



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

Roma - Firenze 9 - 11 ottobre 2013

«LE MALATTIE PESTOSE DELLE API» La Peste Americana

Stefano Bassi

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia
e dell'Emilia Romagna (Sezione di Modena)*

Peste Americana

Indice

- ❑ *Aspetti generali*
- ❑ *L'agente etiologico*
- ❑ *Patogenesi e Trasmissione*
- ❑ *Diagnosi*
- ❑ *Profilassi e Controllo*



Peste Americana

- ❑ Malattia batterica causata da *Paenibacillus larvae*
- ❑ Colpisce solo gli stadi larvali e le pupe di *Apis mellifera* e degli altri insetti del genere *Apis*
- ❑ Si può manifestare in qualsiasi periodo dell'anno in cui c'è covata
- ❑ *E' altamente contagiosa*
- ❑ *E' in grado di portare al collasso e alla morte l'intera famiglia*



Peste Americana

- ❑ E' la più grave e diffusa malattia batterica della covata ed è presente ovunque si pratica l'apicoltura
- ❑ Provoca considerevoli danni economici diretti e indiretti
- ❑ Malattia soggetta a denuncia. Non prevista la notifica dei focolai alla Commissione Europea



Focolai di P.A. anni 2006 - 2011 in alcune Regioni italiane

PESTE AMERICANA		Anno 2006	Anno 2007	Anno 2008	Anno 2009	Anno 2010	Anno 2011	Totale
	Regione Lazio	11	16	7	9	13	6	62
	Regione Toscana	4	3	9	5	11	3	35
	Regione Lombardia	6	1	0	3	14	24	48
	Regione Emilia Romagna	1	1	7	5	9	12	35
	Regione Puglia	1	0	0	0	0	0	1
	Regione Campania	0	0	0	0	0	0	0
	Regione Veneto	0	0	0	0	0	0	0

Dott. M. Pietropaoli (2012)



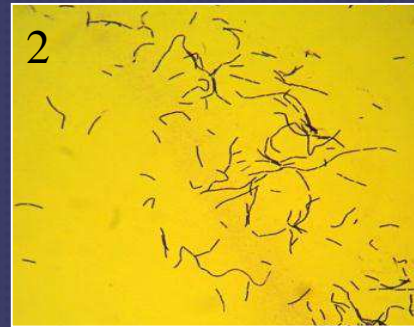
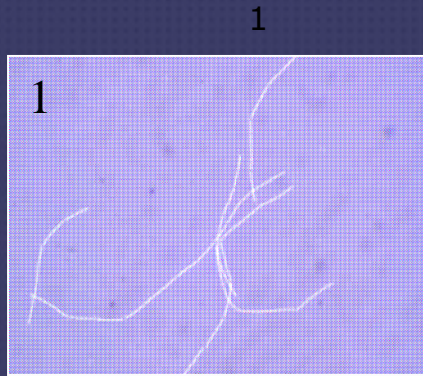
Eziologia

- ❑ *Paenibacillus larvae* (Genersch et. al. 2006)
- ❑ Isolato da G.F.White nel 1903 (*Bacillus larvae*)
- ❑ Bacillo Gram + sporigeno
- ❑ Il ciclo biologico comprende due fasi:
 - forma vegetativa
 - spora



Paenibacillus larvae

Forme vegetative

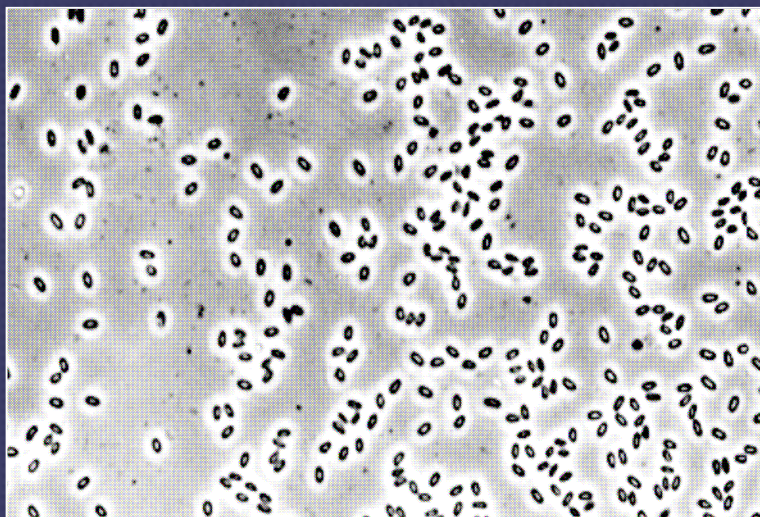


- ❑ Bacilli sottili di dimensioni piuttosto variabili ($0,4 - 0,6 \mu\text{m}$ x $1,5 - 6 \mu\text{m}$)
- ❑ Si presentano in forme singole, in catene o filamenti
- ❑ Mobili per presenza di flagelli peritrichi
- ❑ Abbastanza labili



Paenibacillus larvae

Spore

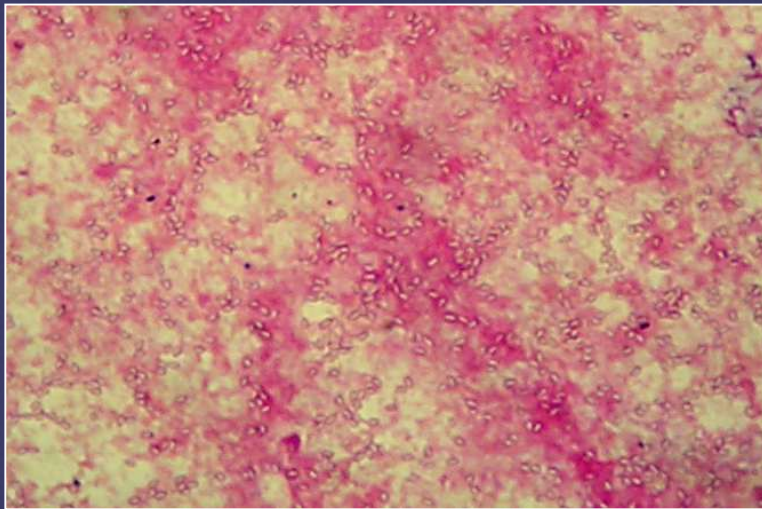


- ❑ Forma ovale, 1.3 x 0.6 μm
- ❑ Rappresentano la forma di resistenza del germe e di propagazione della malattia
- ❑ Solo le spore sono in grado di infettare le larve e causare la malattia
- ❑ Estremamente resistenti al calore, ai raggi UV, all'essiccamento e agli agenti chimici



Paenibacillus larvae

Spore



- ❑ Sopravvivono e possono rimanere infettanti per alcuni decenni (35 – 40 anni)
- ❑ Sono sufficienti meno di 10 spore per infettare e uccidere una larva di 12 – 36 h
- ❑ Nelle larve morte le spore sono presenti in numero elevato (2 - 3 miliardi di spore per larva)



Classificazione attuale anno 2006

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2006), 56, 501–511

DOI 10.1099/ijs.0.63928-0

Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation

Elke Genersch,¹ Eva Forsgren,² Jaana Pentikäinen,³ Ainura Ashiralieva,¹ Sandra Rauch,¹ Jochen Kilwinski⁴ and Ingemar Fries²

Correspondence
Elke Genersch
elke.genersch@rz.hu-berlin.de

¹Department of Molecular Microbiology, Institute for Bee Research, Friedrich-Engels-Str. 32, D-16540 Hohen Neuendorf, Germany

²Department of Entomology, Swedish University of Agricultural Sciences, Box 7044, SE-75007 Uppsala, Sweden

³National Veterinary and Food Research Institute, PL 92, FIN-70701 Kuopio, Finland

⁴Staatliches Veterinäruntersuchungsamt Arnsberg, Zur Taubeneiche 10-12, D-59821 Arnsberg, Germany

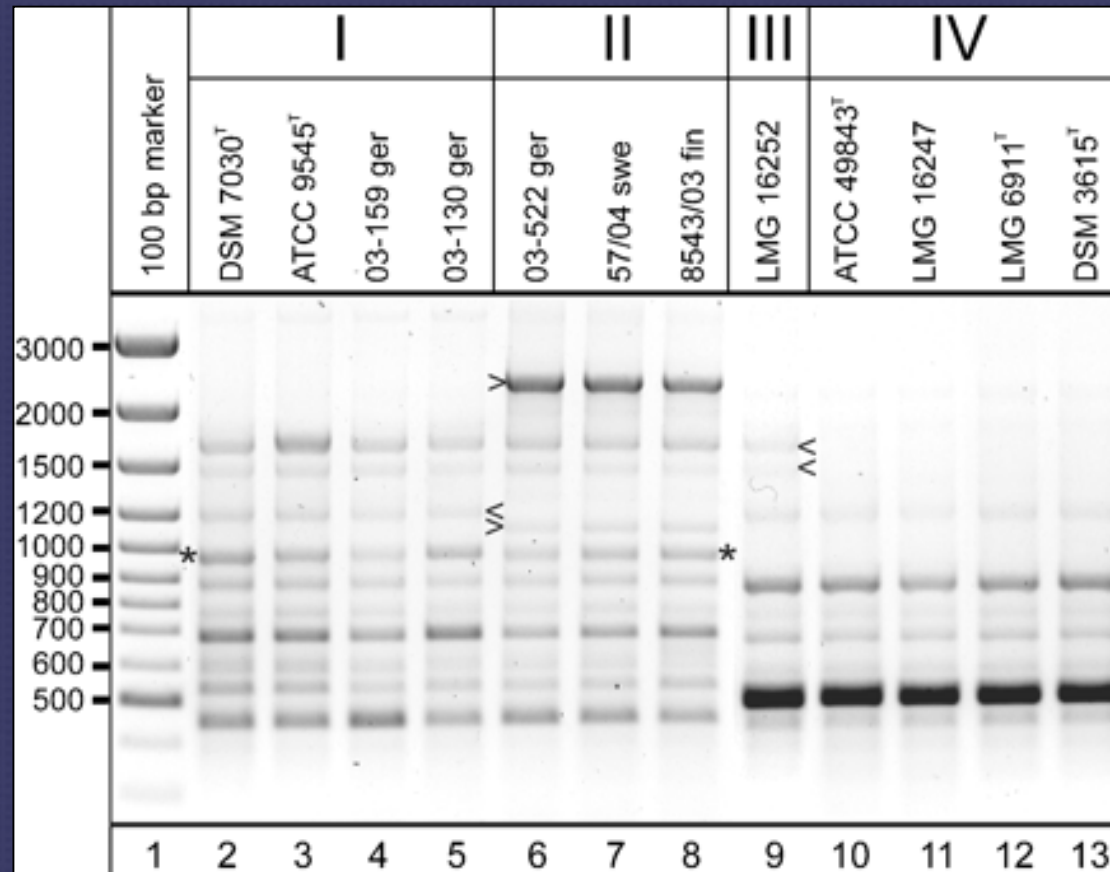


Genotipi Paenibacillus larvae

- ❑ Le prove di caratterizzazione genetica, eseguite con tecniche biomolecolari diverse, evidenziano la presenza di differenti genotipi
- ❑ Mediante rep-PCR con impiego di *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC) *primers* (ERIC1R/ERIC2) è possibile comprendere tutti i ceppi di *P.larvae* in 4 genotipi (genotipi ERIC)



Paenibacillus larvae: genotipi ERIC



E. Genersch, E. Forsgren, J. Pentikäinen, A. Ashiralieva, S. Rauch, J. Kilwinski and I. Fries
 - *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56 (2006), 501-511

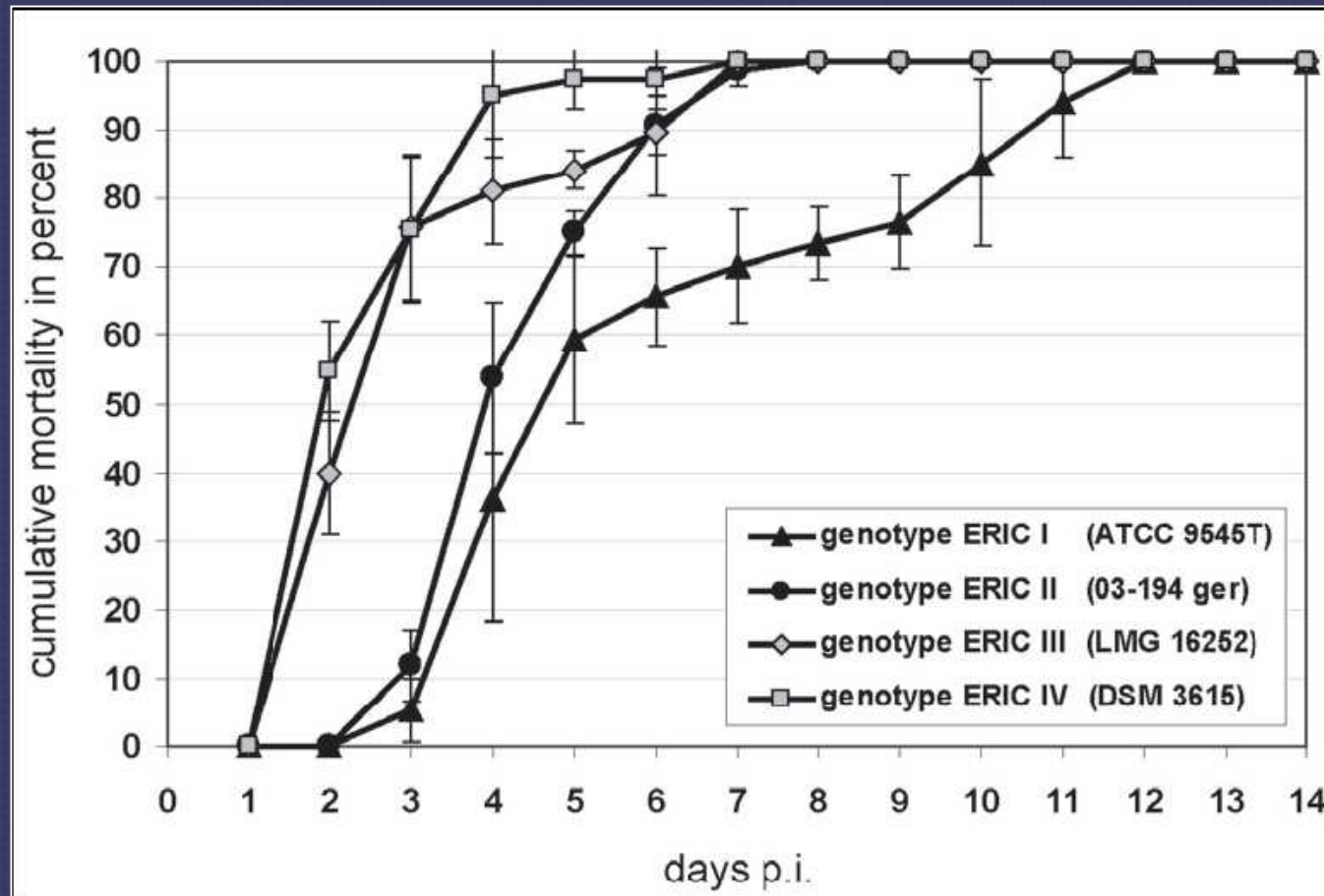


Caratteristiche fenotipiche dei genotipi ERIC

Genotipo	ERIC I	ERIC II	ERIC III	ERIC IV
Pigmentazione colonie	no	sì	sì	no
LT₁₀₀	12 -13 gg	5-7 gg	5-7 gg	5-7 gg



Decorso dell'infezione (LT 100)



Epidemiologia

- ❑ I dati sulla prevalenza e la distribuzione spaziale dei diversi genotipi sono scarsi
- ❑ In Europa esistono dei dati solo per alcuni Paesi (Germania, Svezia, Austria, Finlandia, Italia e Romania)
- ❑ In questi Paesi circolano i genotipi ERIC I e ERIC II



Epidemiologia



XIII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. - Trani, 12-14 Ottobre 2011

PRESENZA DI *Paenibacillus larvae* GENOTIPO ERIC II IN ITALIA. DIFFERENZE FENOTIPICHE TRA IL GENOTIPO ERIC I E IL GENOTIPO ERIC II

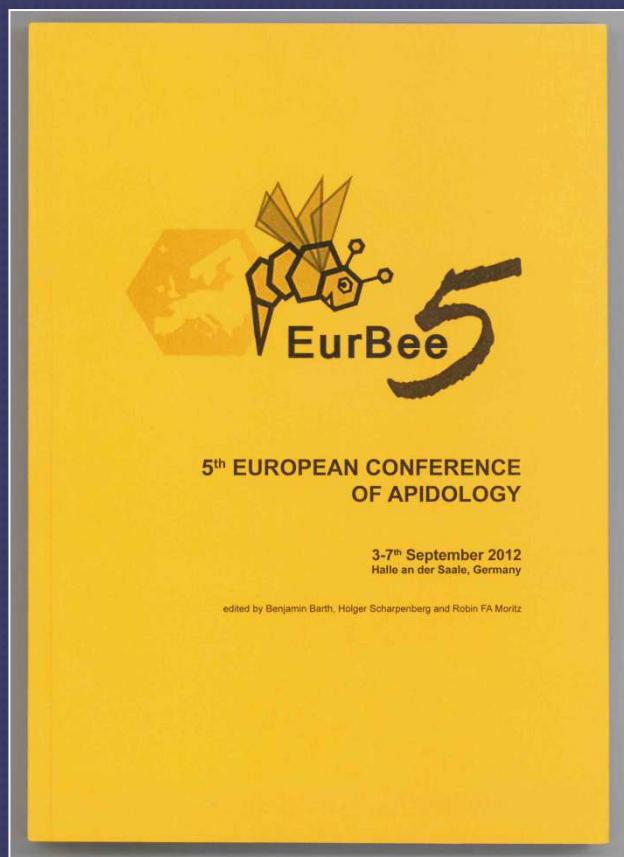
Bassi S.¹, Paganelli G. L.¹, Carpana E.², Gelmini L.¹, Salogni C.³, Carra E.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna – Via Dienes 16, Sezione di Modena
² Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura – Unità di Ricerca di Apicoltura e Bachicoltura – Via di Saliceto 80, Bologna
³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna – Via A. Bianchi 7/9, Brescia

Key words: American foulbrood, Genotypes ERIC I and ERIC II, *Paenibacillus larvae*



Epidemiologia



[5] Pathol POSTER

P5.5

Prevalence of *Paenibacillus larvae* genotype ERIC I and ERIC II in two Italian regions.

Bassi S*, Salogni C, Carpana E, Paganelli G, Gelmini I, Carra E

Email: stefano.bassi@izsler.it

The Gram-positive spore-forming bacterium *Paenibacillus larvae* is the causative agent of American foulbrood (AFB). The genotypic characterisation of *P. larvae* strains based on rep-PCR using Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) primers has identified four different ERIC patterns designated ERIC I-IV. These four genotypes have different phenotypic characteristics. They have also different virulence and this seems to influence the spread of the disease and some clinical aspects. The identification of the *P. larvae* genotype, circulating in a determinate geographical area or in a single apiary, assumes then a relevant practical importance. *P. larvae* strains, isolated in our laboratory in the years 2008-2011 and coming from 49 apiaries in nine province of Lombardia and Emilia Romagna Regions, were genotyped by ERIC-PCR to evaluate the prevalence of ERIC genotypes in this territory. Strains were isolated from winter debris sampled from individual hives of 17 apiaries during an AFB infection monitoring plan and from brood coombs coming from 32 outbreaks of AFB. Results showed the presence in our two regions, in addition to the "classic" ERIC I genotype, of the pigmented ERIC II genotype of *P. larvae*. This genotype was isolated both in colony with sub-clinical infections and in brood with clinical signs of AFB. Co-infections by both genotypes were frequently observed in apiaries examined but also in individual colonies. Possible diagnostics implications are discussed.



Patogenesi

- ❑ Le larva si infettano per via orale con le spore presenti nell'alimento
- ❑ Massima sensibilità tra le 12 e le 36 ore successive alla schiusa
- ❑ Sensibili solo le larve di età inferiore a 48 ore

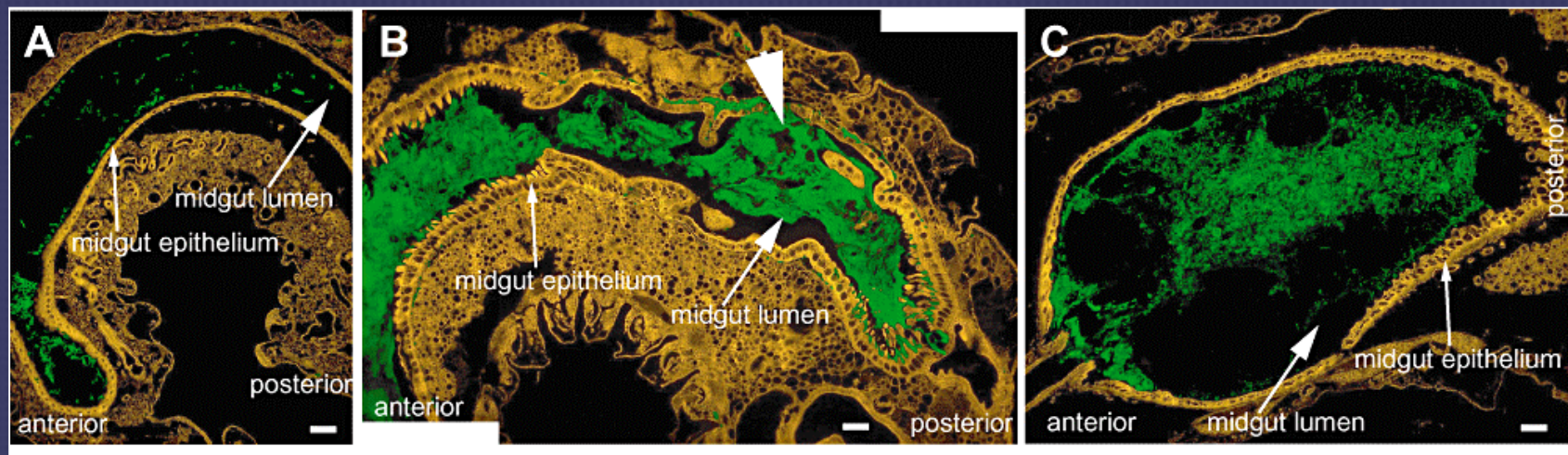


Patogenesi

- ❑ Le spore germinano nell'intestino medio della larva 12 ore circa dopo l'ingestione
- ❑ Le forme vegetative nella prima fase colonizzano l'intestino e si replicano intensamente senza provocare danni alla parete intestinale (Fase non invasiva)
- ❑ Successivamente attraversano la membrana peritrofica penetrando nell'epitelio intestinale (Fase invasiva)



Patogenesi



Yue, D., Nordhoff, M., Wieler, L. H. and Genersch, E. (2008), Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*, 10: 1612–1620.

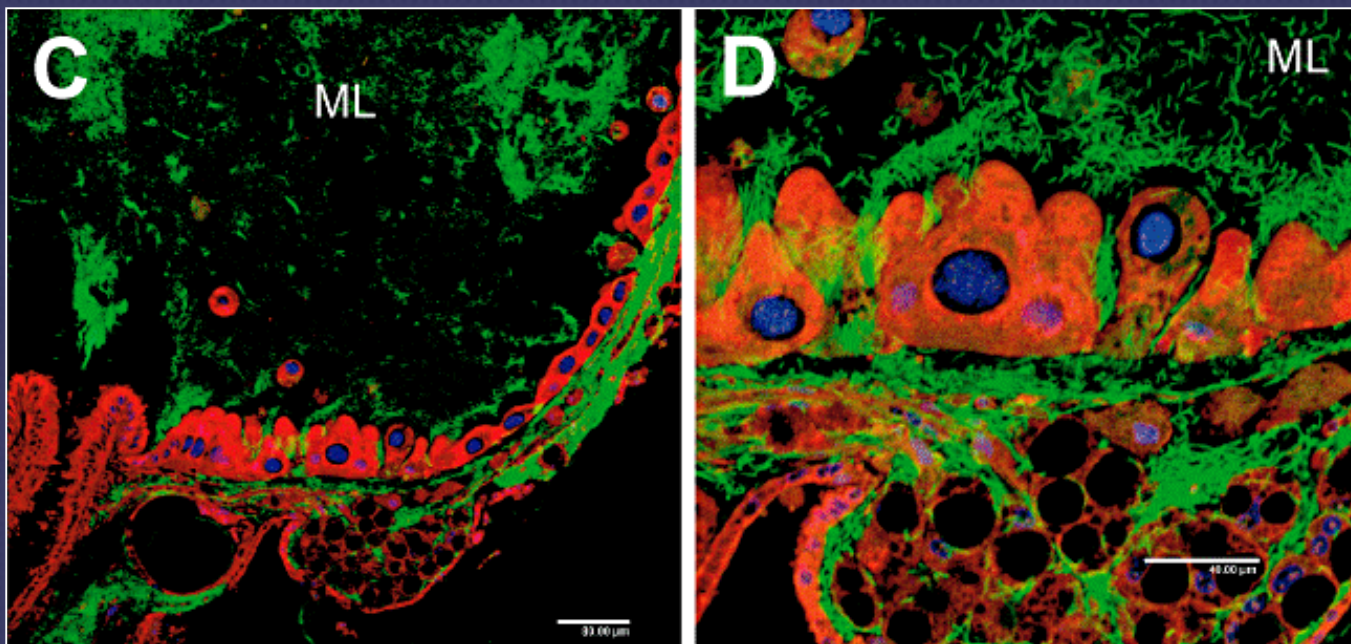


Patogenesi

- ❑ Il superamento della parete intestinale avviene attraverso gli spazi paracellulari
- ❑ Il germe raggiunge l'emocele dove continua a replicarsi invadendo l'emolinfa
- ❑ Per l'azione di proteasi prodotte da *P.larvae* i tessuti larvali si disgregano trasformandosi in un materiale bruno di consistenza colloso



Patogenesi



Yue, D., Nordhoff, M., Wieler, L. H. and Genersch, E. (2008), Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). Environmental Microbiology, 10: 1612–1620.



Trasmissione

□ *Trasmissione orizzontale*

- 1) All'interno della colonia
- 2) Da una colonia ad un'altra

□ *Trasmissione verticale*

- 1) Da una colonia ad un'altra



Trasmissione orizzontale

All'interno della colonia

- ❑ A - Deposizione di uova in celle che hanno contenuto precedentemente larve infette
- ❑ B1 - Le celle che contengono i resti di larve morte vengono ripulite dalle api che in questo modo si contaminano con spore di *P.larvae*
- ❑ B2 - Le api “nutrici” contaminano poi il cibo larvale infettando così le larve



Trasmissione orizzontale

Da una colonia ad un'altra

- ❑ Saccheggio
- ❑ Drifting (volo di deriva)



Trasmissione orizzontale

Il saccheggio

- ❑ Il rischio che si verifichi un saccheggio è inversamente proporzionale alla distanza tra le colonie
- ❑ Attraverso il saccheggio la malattia si può trasmettere alle famiglie presenti nel raggio di 1 km da quella ammalata. A distanze superiori non è stata dimostrata la trasmissione della malattia



Trasmissione orizzontale

Ad opera dell'uomo

Beekeepers are the principal and most rapid means of spreading American Foul Brood disease

Edinburgh and Midlothian Beekeepers' Association



Trasmissione orizzontale

Ad opera dell'uomo

- ❑ Uso di attrezzi e materiali contaminati
- ❑ *Trasferimento di favi di covata da una colonia ad un'altra*
- ❑ Alimentazione con miele o polline contaminato
- ❑ Acquisto di sciami o altro materiale contaminato



Trasmissione verticale

Da una colonia ad un'altra

- ❑ La trasmissione verticale si verifica quando c'è il passaggio dell'infezione da una generazione ad un'altra (esempio classico la trasmissione materno-fetale)
- ❑ Nella Peste Americana l'infezione si trasmette verticalmente con la sciamatura



Trasmissione verticale

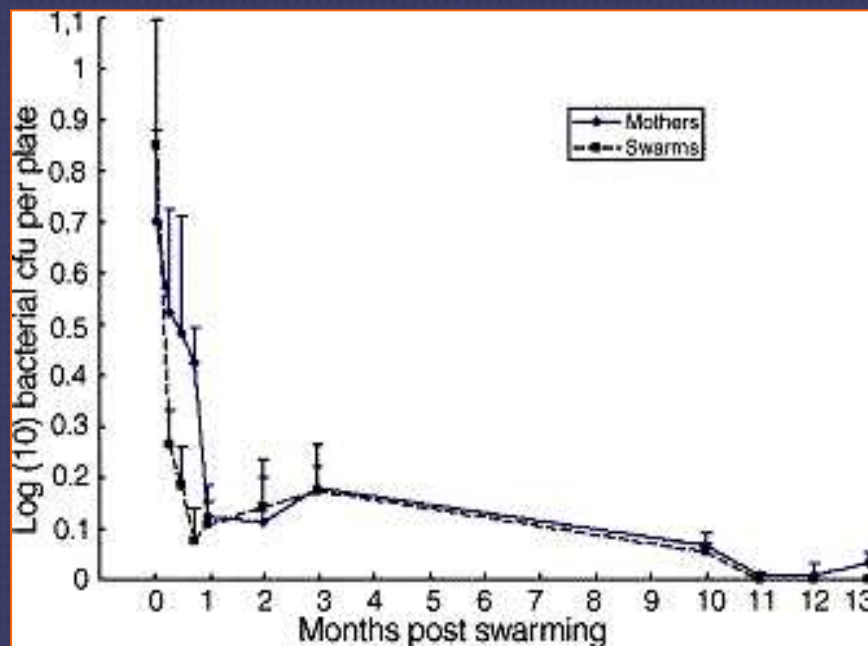
Sciamatura

- ❑ Negli sciami che provengono da *colonie con infezioni subcliniche* l'infezione generalmente tende a scomparire
- ❑ Negli sciami che originano da *colonie ammalate* è possibile che l'infezione persista e la malattia si trasmetta verticalmente dalla colonia “madre” alla colonia “figlia”



Trasmissione verticale

Sciamatura

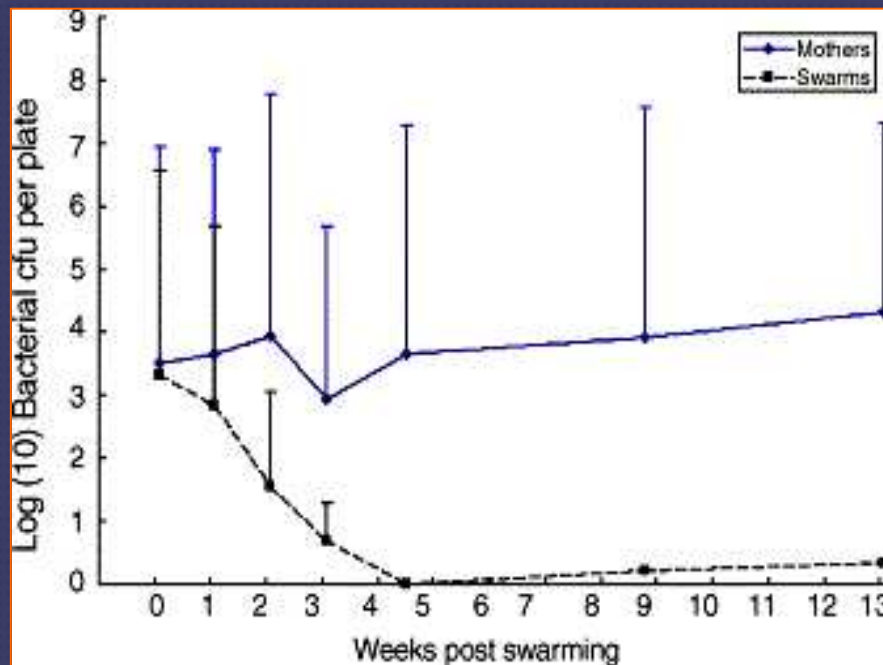


Nelle colonie con infezioni subcliniche e negli sciami che ne derivano il carico di spore decresce drasticamente e si mantiene basso senza incrementi successivi per tutto il periodo di osservazione



Trasmissione verticale

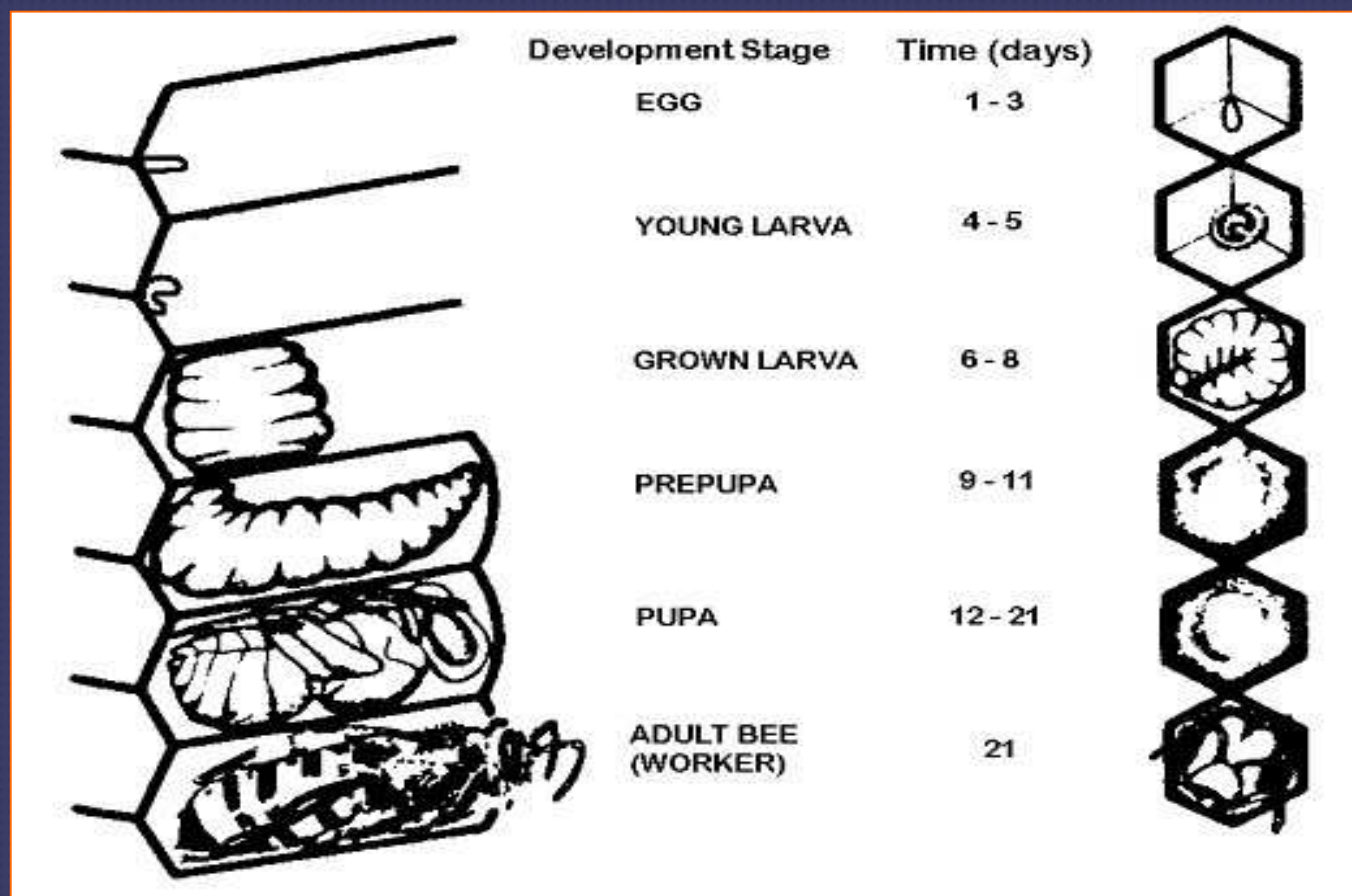
Sciamatura



Nelle colonie con sintomi di Peste Americana il carico di spore negli sciami decresce rapidamente per poi riprendere a crescere fino a raggiungere di nuovo livelli rilevabili dopo 13 settimane dalla sciamatura



Stadi di sviluppo della covata



Diagnosi diretta

Esame ispettivo del favo

□ **Esame clinico** -

Esame delle larve e delle pupe

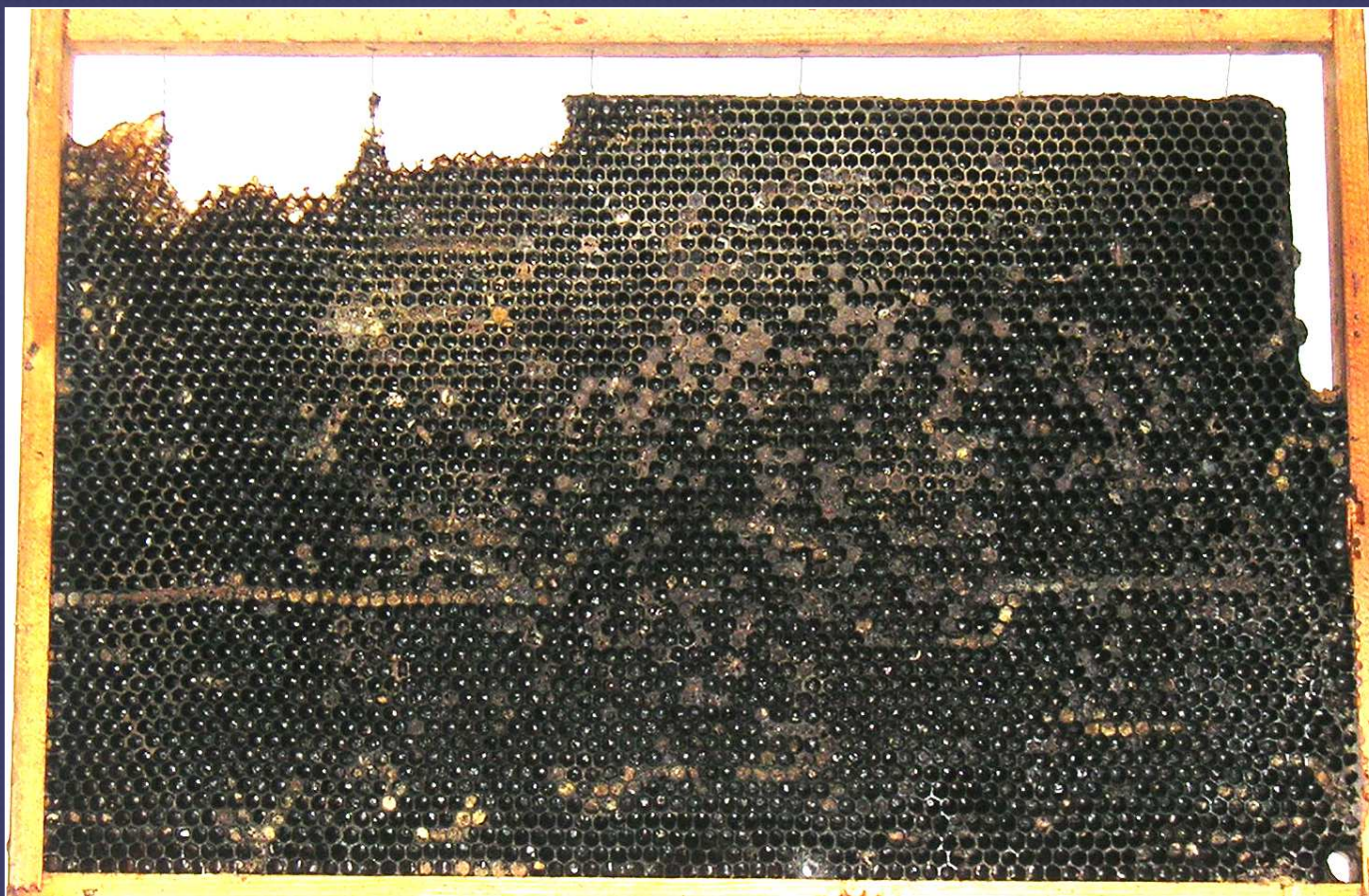
□ **Esami di conferma in laboratorio a partire da materiale patologico**



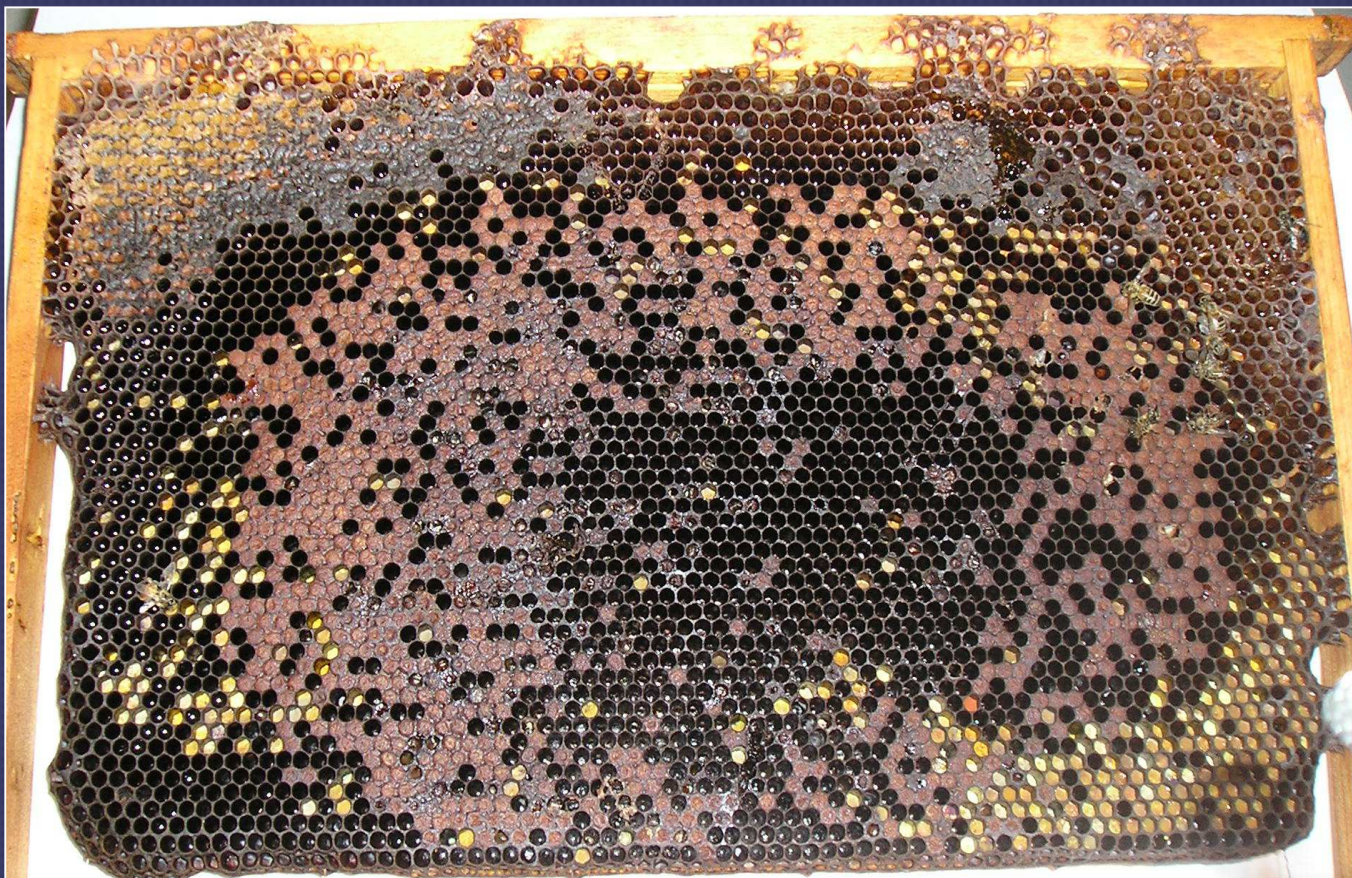
Favo con covata colpita da P.A.



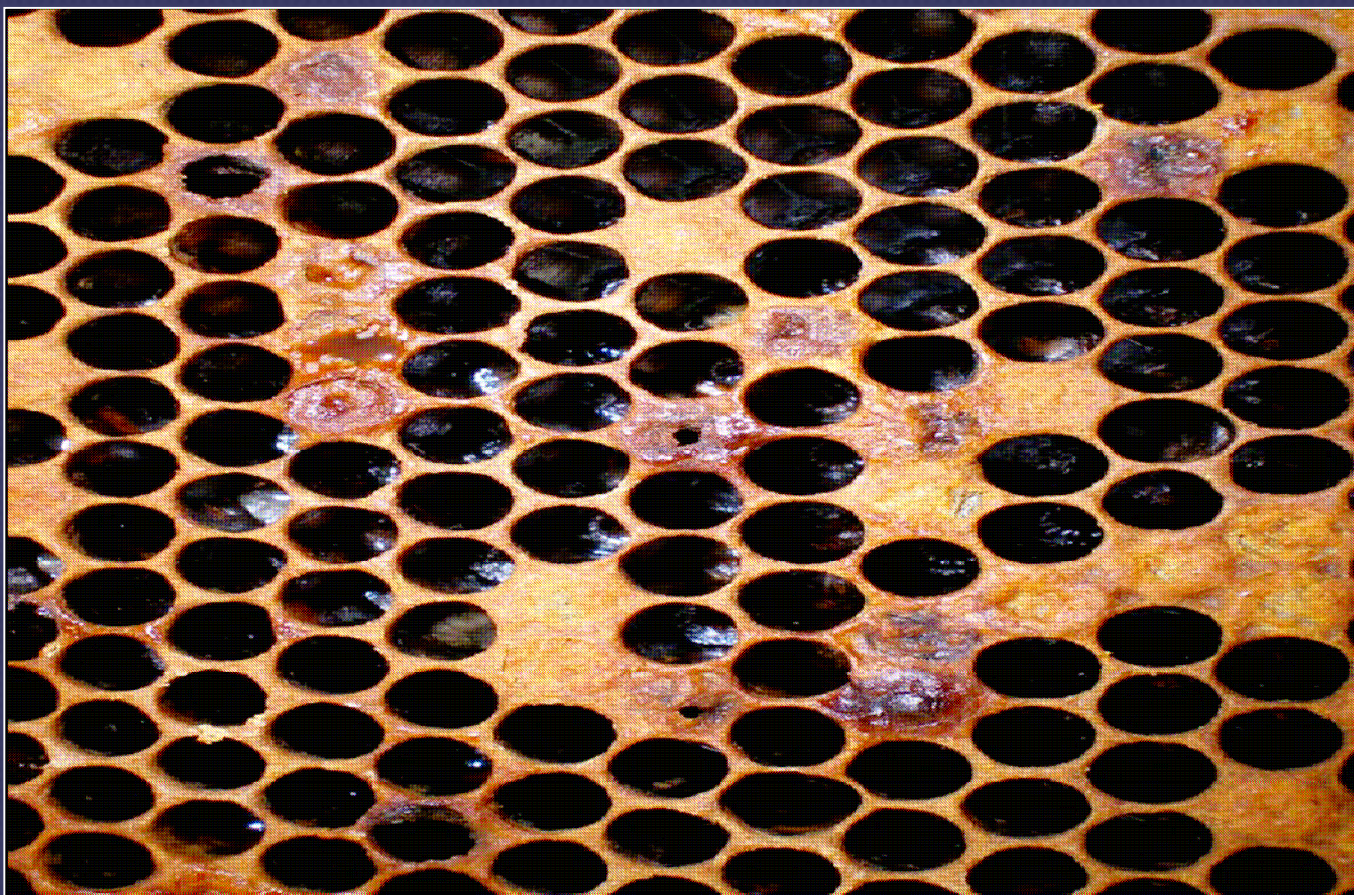
Favo con covata colpita da P.A.



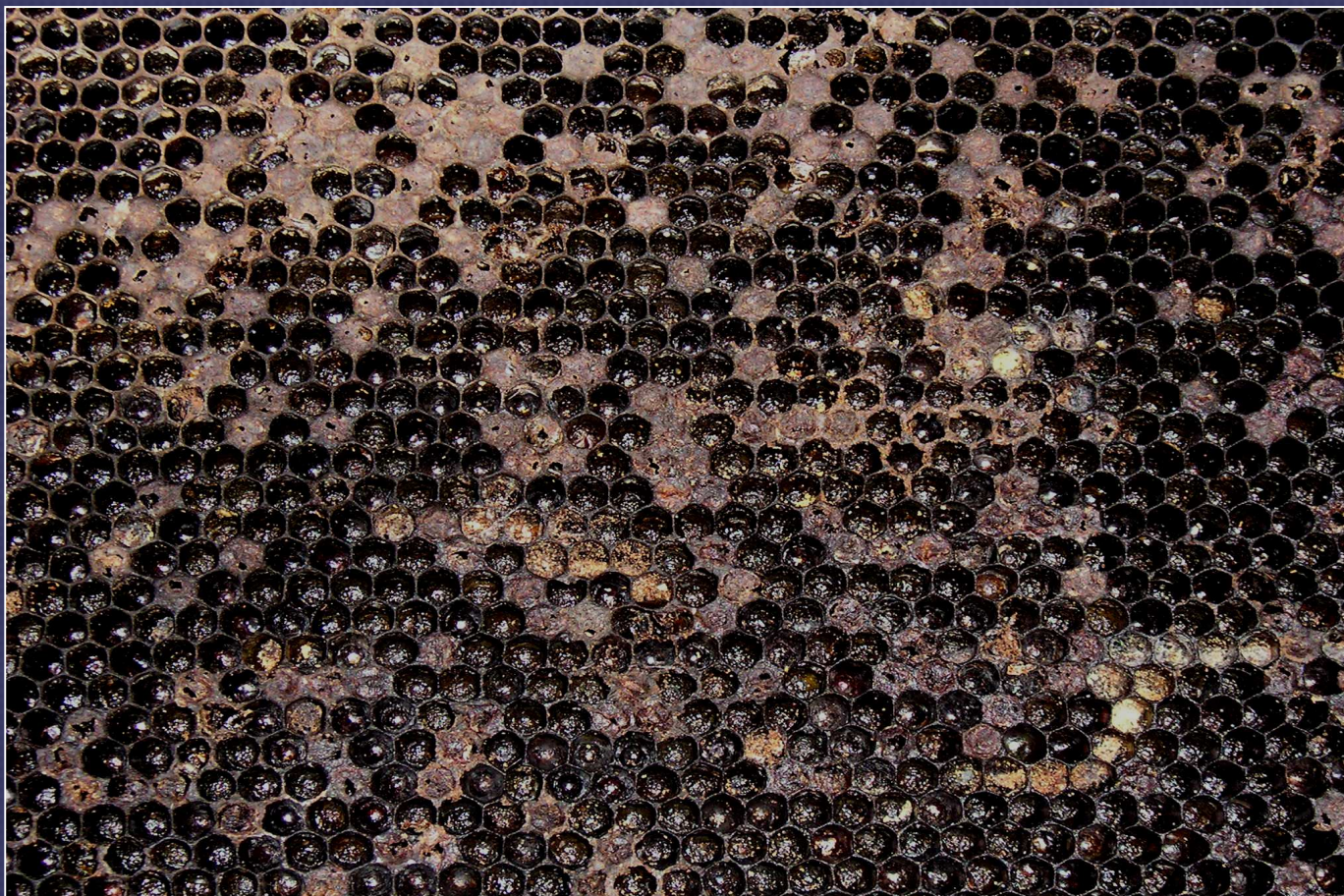
Favo con covata colpita da P.A.



Favo con covata colpita da P.A.



Favo con covata colpita da P.A.



Fattori che condizionano lo sviluppo della malattia

❑ Fattori legati all'ospite:

- “Hygienic behavior” – Comportamento igienico

❑ Fattori legati all'agente etiologico:

- Differente virulenza dei diversi genotipi



Fattore legato all'ospite: Comportamento igienico

- ❑ E' un meccanismo di difesa di tipo comportamentale
- ❑ Consiste nella capacità, da parte delle api di casa, di individuare le larve morte toglierle dalle celle ed eliminarle
- ❑ Viene attuato indipendentemente dalla causa di morte della larva. Costituisce una difesa molto efficace contro le malattie della covata



Fattore legato all'agente eziologico: Virulenza dei genotipi

- ❑ Indicatore di virulenza LT_{100} = Letal Time $_{100}$
Tempo che impiega un patogeno per uccidere il 100% degli ospiti
- ❑ Infezioni sperimentali eseguite in laboratorio hanno messo in evidenza una diversa LT_{100} nei 4 genotipi ERIC di *P.larvae*
- ❑ La LT_{100} risulta essere genotipo-specifica



Infezione con genotipo ERIC I

- ❑ Per uccidere il 100% delle larve sono necessari 12 -13 giorni, circa il 40% circa delle larve muore dopo l'opercolatura della cella
- ❑ Le larve che muoiono dopo l'opercolatura vengono individuate e rimosse con più difficoltà
- ❑ Il numero di spore che si formano sarà più elevato e l'evoluzione della malattia sarà più rapida



Infezione con genotipo ERIC II

- ❑ Il 100% delle larve muore dopo 5 –7 giorni dall'infezione, circa il 90% muore prima dell'opercolatura
- ❑ Queste larve possono essere facilmente individuate e rimosse dalle api nutrici
- ❑ La diffusione dell'infezione all'interno della colonia sarà più lenta e per indebolire o provocare, eventualmente, il collasso della colonia sono necessari tempi più lunghi, anche più stagioni



Correlazione inversamente proporzionale tra la virulenza a livello larvale e la virulenza a livello della colonia

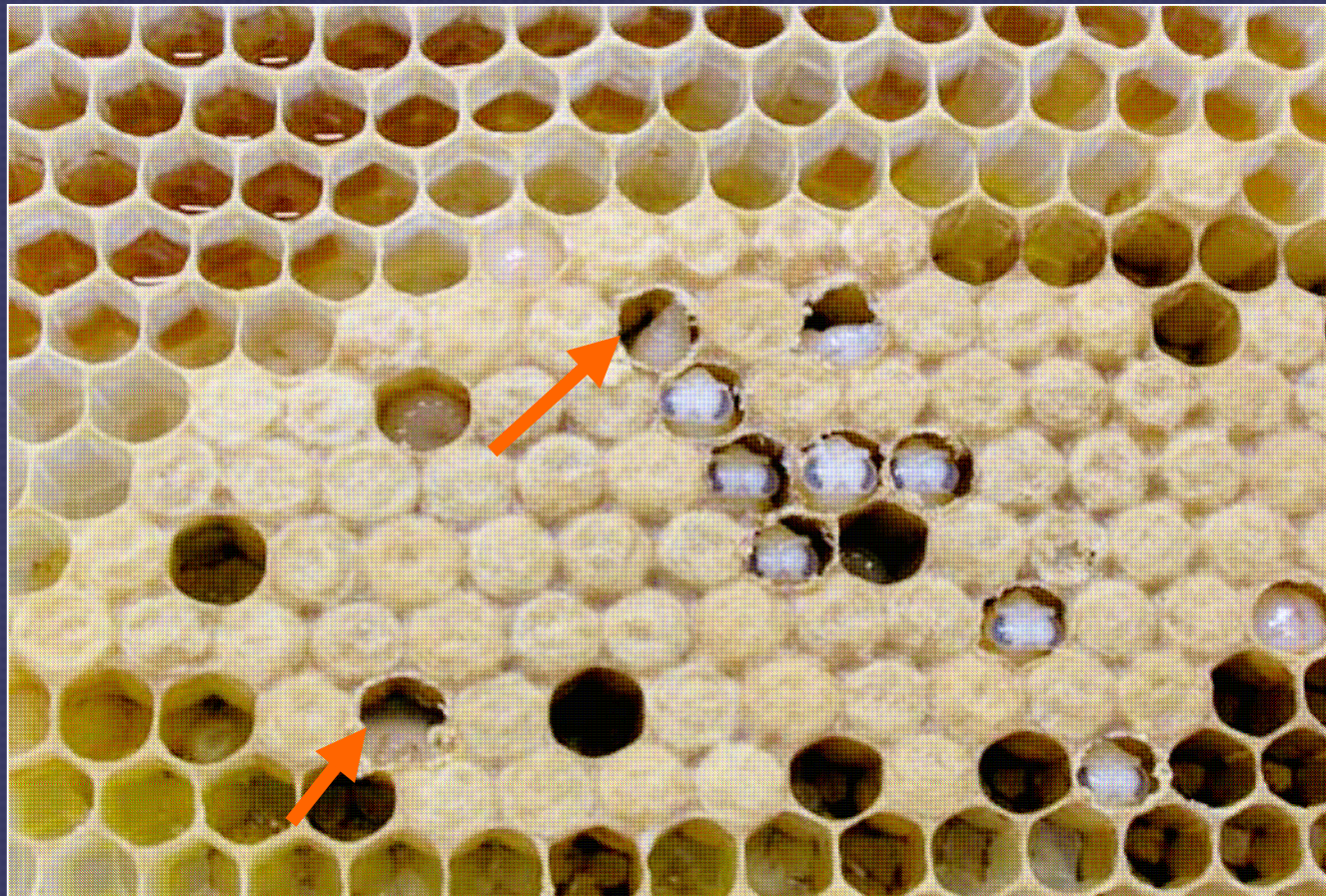
Geno type	Time (days) to host death	Virulence of <i>P. larvae</i> on larval level	Proportion of larvae dying after cell capping	Level of development of ropy mass and spore production	Rate of spreading within the colony	Degree of virulence <i>P. larvae</i> on colony level
ERIC I	12-13	<u>Low</u>	Large	High	High	<u>High</u>
ERIC II	5 -7	<u>High</u>	Small	Low	Low	<u>Low</u>



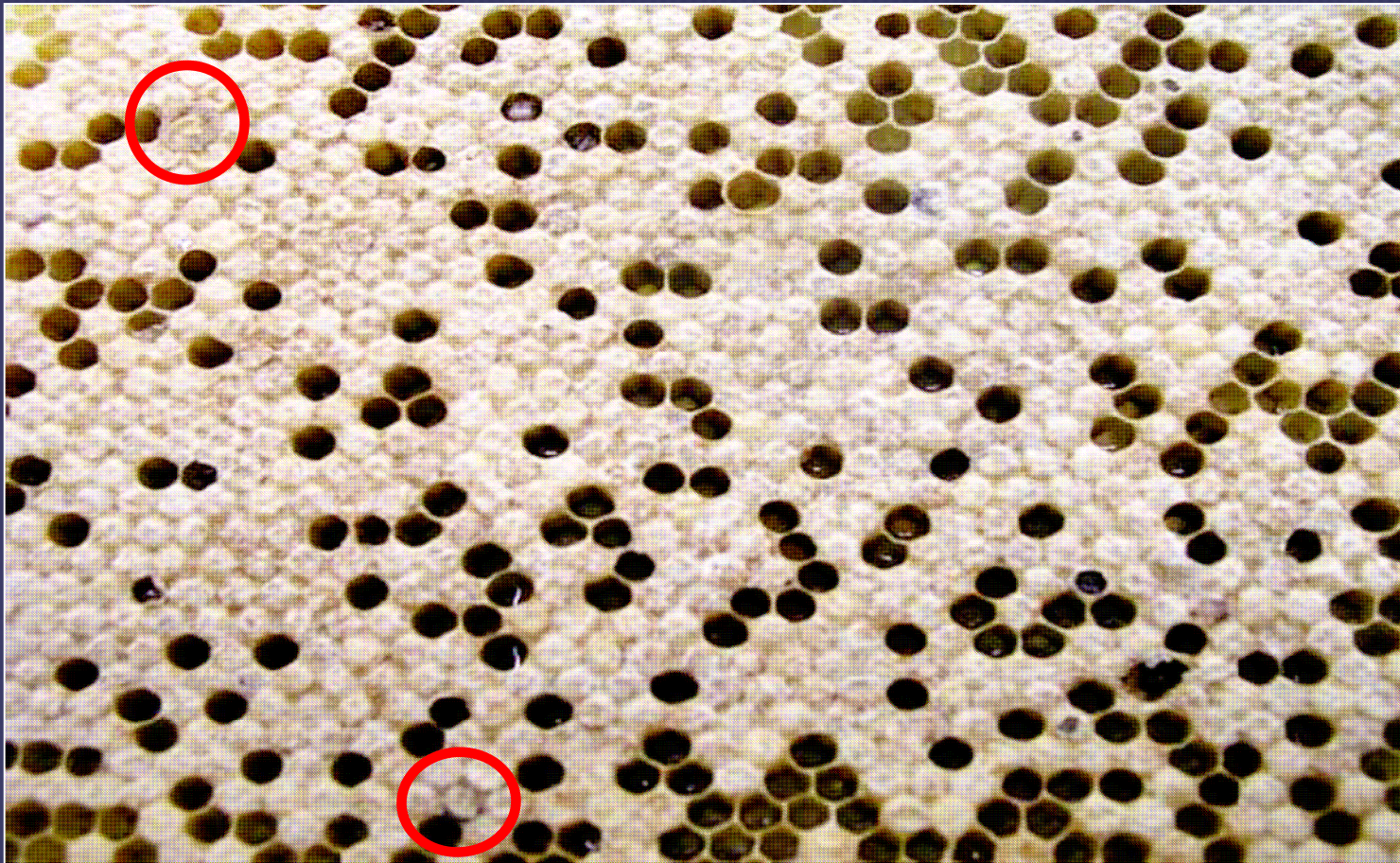
Infezione sperimentale *P.larvae* ERIC I



Infezione sperimentale *P.larvae* ERIC II



Infezione naturale *P.larvae* ERIC II



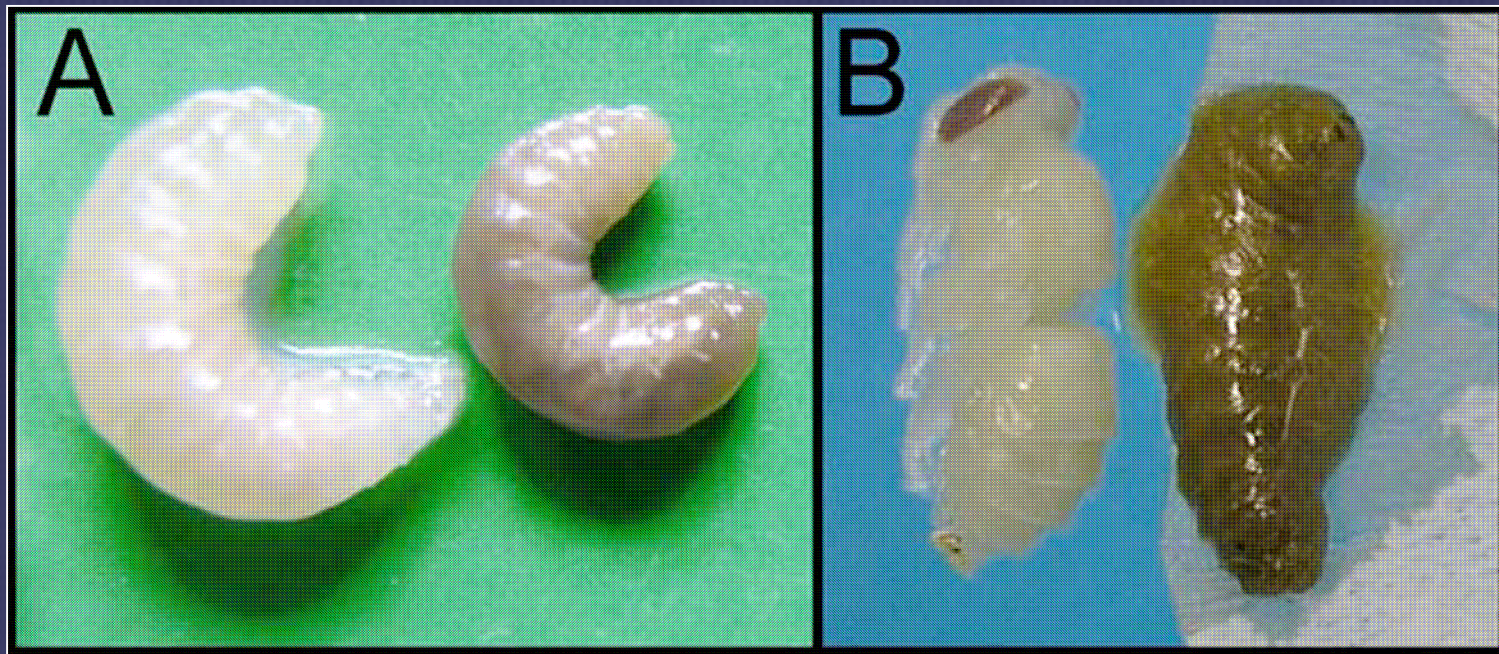
Infezione naturale *P.larvae* ERIC II



Esame delle larve e delle pupe



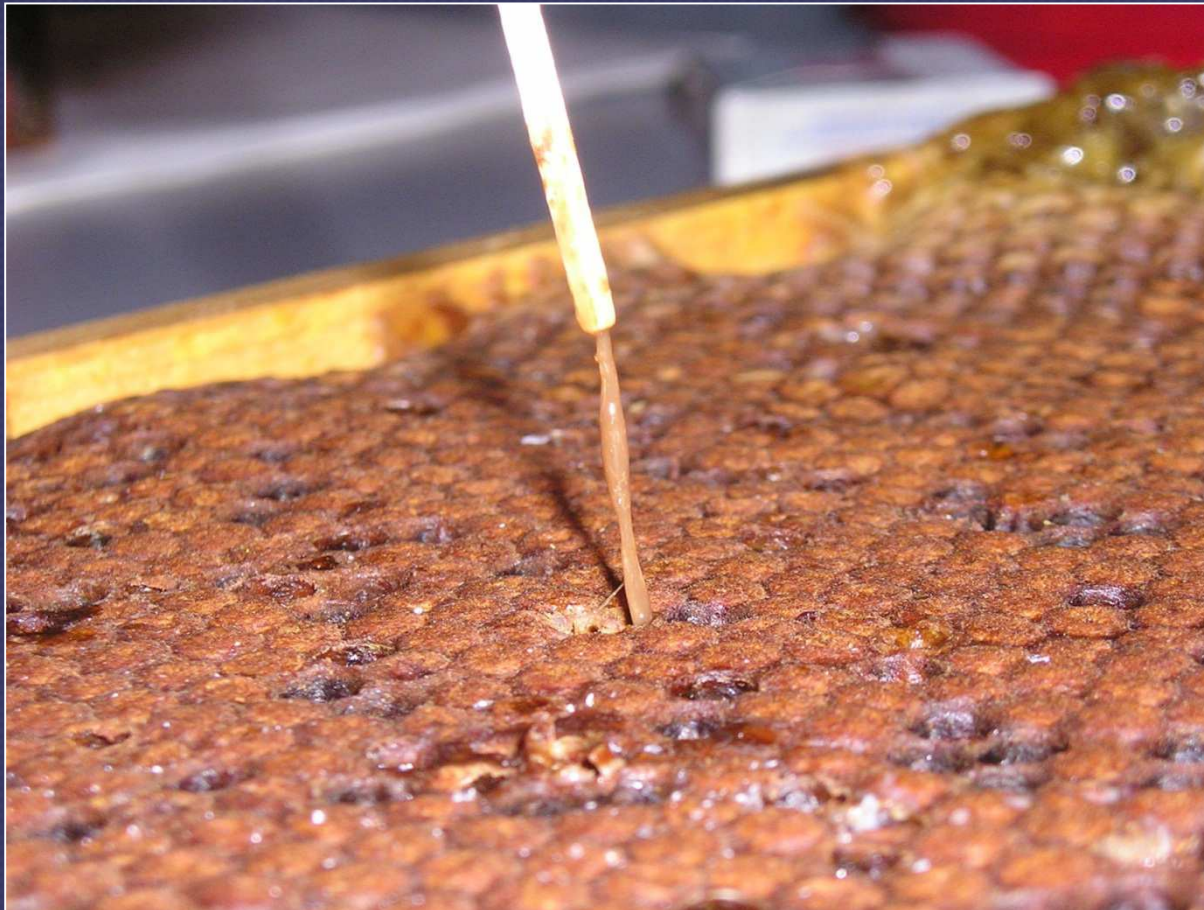
Lesioni larvali



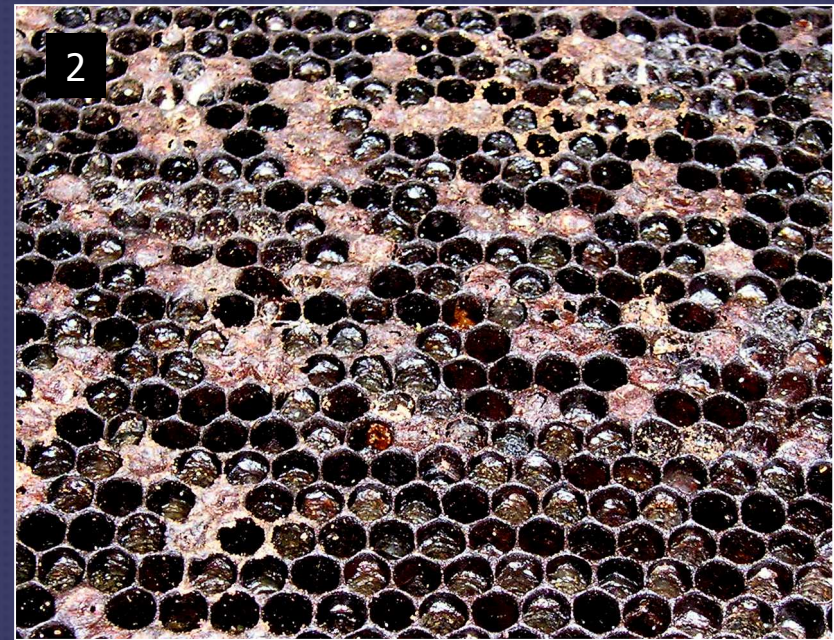
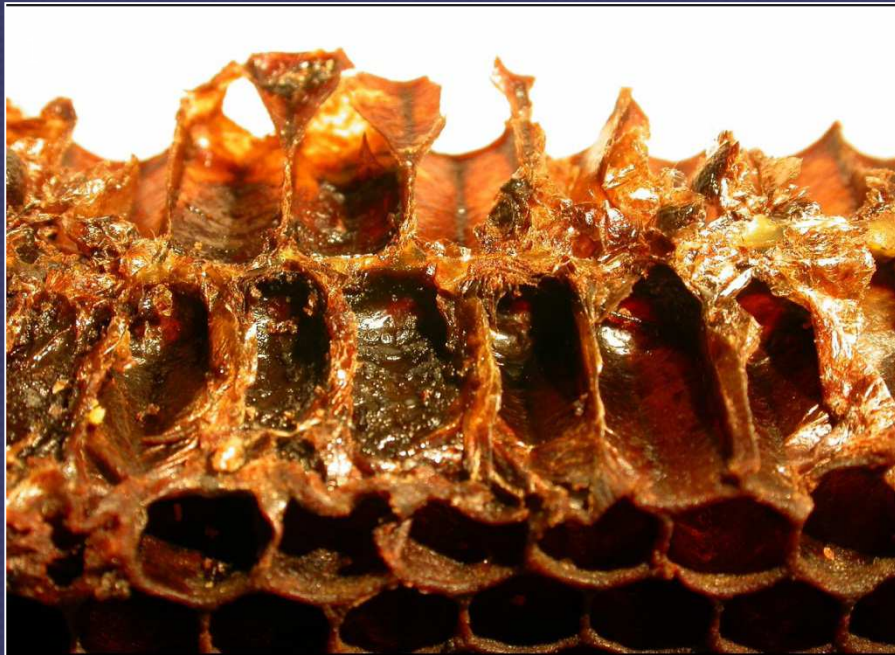
Lesioni larvali



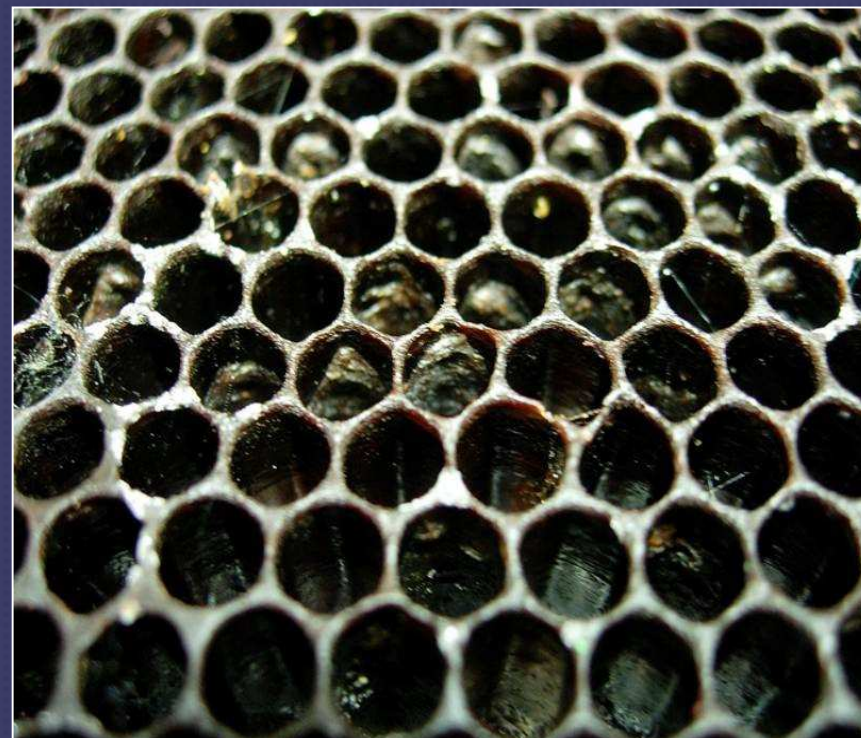
Lesioni larvali



Scaglie



Scaglie



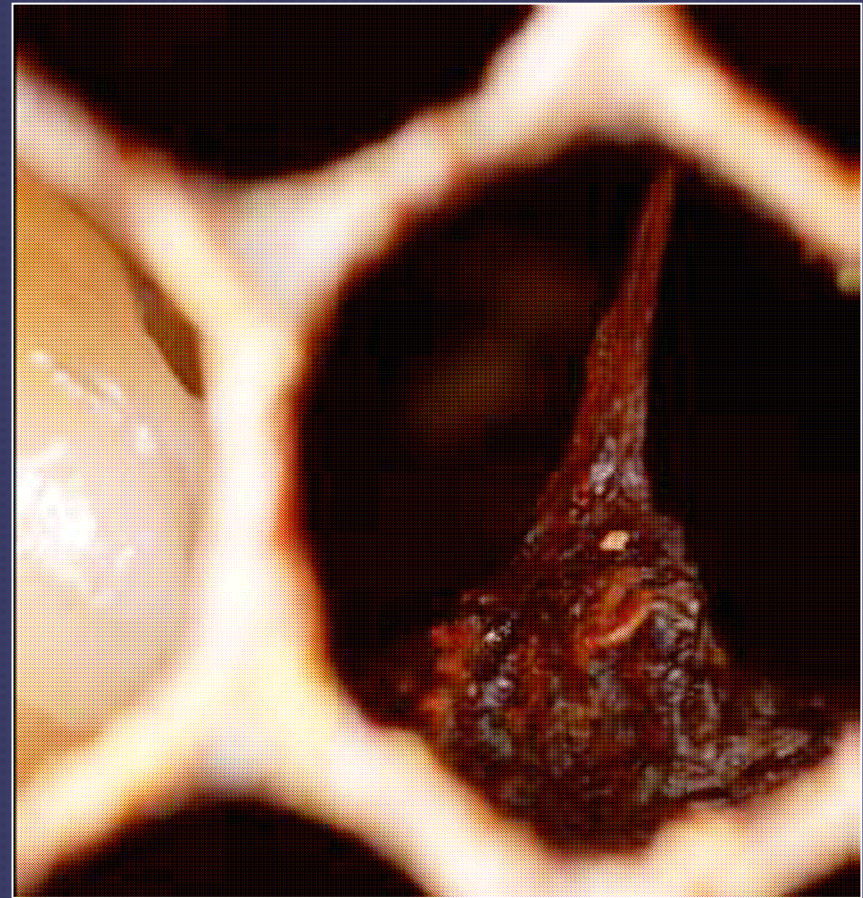
Pupa con ligula estroflessa



2 - <http://www.wncbees.org>



Pupa con ligula estroflessa



Lesioni larvali atipiche

- ❑ La larva filante è la lesione patognomonica della Peste Americana
- ❑ Esistono tuttavia quadri clinici atipici con larve che presentano aspetto e consistenza diversa
- ❑ L'assenza di larve filanti non ci consente sempre di escludere la presenza della malattia



Lesioni larvali atipiche

- ❑ Gli opercoli delle celle non diventano scuri
- ❑ Le larve degenerate possono essere di colore bruno o grigio, di consistenza più acquosa con poca, o nessuna, tendenza a formare filamenti
- ❑ Le larve inizialmente possono assumere un aspetto simile a quello che si osserva nella “covata a sacco”



Lesioni larvali atipiche

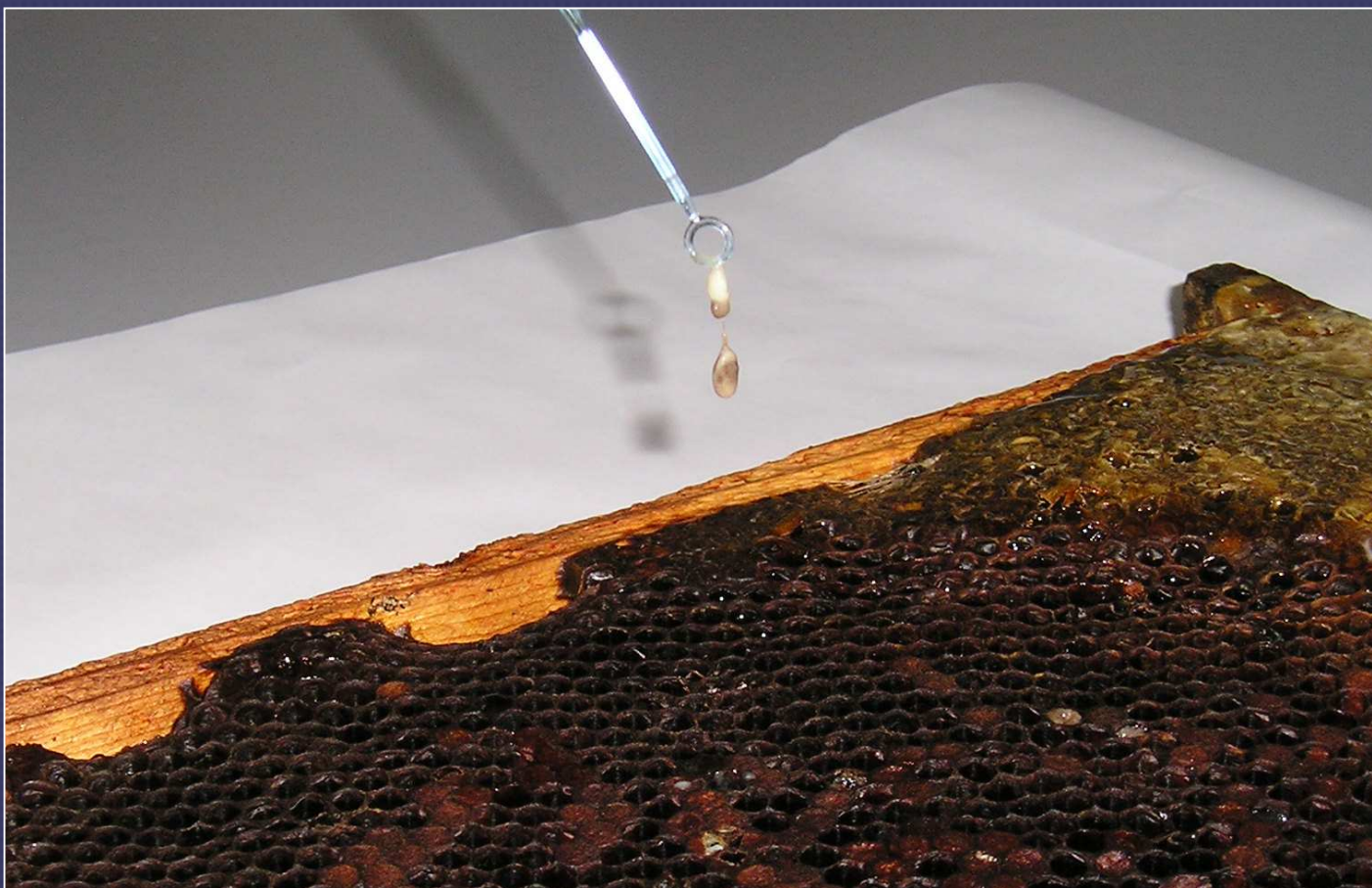
- ❑ Le larve in posizione a “C” tendono a debordare dalla cella
- ❑ Le scaglie sono di colore bruno o grigio e si possono rimuovere con facilità dalle celle



Lesioni larvali atipiche (121677/2012)



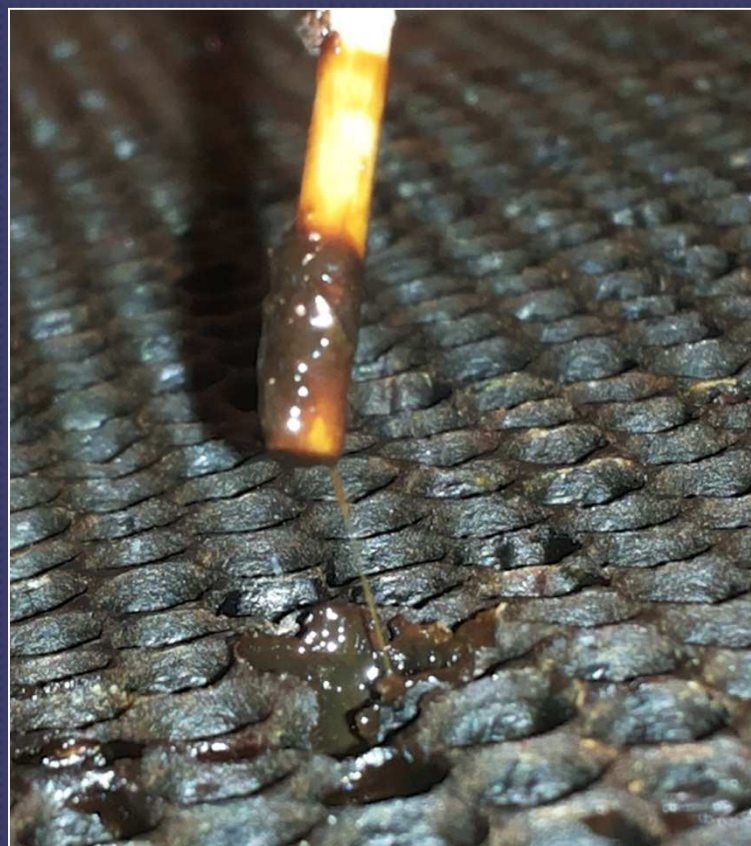
Lesioni larvali atipiche (146606/2012)



Lesioni larvali atipiche (146606/2012)



Lesioni larvali atipiche (146441/2013)



Infezioni miste

Reprinted from the JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY, Vol. 14, February, 1921, No. 1

MIXED INFECTION IN THE BROOD DISEASES OF BEES

By ARNOLD P. STURTEVANT, *Specialist in the Bacteriology of Bee Diseases, Bureau of Entomology, United States Department of Agriculture*

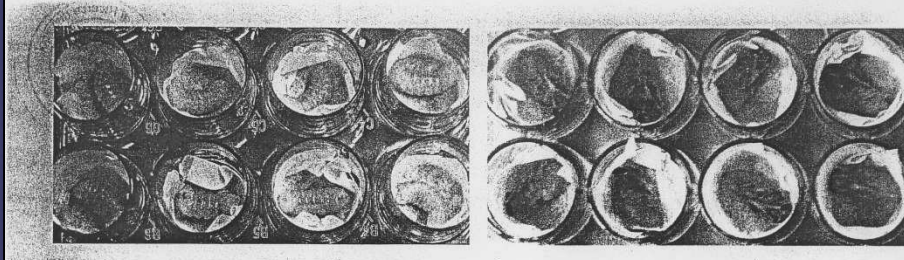
The two principal brood diseases of bees, European foulbrood and American foulbrood, heretofore have not been found associated together commonly in the same colony. The generally accepted belief has been that it is indeed a rare occurrence to find both diseases under these conditions. Sacbrood, on the other hand, is much more often found in greater or less quantity associated with either European foulbrood or American foulbrood, but seldom assuming dangerous proportions, either alone or in conjunction with the others. Statistics for the past few years, however, show that these cases of what may be called mixed infection are probably more common than was previously supposed and may account for some of the puzzling instances where colonies have not responded to treatment in the customary manner, thereby causing beekeepers to believe they have some new form of brood disease, or that the disease is showing some new unheard of characteristics.

Cases of so-called mixed infections are not at all uncommon among human diseases. Where this condition occurs, such as when a person affected with typhoid fever develops pneumonia at the same time, it is always the individual to whom the term mixed infection is applied. It is a somewhat different matter in the case of the brood diseases of bees. In the first place, so far as is known, the organisms causing these two diseases, *Bacillus larvae* of American foulbrood and *Bacillus pluton* of European foulbrood, have never been found together in the same individual larva. It is, therefore, the colony as whole which is to



Infezione da P.larvae ERIC II e M.plutonius





Fotos: Elke Genersch

BIENENGESUNDHEIT

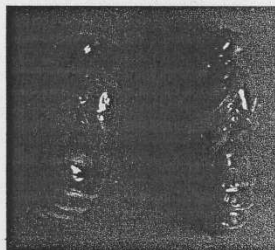
Amerikanische Faulbrut: Oft anders als im Lehrbuch

Anders als in der Fachliteratur beschrieben kann auch hinter einem einwandfreien Brutnest Faulbrut stecken. Dr. Elke Genersch fasst Erkenntnisse zur Brutkrankheit zusammen, die am L nderinstitut für Bienenkunde in Hohen Neuendorf gewonnen wurden.

Seit der Erreger der Amerikanischen Faulbrut im Jahr 1906 zum ersten Mal beschrieben wurde, stand diese Brutkrankheit immer wieder im Mittelpunkt internationaler Forschungen. Lange Zeit widersetzte sich das Bakterium einer gründlichen Untersuchung, da es sich als sehr schwierig erwies, den Erreger im Labor zu züchten. Erst mit Fortschritten in der Mikrobiologie konnte dieses Problem gelöst werden. Damit ließen sich etliche Fragen zu *Paenibacillus larvae* (*P. larvae*), wie der Erreger seit 2006 genannt wird, beantworten.

Lehrbuchwissen nicht präzise

Nicht alle Faulbruterreger sind gleich. Es gibt verschiedene Stämme, die sich in ihrem Erbgut unterscheiden. Eine der Fragen war, ob diese Stämme in ihrer Gefährlichkeit voneinander abweichen. In Fachbüchern wird der Verlauf der Erkrankung meist sehr ein-



Seltenes Phänomen: an Faulbrut erkrankte Puppe. Links ein gleich altes gesundes Tier

fach dargestellt: Die Larven infizieren sich, indem sie Futter aufnehmen, das Sporen enthält. Infizierte Larven sterben im verdeckelten Stadium und werden noch unter dem Zelldeckel zu einer fadenziehenden Masse zersetzt, die zu Faulbrutschorfen eintrocknet. Diese Masse unter eingefallenen und l chrigem Zelldeckeln gilt neben den Schorfen als klinisches Symptom. Ein Volk, in dem solche Anzeichen erkennbar sind, wird unbehandelt an der Seuche eingehen. So lautet die Theorie, aber stimmt diese Beschreibung des Krankheitsverlaufs – und vor allem: stimmt sie immer?

Suche beim Erreger

Es war schon seit Längerem bekannt, dass infizierte Völker manchmal keine klinischen Symptome entwickeln und teils sogar mehrere Jahre unauffällig  berleben können. Als Erklärung hierfür wurden alle möglichen Eigenschaften der Bienen diskutiert. Auf die Idee, dass der Grund dafür auch beim Erreger zu finden sein könnte, kam lange niemand.

Auf diese Lücke fokussierten wir uns mit unserer wissenschaftlichen Arbeit am L nderinstitut für Bienenkunde in Hohen Neuendorf. Unsere Arbeiten hatten bereits vor Jahren gezeigt, dass es genetisch unterschiedliche Typen von *P. larvae* gibt, die man mit molekularen Methoden in vier verschiedene Gruppen einteilen kann. Diese sogenannten Genotypen werden nach der Methode, mit der sie sich bestimmen lassen, ERIC I, ERIC II, ERIC III und ERIC IV genannt. In Deutschland sind lediglich die Typen ERIC I und II verbreitet.

Zucker als Nahrung

Besonders interessant waren unsere Ergebnisse in Bezug auf die Nahrungsgrundlagen des Erregers: *P. larvae* kann sich von Glukose und Fruktose, den beiden Hauptbestandteilen des Honigs, ernähren. Als besonders guter Kostverwerter erwies sich der Genotyp ERIC II, der beide Zuckerarten gut verstoffwechseln kann und damit im Darm der Larve ideale Lebensvoraussetzungen findet. Diese Unterschiede in den Nahrungsvorlieben haben einen Bezug zur Gefährlichkeit (Virulenz), denn die Nutzung der Nahrungsquelle ist entscheidend für das Infektionsgeschehen in den Larven.

Diesen Infektionsverlauf besahen wir uns im Labor genauer: Wir f tterteten Bienenlarven 24 Stunden lang mit Sporen und zogen die Larven im Brutschrank auf. Dabei protokollierten wir täglich deren Gesundheitszustand. Speziell die Fütterung mit den Genotypen ERIC I und II erbrachte wichtige Erkenntnisse. Zum einen schwankt die Sporenkonzentration erheblich, bei der die Hälfte der Tiere getötet wird (LC50). Bei manchen Formen des Erregers reicht eine aufgenommene Spore aus, um die Larve zu töten. Andere sind weit weniger gefährlich. Hier müssen Larven im Labor bis zu 100 Sporen mit dem Futter aufnehmen, um an der Infektion zu sterben. Leider gibt es bisher keine Möglichkeit, den Sporen oder Bakterien die unterschiedliche Gefährlichkeit anzusehen. Sollte das eines Tages möglich sein, würde es die Diagnose der Amerikanischen Faulbrut revolutionieren.

Die Hälfte stirbt offen

Das zweite wichtige Ergebnis betrifft den zeitlichen Verlauf der Infektion. Entgegen den Darstellungen in vielen Fachbüchern stirbt die Hälfte der erkrankten Tiere bereits vor der Verdeckelung. Die toten Larven werden im Volk von den Ammenbienen ausgeräumt. Bei einer imkerlichen Durchsicht fallen die ausgeräumten Larven höchstens als Lücken im Brutnest auf. Es zeigte sich außerdem, dass die Zeitdauer zwischen der Infektion und dem Tod aller infizierten Larven (LT100) sehr variabel war und dass diese Unterschiede charakteristisch für den jeweiligen Erregertyp waren.

Der von uns ERIC I genannte Genotyp zeigte noch am ehesten den in den Fachbüchern beschriebenen Krankheitsverlauf: Etwa die Hälfte der infizierten Larven entwickelte sich



Limiti della diagnosi clinica

- ❑ Necessità di controlli frequenti e accurati
- ❑ Rischio che nelle fasi iniziali la malattia non venga diagnosticata (falsi negativi)
- ❑ Impossibilità di diagnosticare le infezioni subcliniche



Obiettivi da perseguire nella diagnostica della P.A.

- ❑ Individuare i casi clinici con minor dispendio di tempo e di costi
- ❑ Individuare le colonie con infezioni subcliniche



Diagnosi indiretta

- Si esegue in laboratorio ricercando e quantificando le spore di *P.larvae* su varie matrici prelevate dagli alveari



Matrici utilizzabili

☐ *Miele del melario*

☐ *Miele del nido*

☐ *Api*

☐ Cera

☐ Polline

☐ Detriti alveare



Prelievo miele

☐ *Miele del melario:*

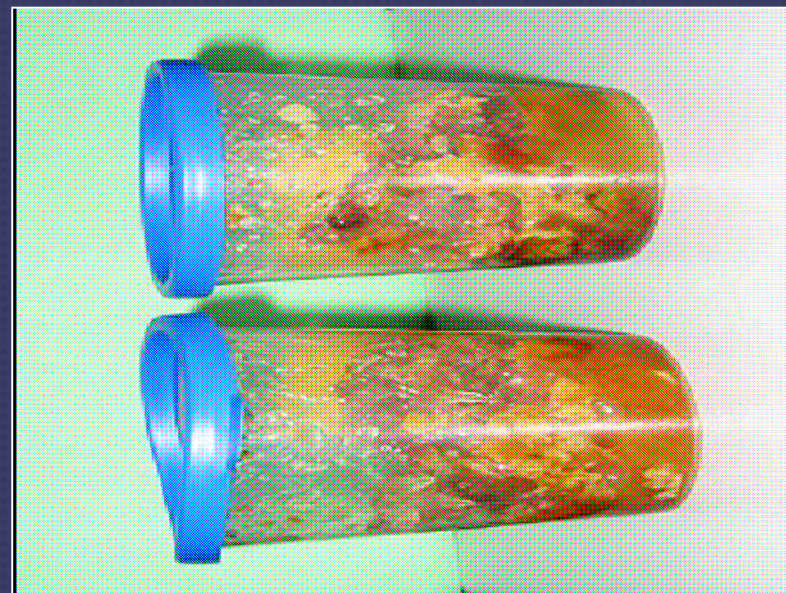
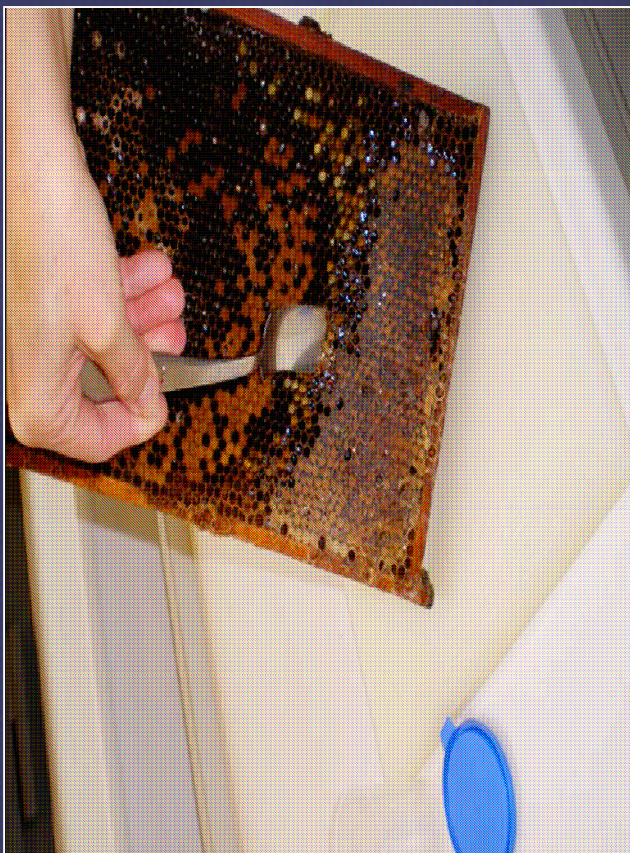
Prelievo a livello di apiario. Il campione deve provenire da un solo apiario e contenere miele di tutti gli alveari di quell'apiario

☐ *Miele del nido:*

Prelievo a livello di singola famiglia. Si prelevano con un cucchiaino 30-50 g di miele da più favi del nido



Prelievo di miele da favi del nido



Miele

Esame colturale: sensibilità

- ❑ *Sensibilità non ottimale* (90 – 95 % circa)
- ❑ Il miele può risultare negativo per spore di *P.larvae* in apiari o colonie che hanno sintomi di PA («falsi negativi»)



Miele

Esame colturale: specificità

- ❑ Bassa specificità (65 – 75%)
- ❑ Il miele può risultare positivo in apiari o colonie senza sintomi di PA («falsi positivi»)



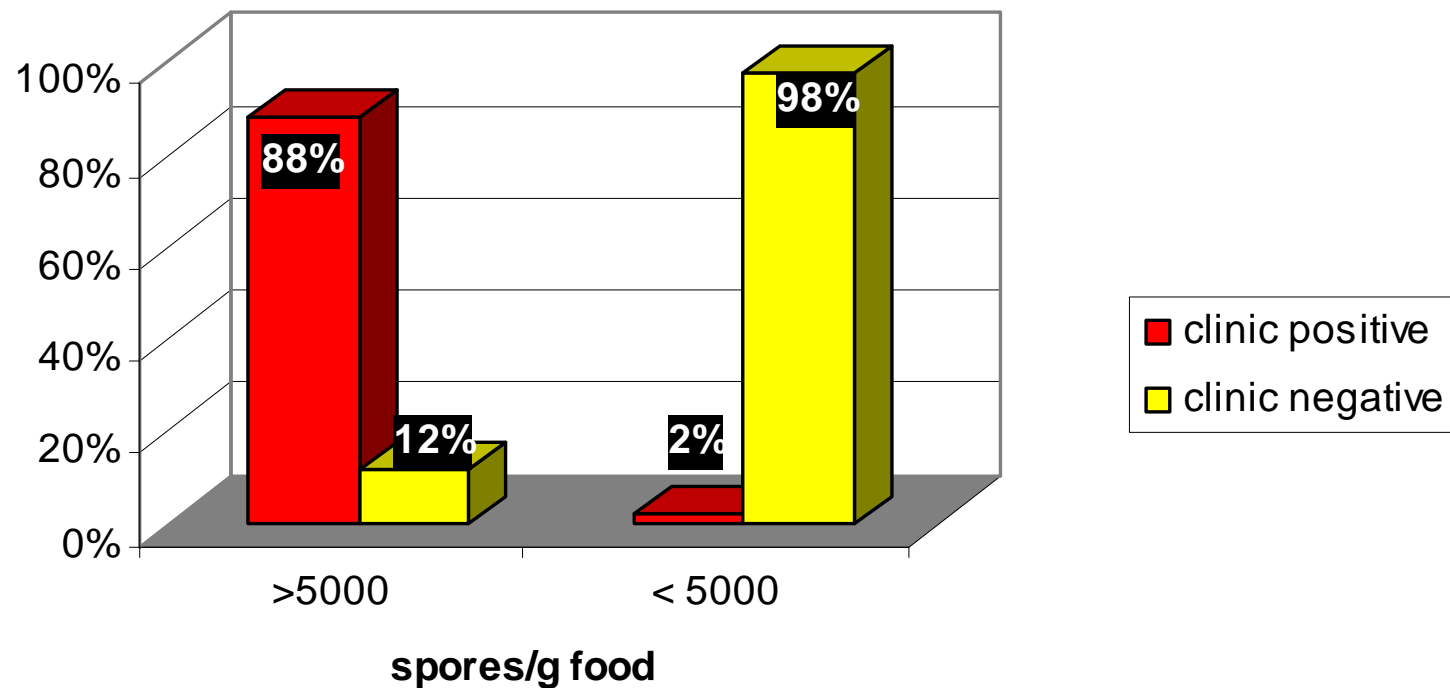
Miele

Esame quantitativo: valutazione

- ❑ Esiste un rapporto tra il numero di spore di *P.larvae* presenti nel miele e la gravità dell'infezione
- ❑ Questo dato può essere sfruttato per una valutazione in senso diagnostico dei risultati ottenuti
- ❑ Creazione di classi di grandezza che corrispondono a diversi livelli di infezione



Spores in food and clinical symptoms of AFB



Api

Esame colturale: sensibilità

- ❑ Il campione ideale è costituito da 100 api per alveare
- ❑ Nei campioni prelevati da una singola colonia la sensibilità è del 100%
- ❑ Nei campioni rappresentativi dell'apiario la sensibilità dipende da alcune variabili



Api

Esame colturale: specificità

- ❑ *Bassa specificità*
- ❑ Percentuale elevata di infezioni subcliniche. Apiari o colonie batteriologicamente positive ma clinicamente negative («falsi positivi»)



Api

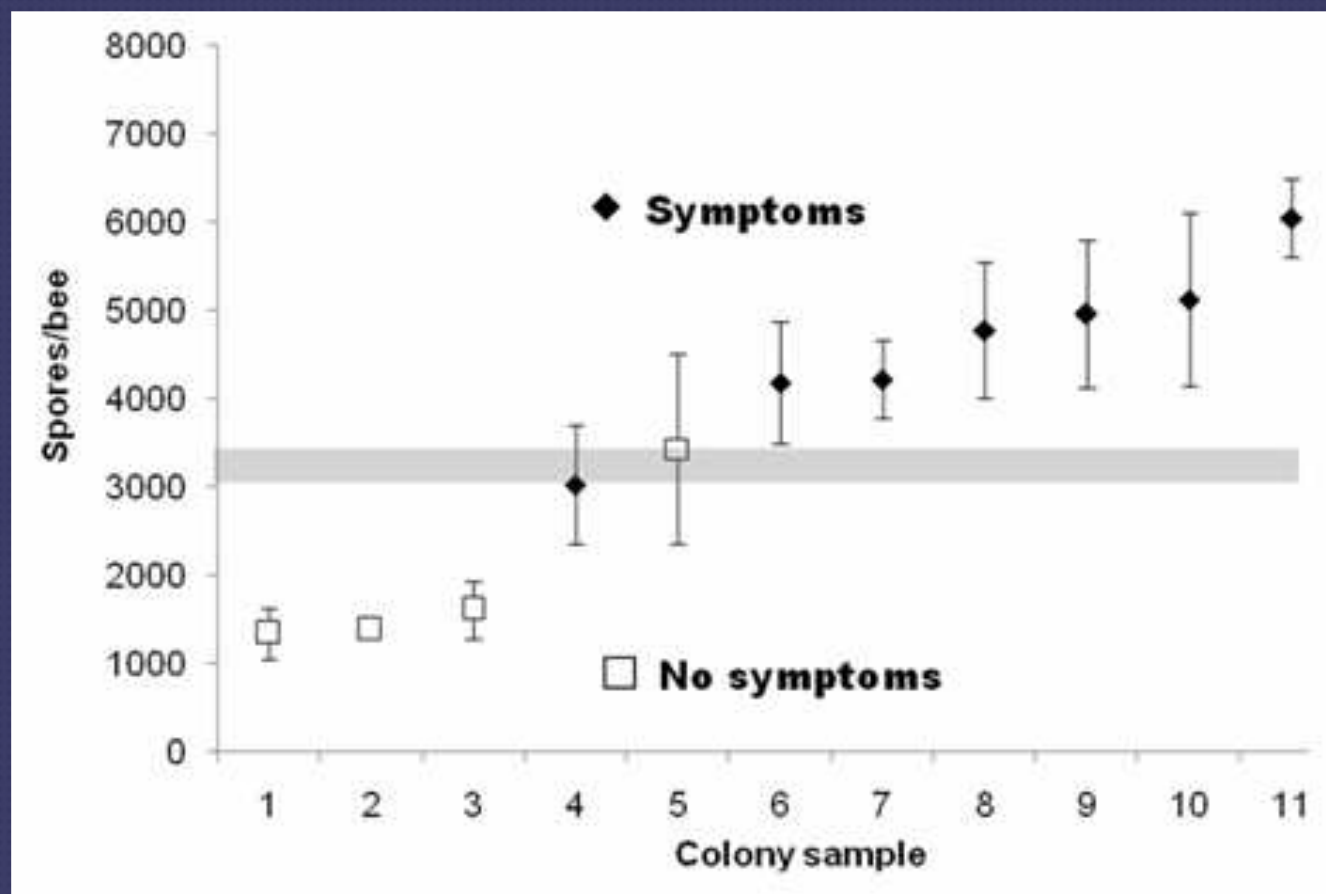
Esame quantitativo: valutazione

- ❑ Nelle colonie ammalate la carica di spore di *P.larvae* è significativamente più elevata che nelle colonie con infezioni subcliniche
- ❑ Il dato quantitativo può essere impiegato per distinguere, *indicativamente*, le colonie ammalate da quelle con infezioni subcliniche



Api

Esame quantitativo: valutazione



Riassumendo

- ❑ L'esame delle api permette di identificare un maggior numero di infezioni subcliniche e di casi di malattia rispetto all'esame del miele
- ❑ *Dal punto di vista diagnostico l'aspetto più critico di entrambe le matrici è rappresentato da una scarsa specificità*
- ❑ Alla scarsa specificità è possibile ovviare, *almeno in parte*, con una valutazione quantitativa dei dati



Impiego della diagnosi indiretta

- ❑ Non può essere del tutto alternativa alla diagnosi clinica bensì complementare a questa
- ❑ Può essere usata come prova di “screening” per identificare le colonie con elevati livelli di infezione e concentrare poi su queste i controlli clinici
- ❑ L’esame clinico permetterà di distinguere le colonie ammalate da quelle con infezioni subcliniche



Impiego della diagnosi indiretta

- La scelta della matrice da impiegare (miele o api) e la valutazione dei risultati in senso qualitativo o qualitativo dipenderanno dalle specifiche realtà in cui si opera e dalle finalità che ci si prefigge



Detriti

- ❑ Matrice di impiego recente
- ❑ Campione semplice da prelevare, pratico da gestire e da analizzare
- ❑ L'esame dei detriti invernali permette di conoscere il grado di infezione dell'alveare quando la famiglia è inattiva
- ❑ Questo consentirà di gestire in maniera adeguata le colonie con livelli elevati di infezione alla ripresa della stagione



Prelievo detriti

□ Detriti:

Vengono raccolti sul fondo dell'arnia inserendo un foglio monouso nel cassetto mobile. La quantità sufficiente corrisponde a circa un cucchiaino di materiale



Prelievo detriti



Obiettivi di un progetto di ricerca

IZSLER - Cra-api

- ❑ *Indicatori di infezione* - efficienza di varie matrici come «indicatori» di presenza dell'infezione. Confronto tra miele, api e detriti della stessa colonia
- ❑ *Valore predittivo* - Capacità di prevedere l'insorgenza della malattia nel breve periodo



Prevenzione e controllo

- ❑ Il controllo della peste americana si basa essenzialmente sull'applicazione di adeguate misure di prevenzione e sulla diagnosi clinica precoce



Prevenzione e controllo

Applicazione delle Buone Pratiche Apistiche

↓
Obiettivo

↓
Riduzione presenza spore

↓
Riduzione prevalenza infezioni subcliniche

↓
Riduzione prevalenza forme cliniche



Trattamenti in caso di P.A.

Distruzione mediante incenerimento

❑ Soppressione: eliminazione colonie ammalate e bonifica del materiale



Trattamenti in caso di P.A. Messa a sciame (cura famis)

- ❑ Trasferire le api in un'arnia nuova con fogli cerei non lavorati
- ❑ Eliminazione dei vecchi favi
- ❑ Nessuna alimentazione artificiale per 5 giorni
- ❑ Cambio regina!
- ❑ Ipotizzabile solo con infezioni molto precoci



Prevenzione e controllo

Sviluppo di strategie per il controllo della malattia

- ❑ Selezione per la resistenza genetica alla malattia
- ❑ Biocontrollo mediante batteri antagonisti e inibitori di P.larvae
- ❑ Trattamenti con sostanze antibatteriche naturali (oli essenziali di varie piante o propoli)



Prevenzione e controllo

“We have known for over 50 years that hygienic behavior is the main defense mechanism against American Foulbrood and chalkbrood. Why are we still using antibiotics and chemical solutions ?”

Dr. Marla Spivak



Batteri inibitori di *P.larvae*



Batteri inibitori di *P.larvae* da noi isolati nel periodo 2009-2012

- ❑ *Bacillus megaterium*
- ❑ *Bacillus amyloliquefaciens*
- ❑ *Bacillus pumilus*
- ❑ *Bacillus circulans*
- ❑ *Paenibacillus polimixa*



Grazie



29 06 2012