

NOSEMIASI



Peste americana e Nosemiasi in provincia di Firenze

Giovannelli Licia¹, Franco Corrias², Giovanni Brajon², Massimo Mari², Alice Piazza², Ilaria Paladini² e Alessandra Belli²

¹ Azienda Sanitaria Locale USL 10 Firenze, Zona Mugello

² 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.



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**



Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

CAMPIONAMENTO

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



Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

GENERALITA'

Regno **Funghi**
Classe **Microsporidia**
Genere **Nosema**

**Nosema
apis**

(Zander, 1909)

**Nosema
ceranae**

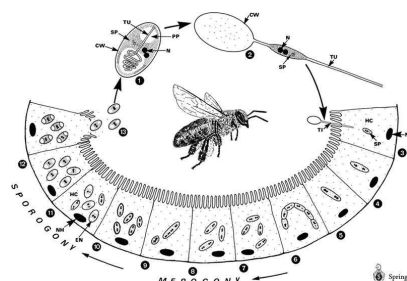
(Fries *et al.*, 1996)

(Higes *et al.*, 2006)

*Apis
mellifera*

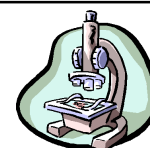
Apis cerana

Malattia infettiva soggetta a **denuncia
obbligatoria** ai sensi del RPV (art.154-158
D.P.R. 320/1954)



Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

ESAME MICROSCOPICO



MICROSCOPIO OTTICO

Visualizzazione delle caratteristiche
spore ovali e rifrangenti

N.ceranae: 4,4 µm x 2,2 µm

N.apis : 6 µm x 3 µm

Presenza/assenza *Nosema spp.*

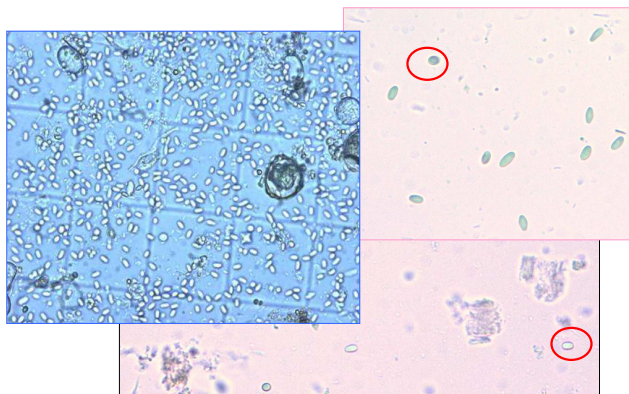
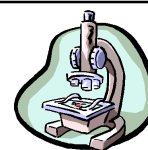


Ingrandimento 400X



Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

ESAME MICROSCOPICO



Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

ESAME MICROSCOPICO

allestimento del campione

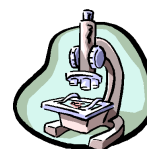


Separare almeno 20 addomi
dai toraci



Omogeneizzare con H₂O distillata

Porre una goccia su vetrino con copri-oggetto



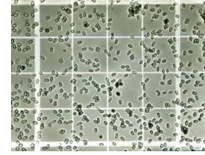
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

ESAME MICROSCOPICO

conta delle spore

- PROTOCOLLO

- omogeneizzare almeno 20 addomi di api operaie adulte
mediante pestello con l'aggiunta di 1 ml di H₂O distillata per addome



Lettura mediante Camera di Burkner

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

LIVELLI DI INFEZIONE

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

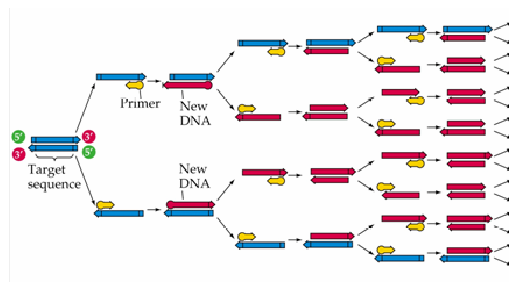
Sensibilità pari a 10.000 spore/ape



Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

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***



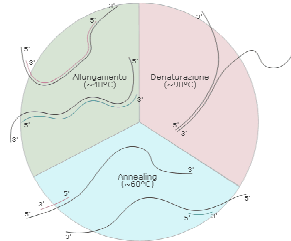
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

TECNICHE BIOMOLECOLARI

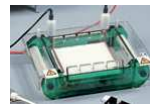


Estrazione Acidi Nucleici

Amplificazione Acidi Nucleici



Controllo dell'amplificato
mediante gel elettroforesi



Digestione Enzimatica



Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

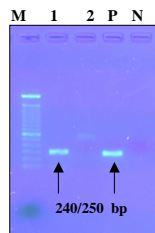
TECNICHE BIOMOLECOLARI

Estrazione DNA

PCR di conferma

(Higes *et al.*, 2006)

Primer	Sequenza Nucleotidica
NOS For	5'-TGC CGA CGA TGT GAT ATG AG - 3'
NOS Rev	5'-CAC AGC ATC CAT TGA AAA CG - 3'



Amplificazione di una **regione conservata** del **gene** che codifica per la subunità ribosomiale 16S **comune** a *Nosema apis* e a *Nosema ceranae*.

240 bp *N. apis* 252 bp *N. ceranae*

Presenza/assenza *Nosema spp.*



Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

TECNICHE BIOMOLECOLARI

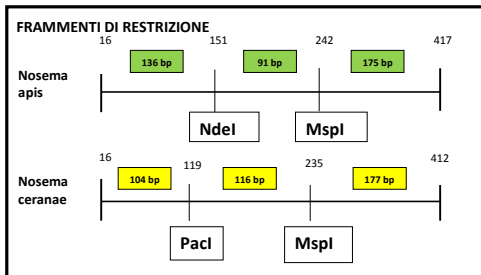
Digestione enzimatica

(Klee *et al.*, 2007)

PCR

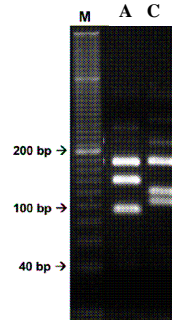
Primer	Sequenza Nucleotidica
SSU-res-f1	5'- GCC TGA CGT AGA CGC TAT TC - 3'
SSU-res-r1	5'- GTA TTA CCG CGC CTG CTG G - 3'

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)



417 bp *N. apis*

412 bp *N. ceranae*



**Distinzione
*Nosema ceranae/apis***



Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana