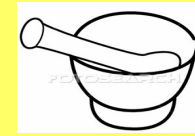
- prelevare almeno 30 api bottinatrici, preferibilmente all'ingresso dell'alveare in un barattolo o sacchetto presto/chiuso
- conservare a T<sup>a</sup> di congelamento fino all'arrivo in laboratorio



# ANALISI DI LABORATORIO - nosemiasi



addomi  
+  
acqua



**Ingrandimento**  
400x

20 addomi + 20ml di acqua



**Camera Contaglobuli di Burkert**

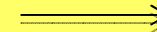
**Numero spore/ape**

# ESAME MICROSCOPICO

## allestimento del campione



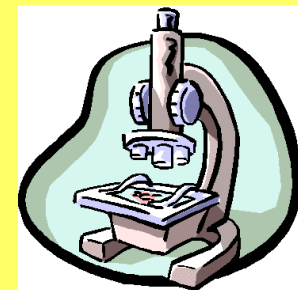
Separare almeno 20 addomi dai toraci



Omogeneizzare con H<sub>2</sub>O distillata



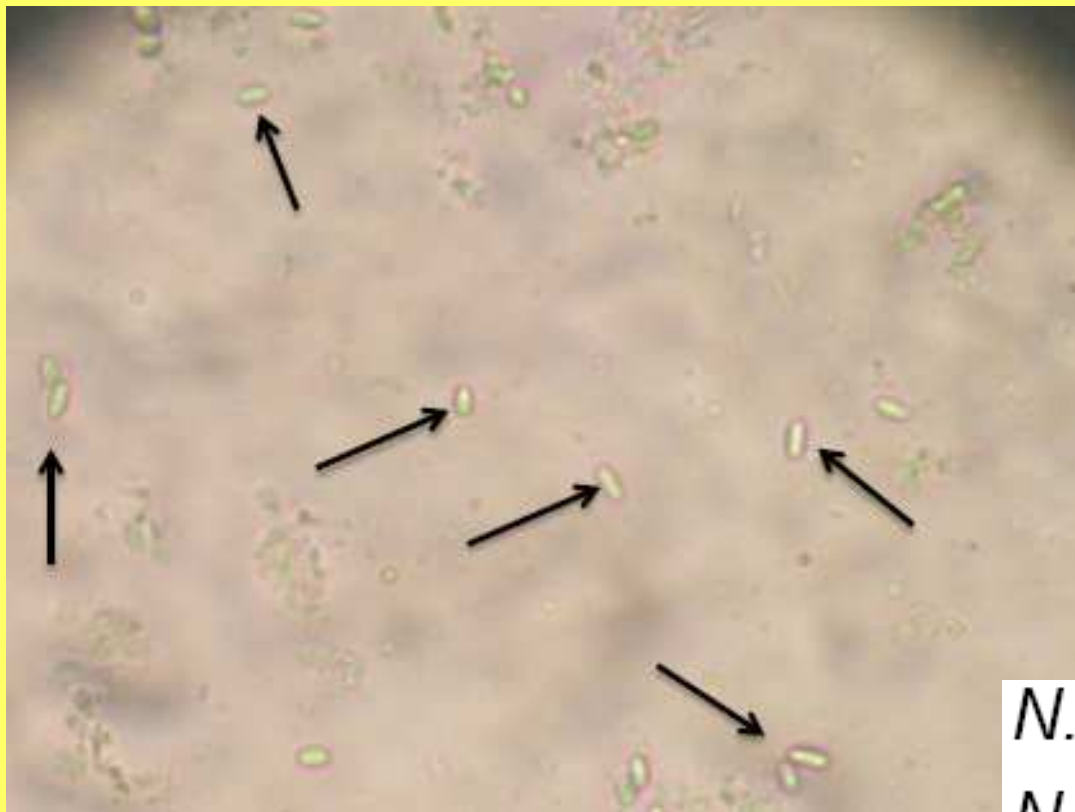
Porre una goccia su vetrino con copri-oggetto



ANALISI DI LABORATORIO - noseмиasi

# Esame microscopico

Presenza/assenza *Nosema spp.*

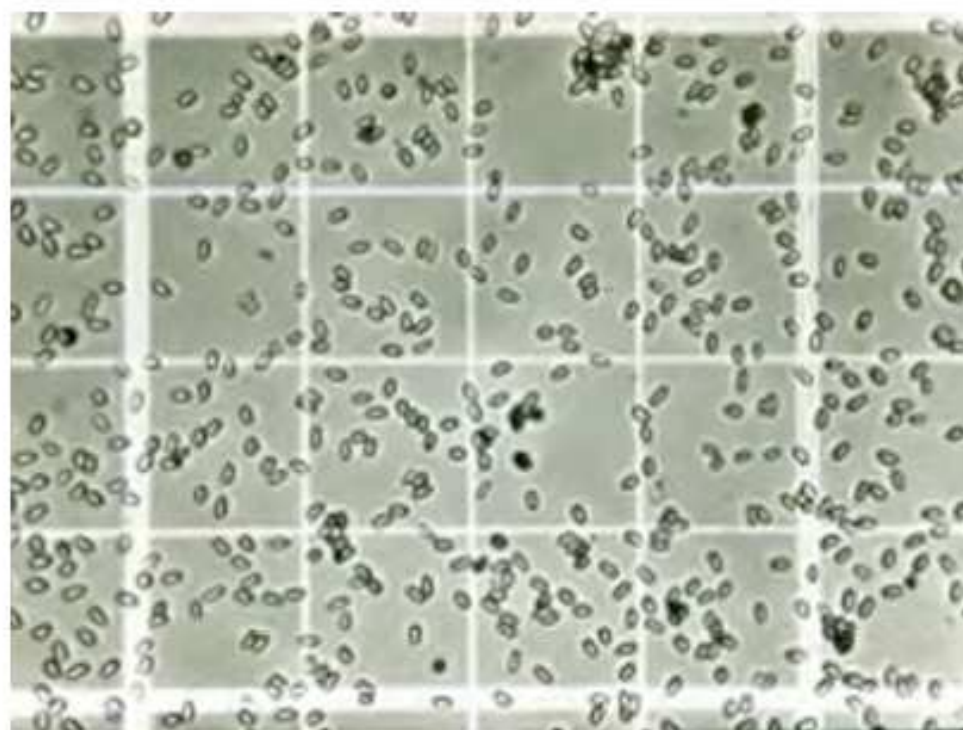


Ovali, rifrangenti  
400x

*N. ceranae*: 4,4  $\mu\text{m}$  x 2,2  $\mu\text{m}$

*N. apis* : 6  $\mu\text{m}$  x 3  $\mu\text{m}$

## Conta spore di *Nosema spp.*



Camera di Burkner

### **LIVELLI DI INFEZIONE**

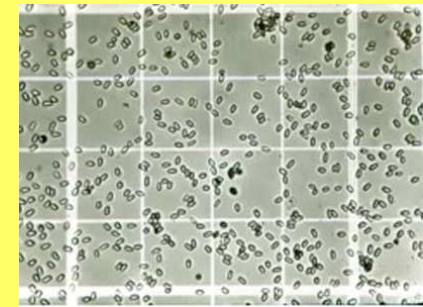
**BASSO:** < 100.000 spore/ape

**MEDIO:** tra 100.000 e 1 milione spore/ape

**ALTO:** > 1 milione spore/ape

# ESAME MICROSCOPICO

## conta delle spore



- PROTOCOLLO

- omogeneizzare almeno 20 addomi di api operaie adulte mediante pestello con l'aggiunta di 1 ml di H<sub>2</sub>O distillata per addome  
Lettura mediante Camera di Burker



N°spore medio per quadrato x 250000  
=  
**Numero spore *Nosema spp.*/APE**

Sensibilità pari a 10.000 spore/ape

### LIVELLI DI INFEZIONE

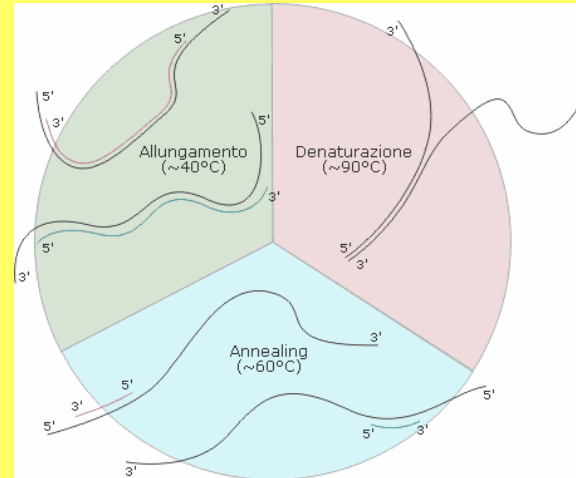
- BASSO**: < 100.000 spore/ape
- MEDIO**: tra 100.000 e 1 milione spore/ape
- ALTO**: > 1 milione spore/ape

# TECNICHE BIOMOLECOLARI



Estrazione Acidi Nucleici

Amplificazione Acidi Nucleici



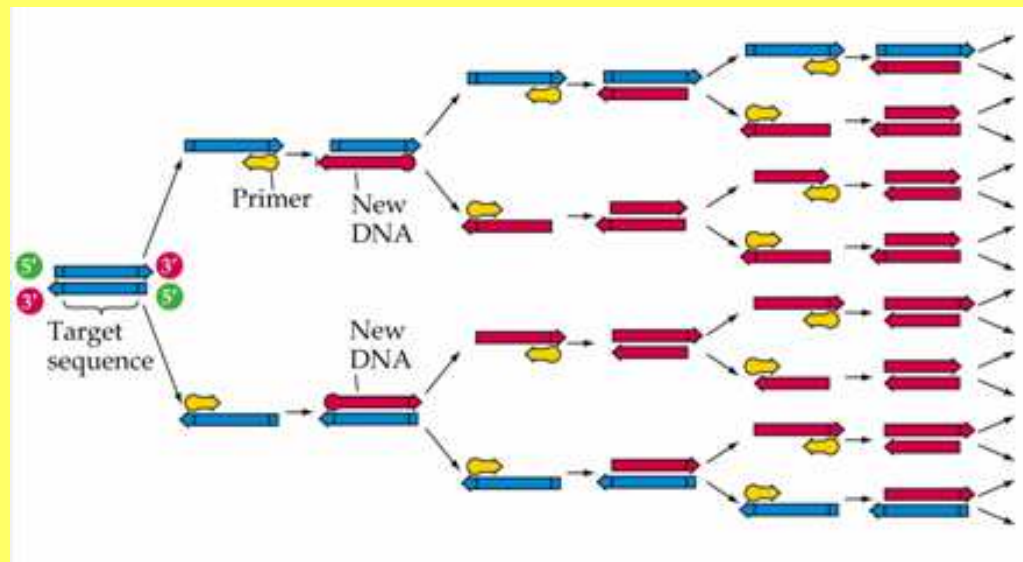
Controllo dell'amplificato  
mediante gel elettroforesi



Digestione Enzimatica

# TECNICHE BIOMOLECOLARI

Esistono diversi protocolli di Polymerase Chain Reaction (PCR) in grado di distinguere i due microsporidi patogeni per *Apis mellifera*



Presenza/assenza  
*Nosema ceranae/apis*

# TECNICHE BIOMOLECOLARI

Digestione enzimatica

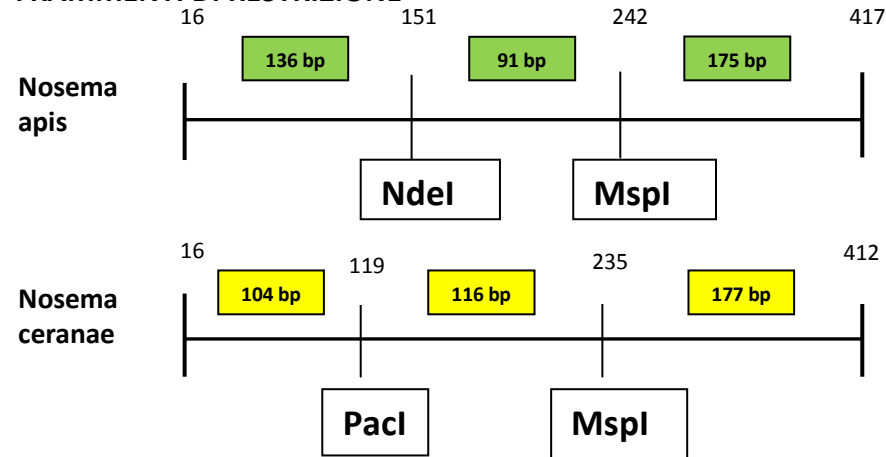
(Klee *et al.*, 2007)

PCR

Primer	Sequenza Nucleotidica
SSU-res-f1	5'- GCC TGA CGT AGA CGC TAT TC - 3'
SSU-res-r1	5'- GTA TTA CCG CGC CTG CTG G - 3'

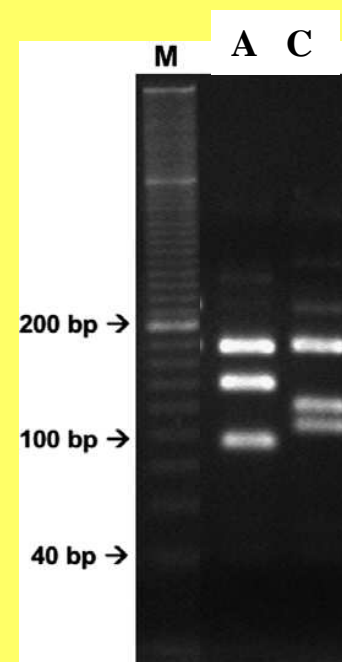
RFLP  
(Restriction Fragment Length Polymorphism)

## FRAMMENTI DI RESTRIZIONE



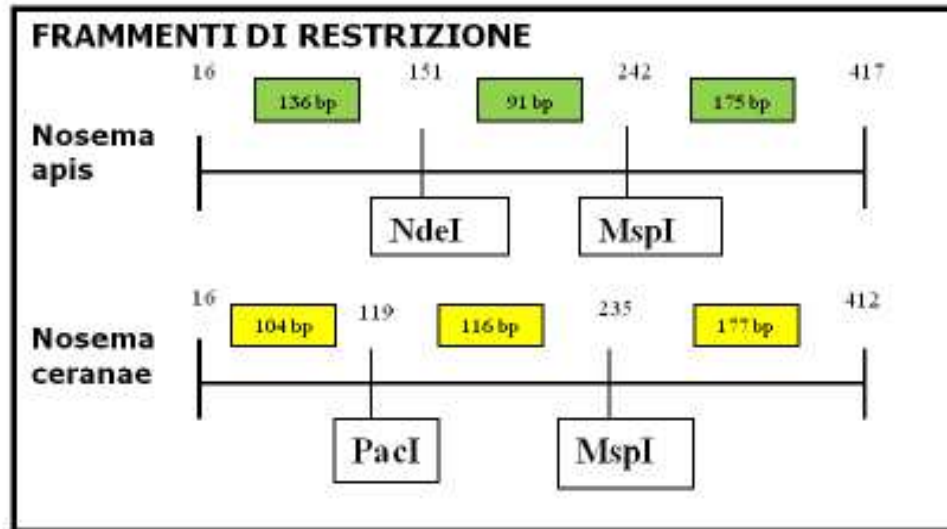
417 bp *N. apis*

412 bp *N. ceranae*



Distinzione  
*Nosema ceranae/apis*

- **PCR - RFLP** (Klee et al., 2007; Tapaszti et al., 2009)



- **Real-Time PCR**

(Cox-Foster et al., 2007; Chen et al., 2009; Bourgeois et al., 2010)

- **Uniplex PCR** con primer specie specifici (Chen et al., 2008)

- **Multiplex PCR** (Martin-Hernandez et al., 2007) raccomandato dall'OIE

# Malattie denunciabili delle api

(DPR 320/1954- RPV)

1. Peste europea
2. Peste americana
3. **Nosemiasi**
4. Acariasi
5. Varroatosi (O.M 21/4/1983 e OM 17/2/1995)
6. Aethinosi e Tropilaelapsosi  
(O.M. 20/04/2004)

# Misure previste dal RPV

## Art 154

- Sequestro apiario
- Divieto di movimentare api, arnie e materiale
- Divieto di asportare il miele e cera se non sterilizzati
- Divieto di ripopolamento se non previa disinfezione
- sono sospetti tutti gli apiari presenti nel raggio di 3 km (raggio di volo)

## **Art 155**

- Per Peste americana e europea :
  - se malattia allo stadio iniziale possibili trattamenti curativi
  - in alternativa distruzione delle arnie infette e delle famiglie
  - l'apiario trattato deve essere sottoposto a esami di controllo sino a risanamento accertato

## **Art 156**

- Anche per Nosemiasi e acariasi gli apiari infetti o sospetti possono essere sottoposti a opportuni trattamenti curativi



## Ministero della Salute

DIPARTIMENTO DELLA SANITA' PUBBLICA VETERINARIA, DELLA SICUREZZA  
ALIMENTARE E DEGLI ORGANI COLLEGIALI PER LA TUTELA DELLA SALUTE  
DIREZIONE GENERALE DELLA SANITA' ANIMALE E DEI FARMACI VETERINARI

Ufficio II ex DGSA - Sanità animale ed anagrafi:  
Viale Giorgio Ribotta, 5 - 00144 Roma

Registro - classif:  
Allegati:

OGGETTO: Regolamento di polizia veterinaria- misure per nosemiasi.

Ministero della Salute

DGSA

0017114-P-01/10/2011



94885996

Regioni e Province autonome  
Assessorati alla sanità

Servizi veterinari  
e.p.c.  
Centro di riferimento per le malattie  
delle api  
IZS -Padova

Premesso quanto sopra questa Direzione ritiene che le misure previste dal RPV per la nosemia siano da applicarsi solo nei casi di *Nosema apis* clinicamente manifesta e non nei casi di *Nosema ceranae*.

Per quanto concerne infine la gestione degli apiari colpiti da *Nosema ceranae* il Centro di riferimento consiglia l'adozione di corrette pratiche apistiche e l'utilizzo di particolari integratori alimentari che possono essere d'aiuto nel ridurre la carica intestinale di spore.

La presenza di *Nosema* spp. non deve essere considerata come diagnosi di malattia, se non accompagnata da sintomi clinici evidenti



Non sempre di facile rilievo nelle infezioni causate da *N.ceranae*

Individuare alveari malati tempestivamente



Intervenire subito per contenere la malattia all'interno della famiglia



Prevenire diffusione della malattia in apiario

# *Nosema ceranae:* come intervenire

**BPA**



**La fumagillina non è più in commercio in Italia dal 01/01/2002.**

**In passato si utilizzata a scopo “preventivo” in autunno ed a fine inverno.**

**Oggi, la fumagillina è autorizzata in UK. E' stata autorizzata solo in via temporanea in Spagna (2002-2008) e Slovenia (2010).**

# terapia

- Pur essendo malattia il cui agente patogeno è ben noto, è condizionata da numerosi fattori esterni, quali clima e andamento stagionale.
- Condizioni favorenti la malattia sono estati fredde e piovose, siccità, umidità, altre malattie
- Farmaci non consentiti, comunque ininfluenti sulle spore
- Timolo aggiunto alla dieta inibisce sviluppo di funghi e spore
- BPA

## **Buone Pratiche Apistiche (BPA)**

1. Corretto posizionamento degli apiari (postazioni soleggiate ed asciutte d'inverno) e degli alveari (orientati a sud-est);
2. rispettare le generali regole di igiene (soprattutto per la pulizia e disinfezione delle arnie prima di riutilizzarle per una nuova famiglia);
3. evitare di spostare telaini tra famiglie diverse;

- 4) evitare di somministrare miele o polline alle api (preferire candito, amido di mais, etc.);
- 5) sostituire le api regine ogni 2 anni;
- 6) sostituire i 3-5 telaini/alveare/anno;
- 7) somministrare in autunno ed a fine inverno/primavera mangimi adeguati quali: Api Herb o Vita Feed Gold.