

***PATOLOGIE E
AVVERSITA' DELLE API:
tecniche diagnostiche e
di campionamento***

Dr. Emanuele Carpana

Ispezioni diagnostiche nella profilassi delle malattie infettive e parassitarie delle api

- Diagnosticare in modo corretta e tempestivo una patologia in atto
- Individuare e valutare infezioni a livello latente o sub-clinico (es. peste americana, virosi ...)
- Controllare la presenza di un parassita o il livello della sua popolazione (es. varroosi)

Difficoltà nel riconoscimento delle cause di malattia dell'alveare

- Diverse patologie producono una sintomatologia non caratteristica o generica
- A volte gli effetti dei patogeni sulla salute dell'alveare sono latenti o comunque indiretti
- Molte infezioni sono diffuse a livello sub-clinico
- Nell'alveare sono presenti più agenti patogeni, con effetti a volte collegati o sinergici
- I fattori esterni possono interferire nella determinazione del quadro clinico

Tecniche diagnostiche

IN CAMPO

- Esame dei sintomi
- Ricerca del parassita e verifica del livello di presenza (es. n. varroe sul fondo diagnostico)
- Applicazione di Kit diagnostici a scopo di conferma

Tecniche diagnostiche

IN LABORATORIO

- Esame microscopico
- Prove microbiologiche: isolamento dei microrganismi, identificazione mediante esami colturali, biochimici.
- Prove sierologiche (ID, ISEM, ELISA, ...)
- Analisi di genetica molecolare (PCR, ecc.)

Infezioni batteriche

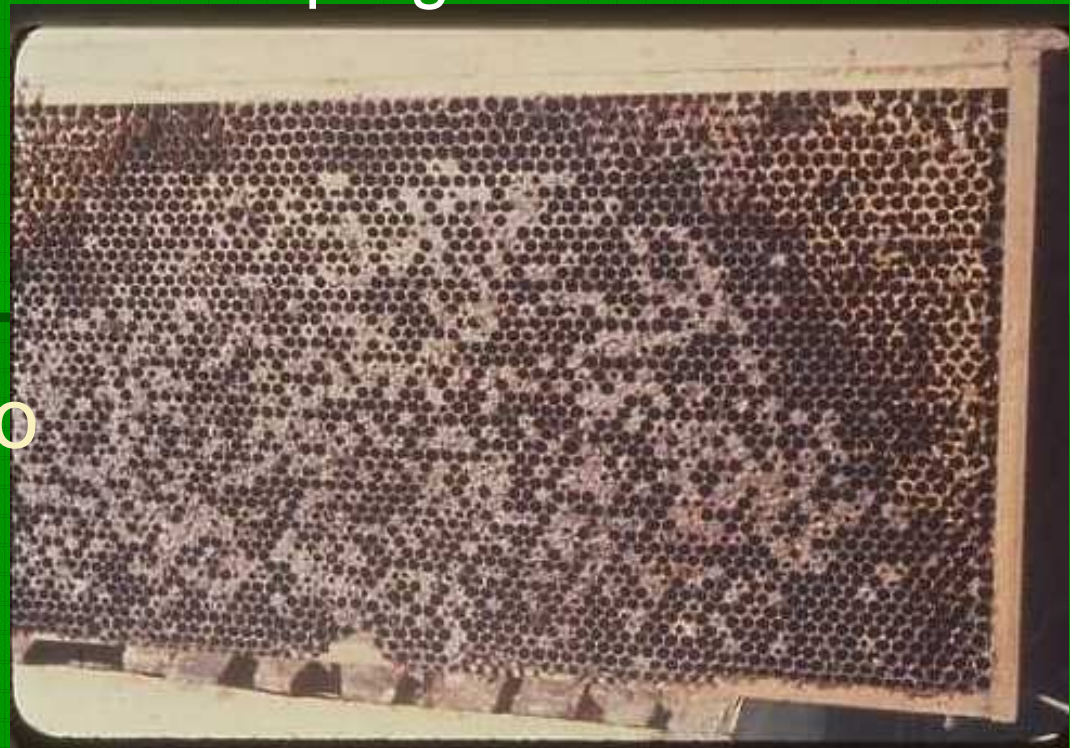
AGENTE EZIOLOGICO	MALATTIA	STADIO COLPITO
<i>Paenibacillus larvae</i>	Peste americana	Covata
<i>Melissococcus pluton</i>	Peste europea	Covata
<i>Pseudomonas apiseptica</i> ecc.	Setticemia	Adulti

Peste americana

Sintomi

I sintomi si manifestano ad uno stadio relativamente avanzato dell'infezione. Sono caratteristici e consentono una diagnosi di campo generalmente attendibile

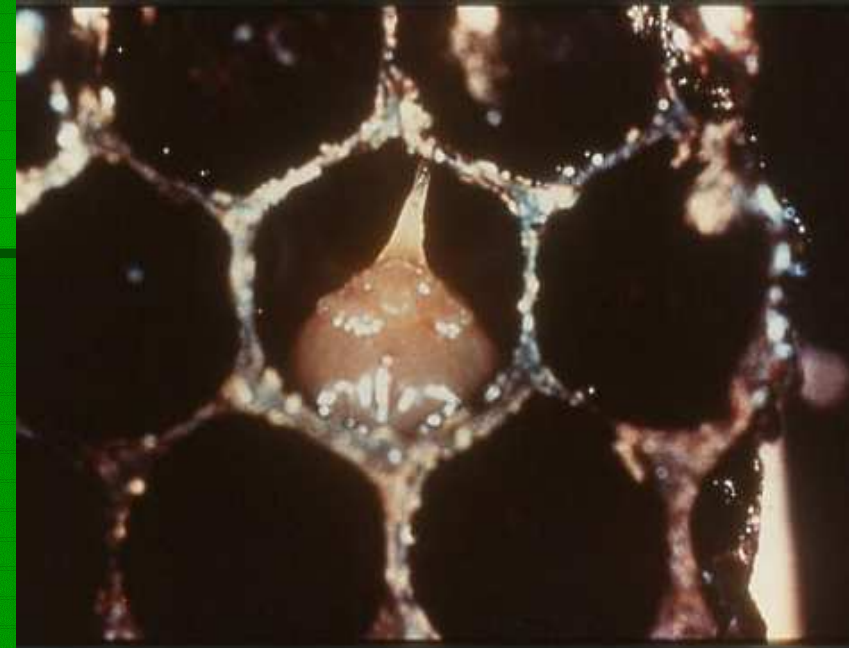
- covata irregolare
- odore caratteristico



- Opercoli depressi e forati



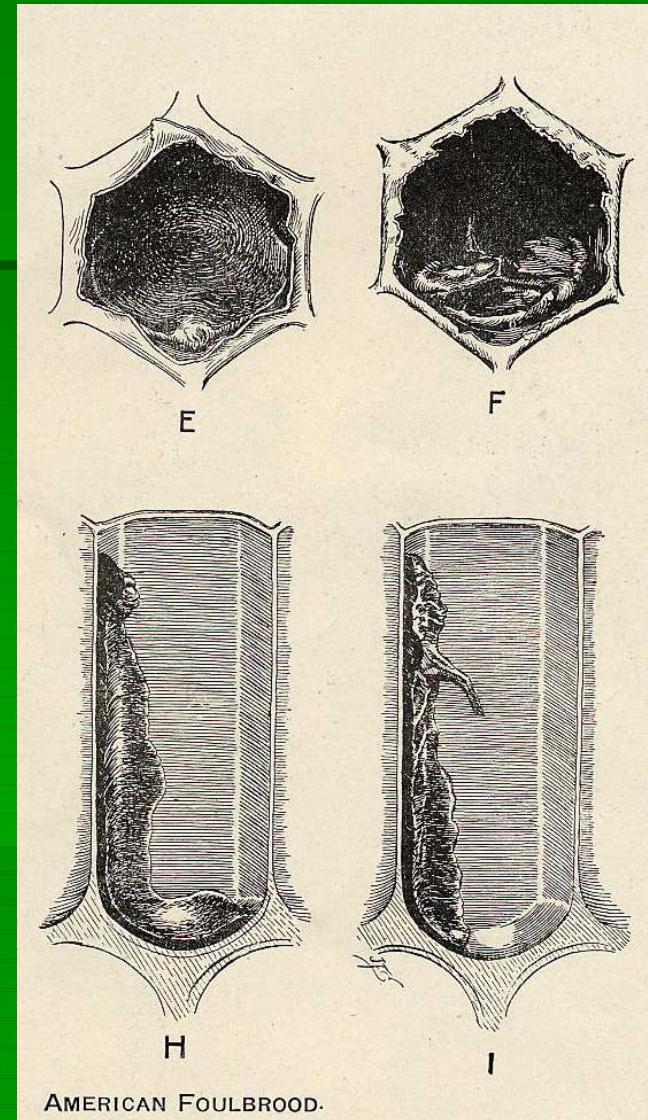
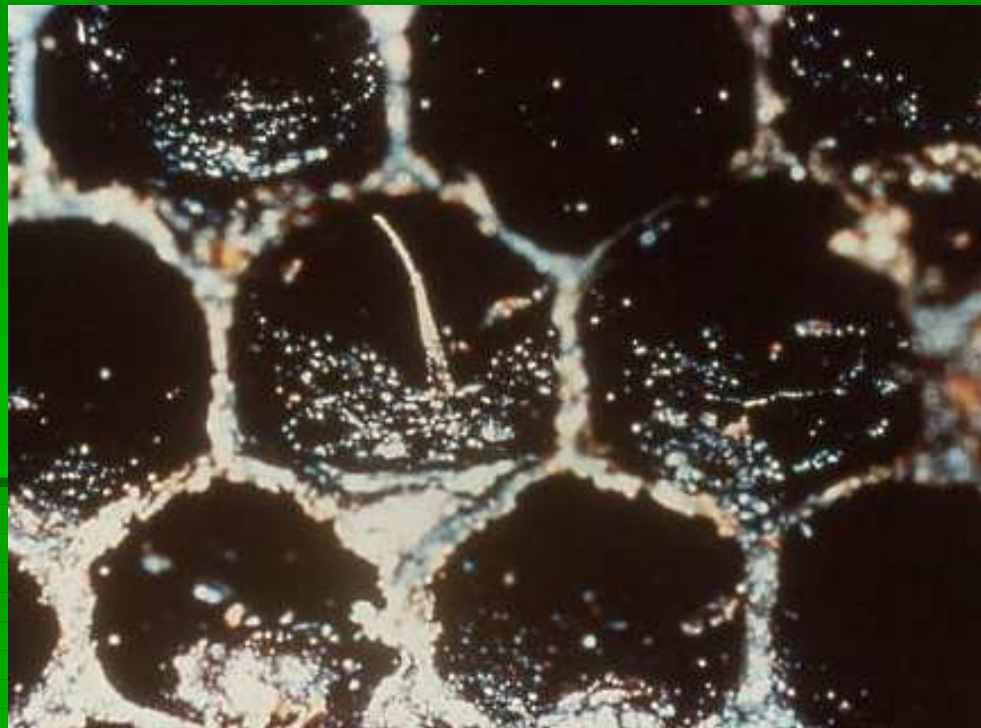
- Trasformazioni delle larve



Consistenza viscosa,
3-4 settimane dalla morte

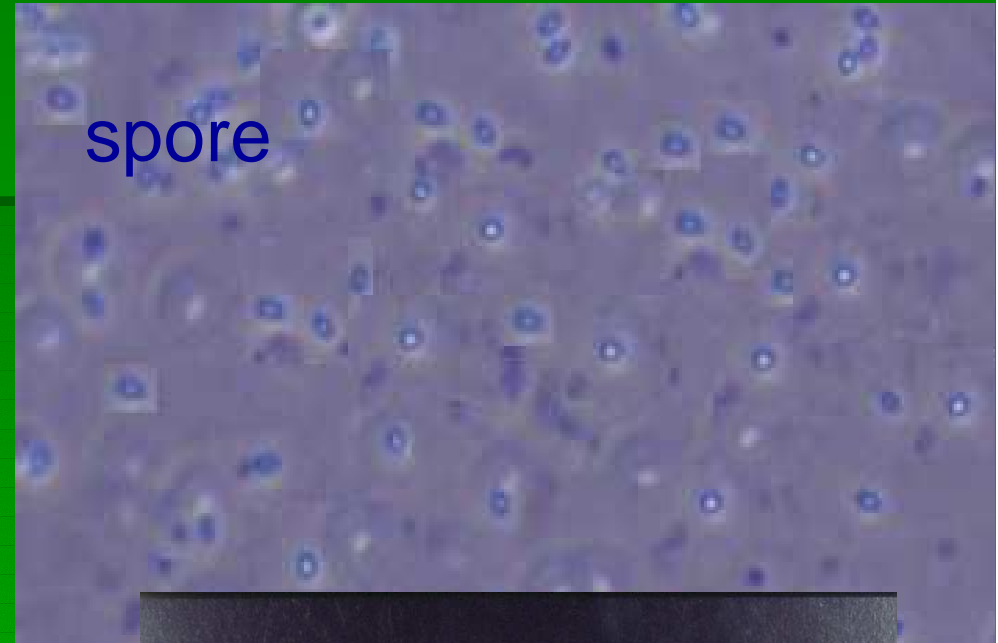


Scaglia, 6-7 settimane dalla morte



Identificazione agente eziologico

Paenibacillus larvae

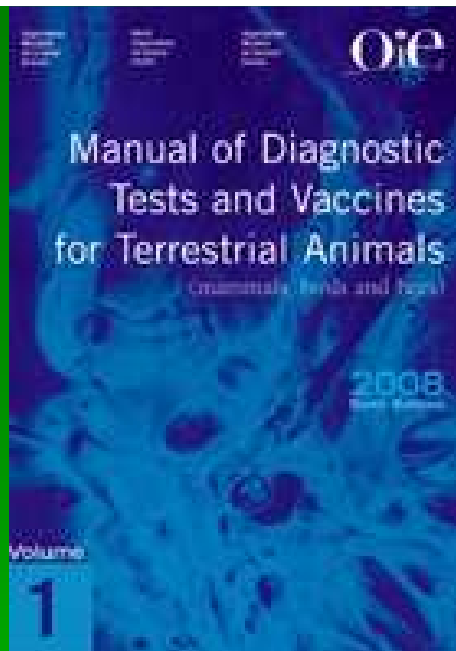


Ispezioni diagnostiche a scopo preventivo

Ricerca delle spore di P. larvae nelle matrici dell'alveare

*Attraverso la ricerca delle spore in miele, api,
residui invernali è possibile:*

- Evidenziare l'infezione allo stato sub-clinico (diagnosi precoce per la prevenzione)
- Monitorare lo stato sanitario di un'azienda o di un territorio nell'ambito di piani di risanamento



Metodi diagnostici Manuale Oie

CHAPTER 2.2.2.

AMERICAN FOULBROOD OF HONEY BEES

ii) Samples for AFB monitoring/prevention programmes

To prevent the propagation of diseased brood, honey, adult bee and debris samples can be used to detect AFB in colonies where no clinical signs are observed. Routine collection of samples from colonies or from harvested honey can be used as part of an operational or regional AFB detection programme.

Microscopic examination of smears from larvae with no clinical signs is far less sensitive at detecting spores in colonies compared with bacteriological or PCR-based methods. In fact, bacteriological and PCR-based methods will often detect spores in colonies that never develop clinical signs of AFB. High numbers of spores cultured from honey and bee samples using bacteriological methods, however, can often predict the presence of clinical AFB signs at colony, apiary and operational levels.

Raccolta campioni per la ricerca delle spore

a) Miele: - a fine inverno dal 20% alveari
- dopo la smielatura dai decantatori

b) Api

c) Detriti sul fondo dell'arnia a fine inverno
nel cassetto o nel talaietto

Telaietti per la raccolta dei detriti invernali

Metodo proposto da Bee Research Institute, Dol, Repubblica Ceca

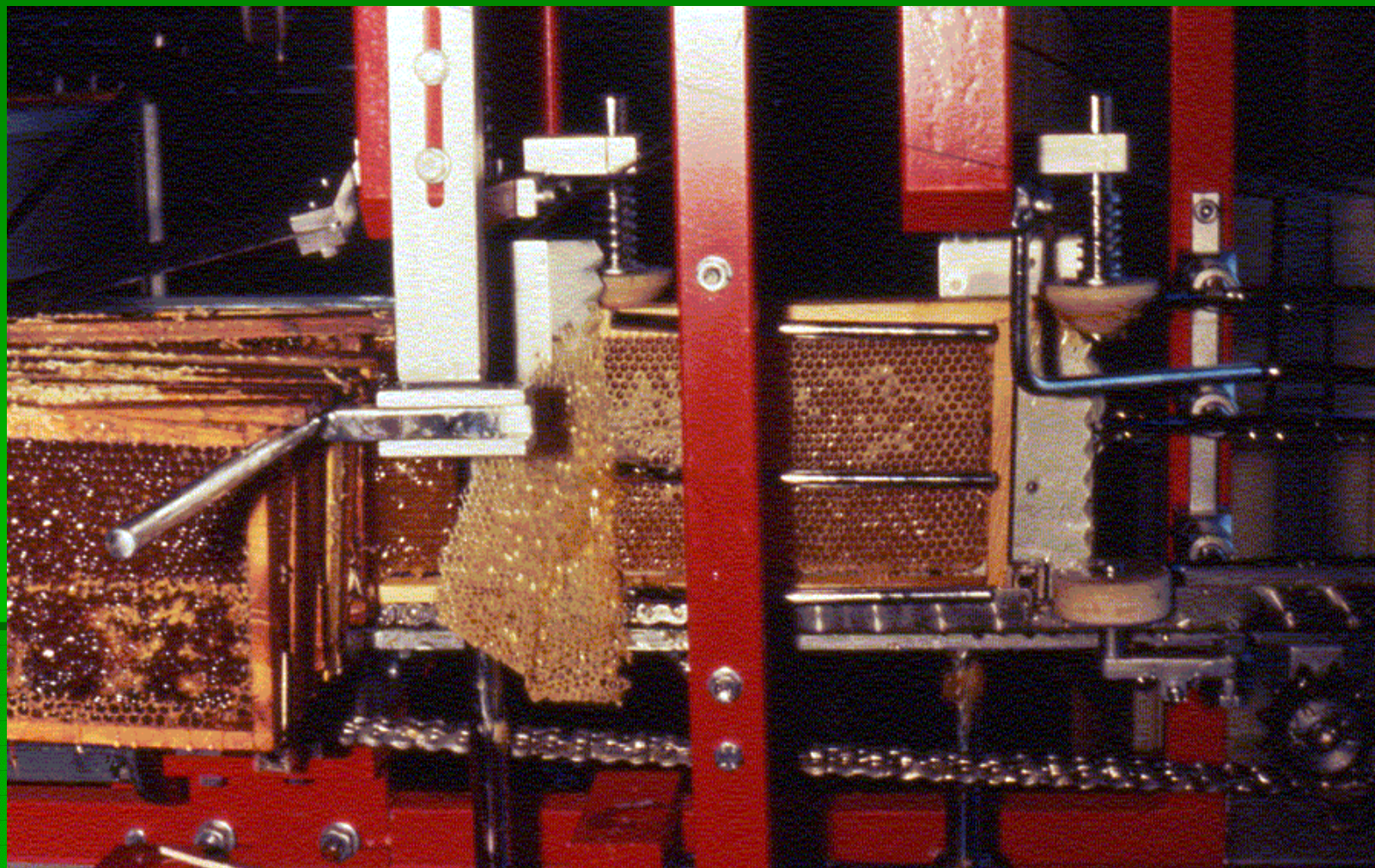


Campionamento per l'analisi delle spore

In campo

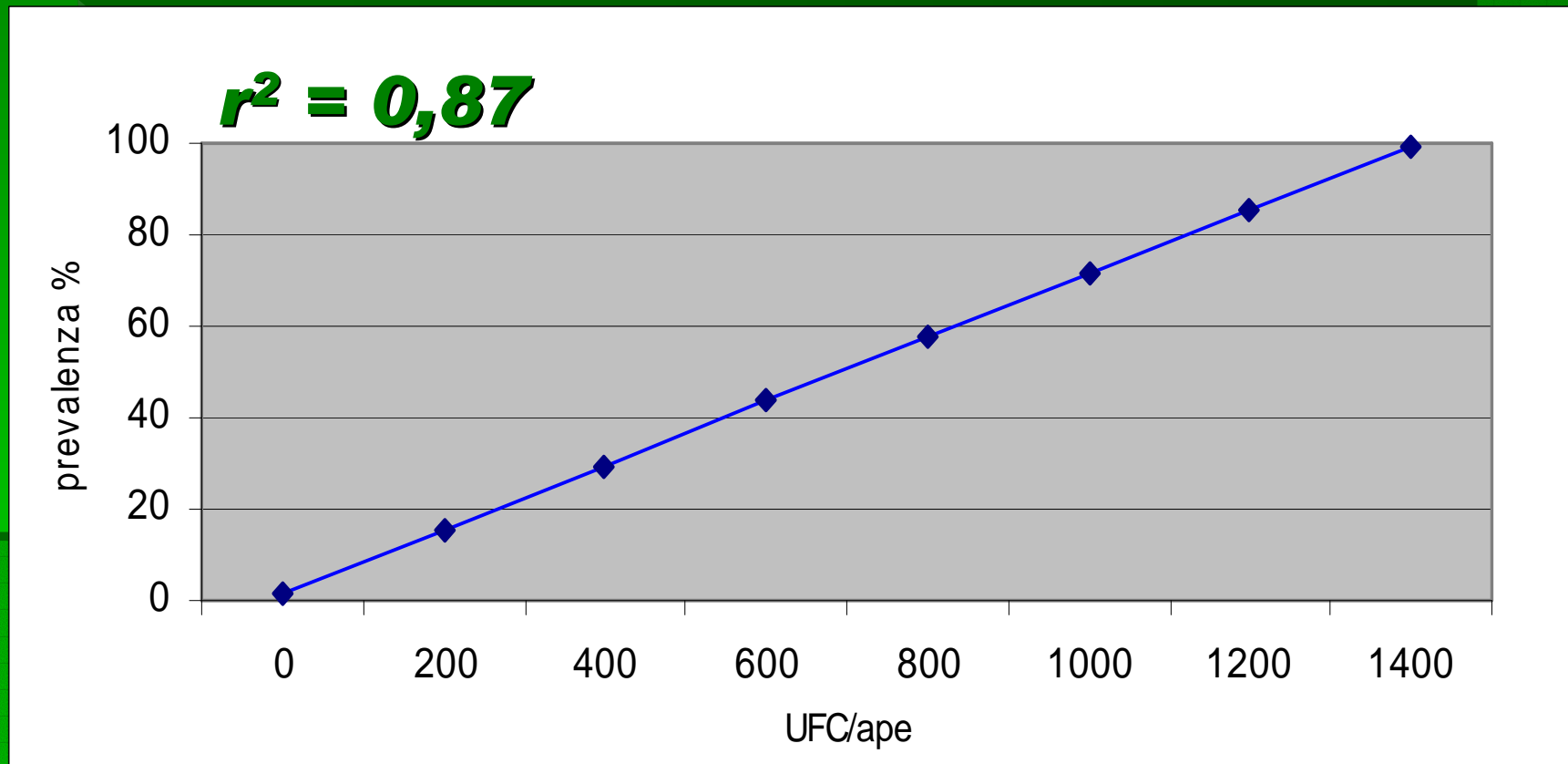


In fase di lavorazione





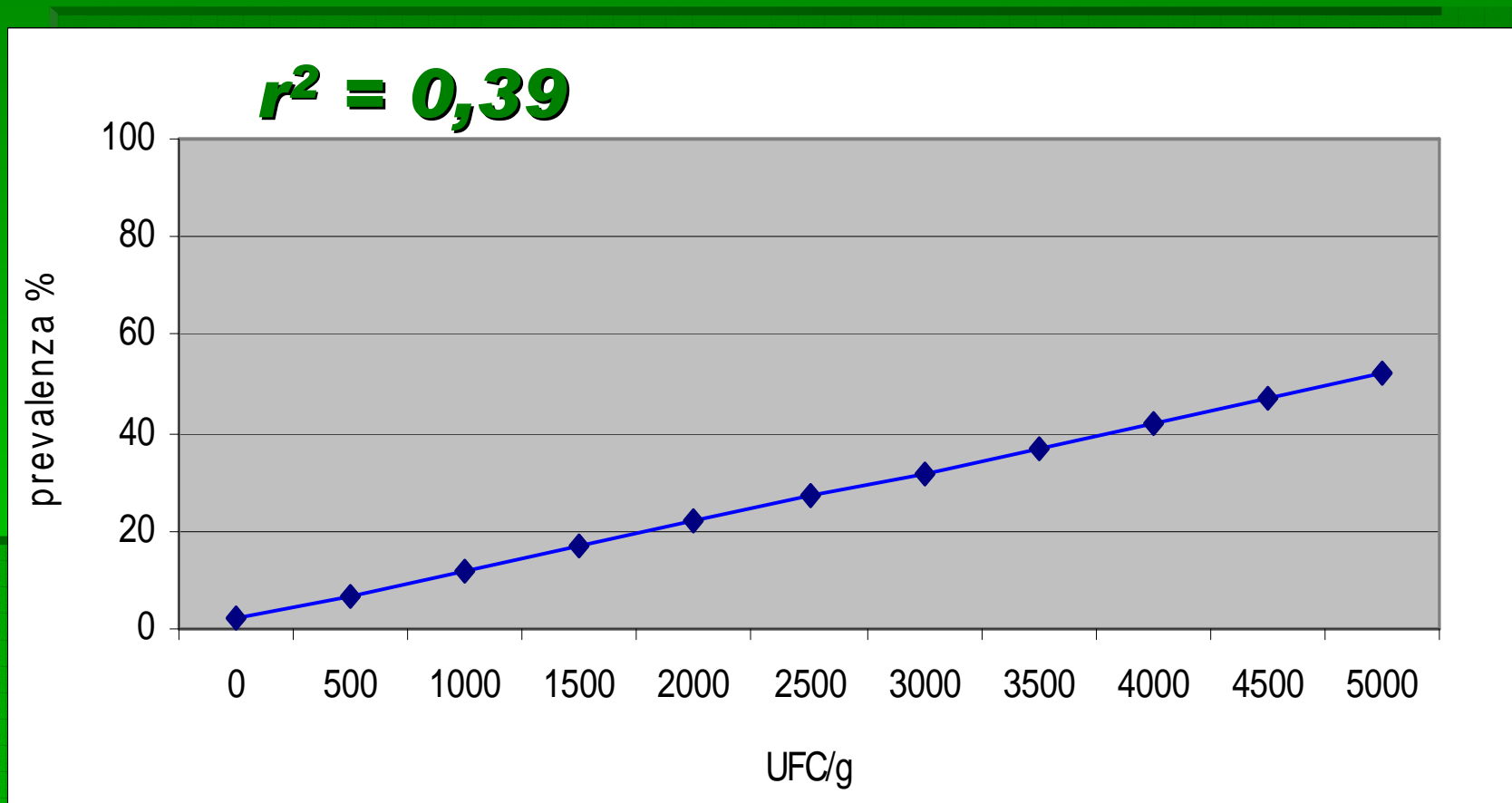
Esame delle api (100 api per campione) n° medio spore - prevalenza PA in azienda



Da: Pernal e Melathopoulos - Canada (Apiacta 2006)

Esame del miele

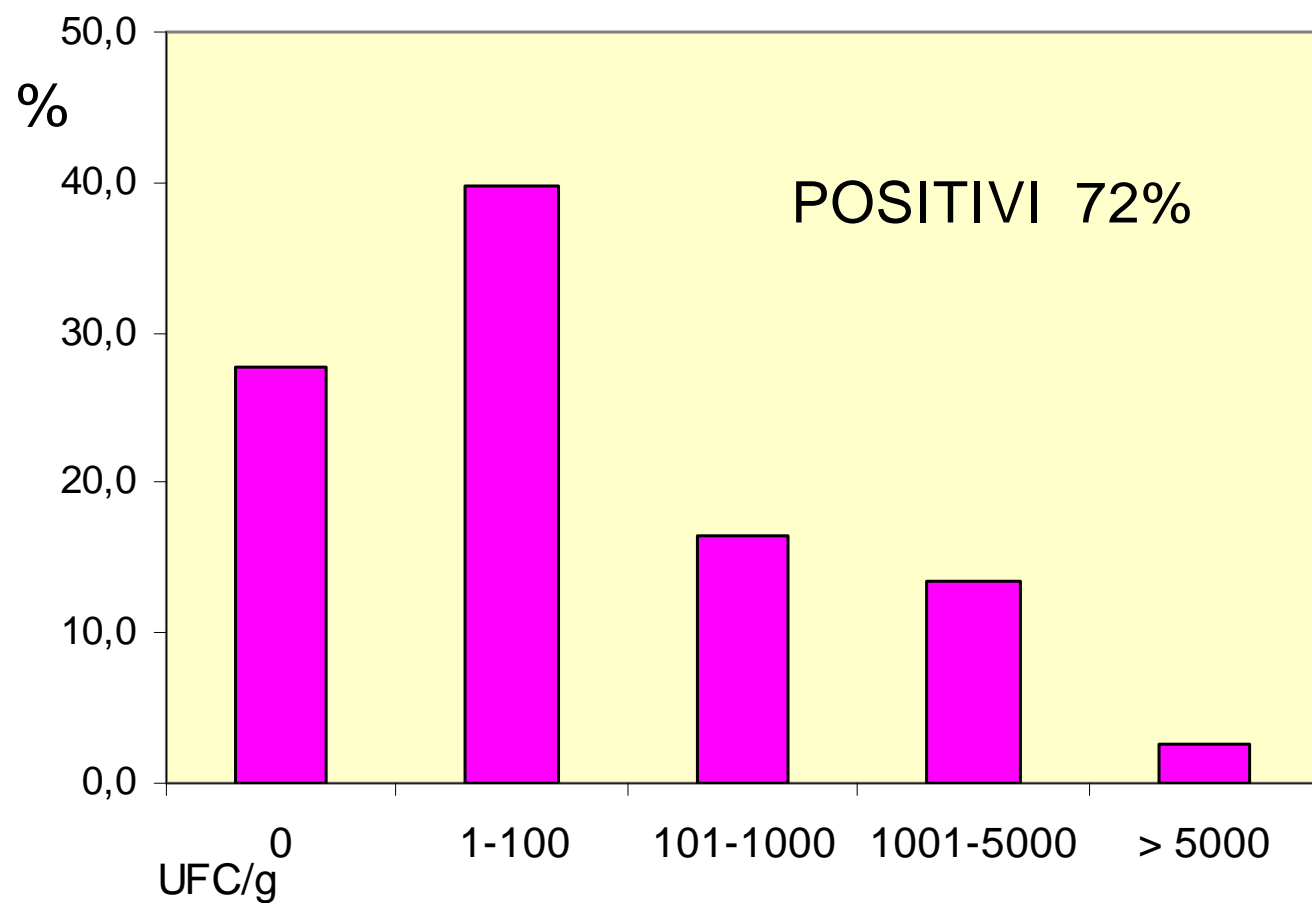
n° medio spore -prevalenza PA in azienda



Da: Pernal e Melathopoulos - Canada (Apiacta 2006)

Indagine territoriale

Esame del miele di massa delle aziende apistiche



Peste europea

Sintomi



Mortalità di solito 1-2 giorni
prima dell'opercolatura



Mortalità anche dopo l'opercolatura



Test immunologico di campo

3 larve disopercolate
per test



probabilità di falsi
negativi < 5%



Preparazione del campione per il laboratorio



Diagnosi eziologica

1) **Esame microscopico:**
riconoscimento quadro
microbiologico tipico

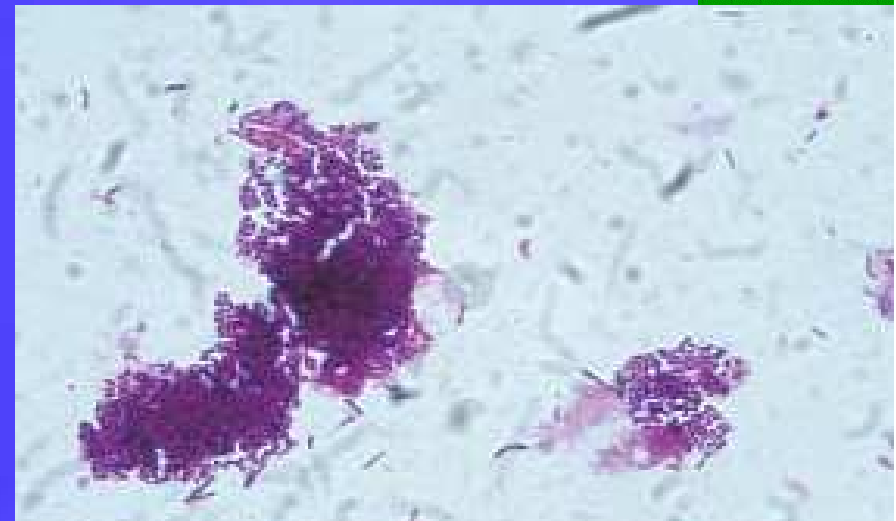
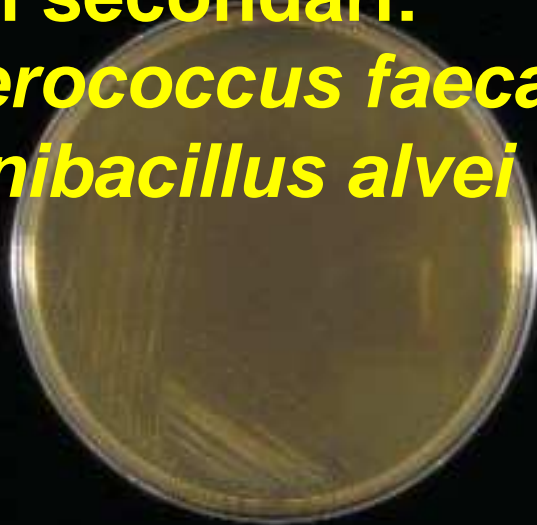
2) **Isolamento e identificazione:**
agente primario:

- ***Melissococcus plutonius***

agenti secondari:

- ***Enterococcus faecalis***

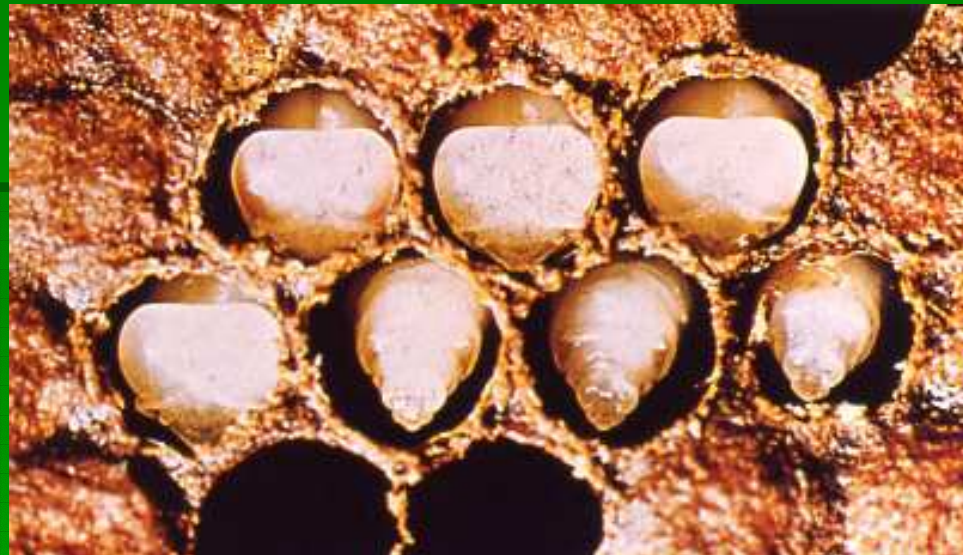
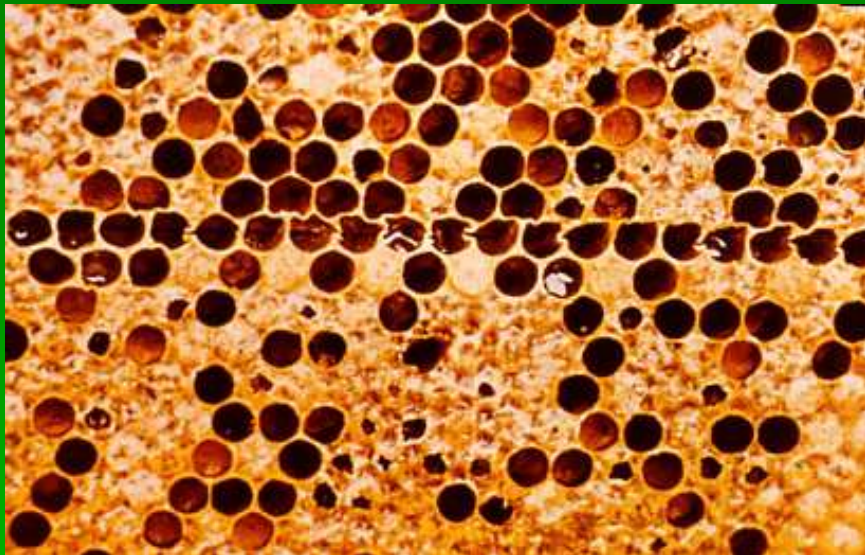
- ***Paenibacillus alvei***



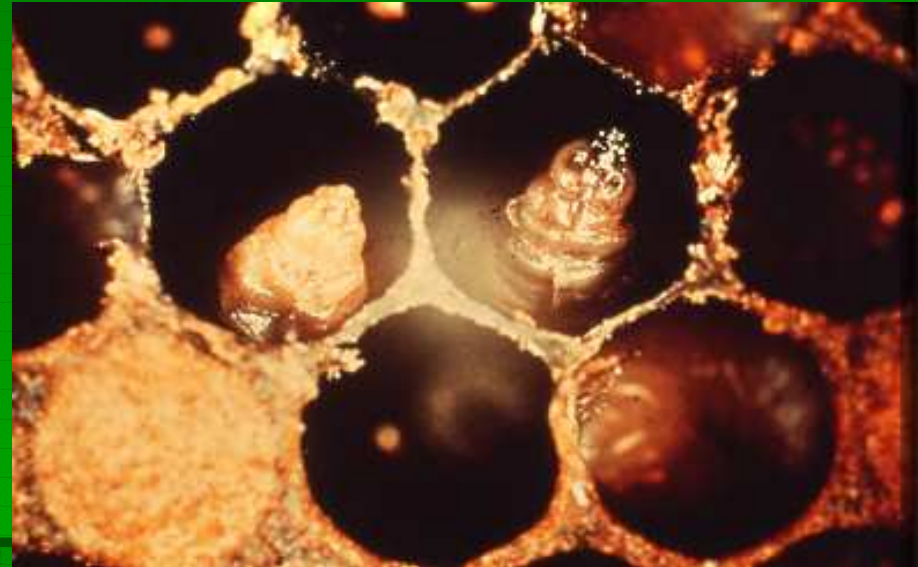
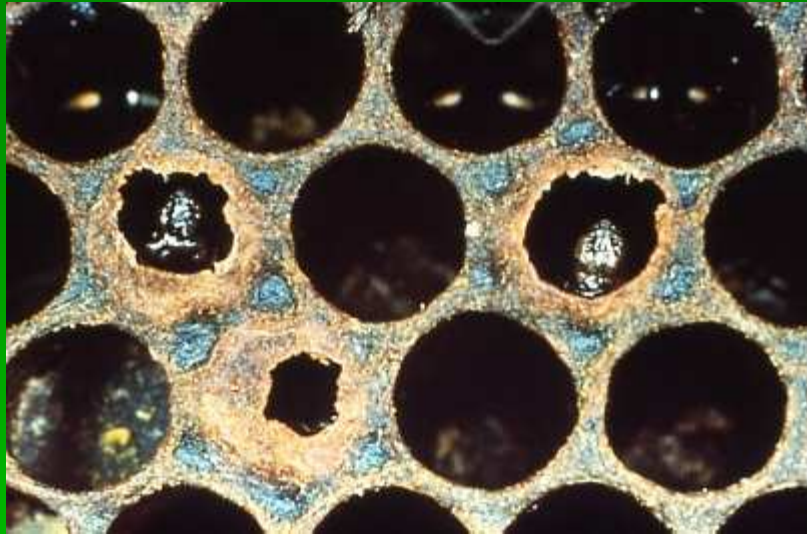
Infezioni virali

- Una quindicina di tipi virali in *A. mellifera*;
prime Identificazioni nel 1963
- Diffuse come infezioni inapparenti, persistenti e multiple
- Colpiscono tutti gli stadi di sviluppo dell'ape
- Effetti diversi per tipo e intensità con scarsi indicatori sintomatologici
- Spesso associate ad altri agenti patogeni

Virus della covata a sacco



Mortalità in stadio di propupa

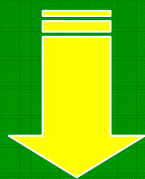


Effetti subclinici sulle api adulte

Virus della paralisi cronica (CBPV)

Sindrome 1 :
Paralisi
(mal della foresta)

Api tremanti, incapaci
di volare, a "gruppetti".
Addome rigonfio.
Ali divaricate.



Spopolamento
Collasso.



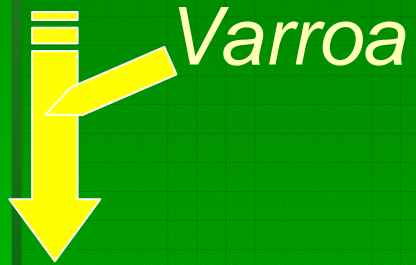
Sindrome 2 : **Mal nero**

Api depilate con
l'addome lucido e
scuro, tremanti e
incapaci di volare



Virus della paralisi acuta (ABPV)

Infezione
latente

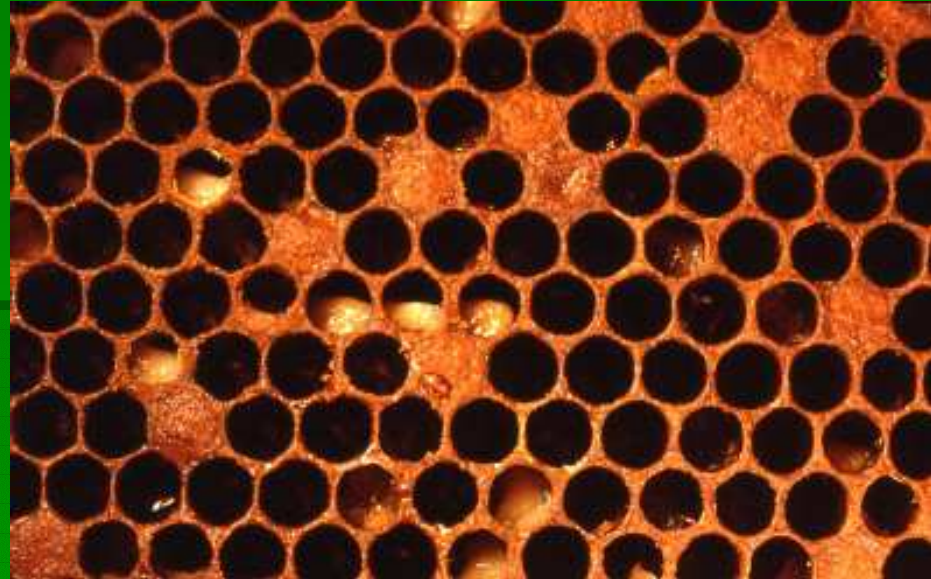


Infezione
clinica adulti
e covata



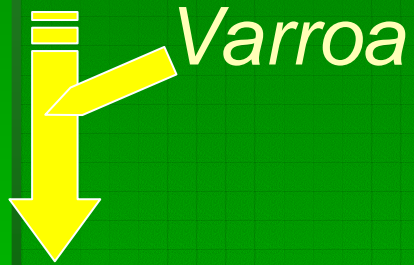
Sintomi paralisi acuta

- mortalità api a larve
- Effetti subclinici sulle api adulte (longevità e comportamento)



Virus delle ali deformate (DWV)

Infezione
latente



Infezione
clinica adulti
e covata



Virus Kashmir (KBV)

- infezione normalmente inapparente
- molto virulento in laboratorio
- Effetti patologici in campo non ben chiariti
 - USA: sindrome da acari (associazione con varroasi)
 - NZ: KBV associato con nosema o peste europea
 - Europa: mortalità invernali non chiaramente attribuite a KBV. Isolato in Germania, Francia, Spagna e Lussemburgo e UK

Virus della cella reale nera (BQCV)

- Infezione larve di regina e raramente di operaia
- infezione api adulte in associazione con la noseiasi
- amplificazione effetti noseiasi: riduzione longevità, mortalità invernale

Virus X (BVX)

- infezione intestino api vecchie (soprattutto invernali), spesso in associazione con l'amebiasi, di cui condivide la via di trasmissione
- a sviluppo lento, potenzialmente dannoso solo per le api svernanti, con effetti di riduzione della durata di vita

Virus delle ali opache (CWV)

- molto diffuso, soprattutto a livello latente
- infezione di api adulte e larve
- non è associato a effetti patologici particolari, ma si ipotizza il suo concorso in casi di indebolimento e collasso di colonie infette

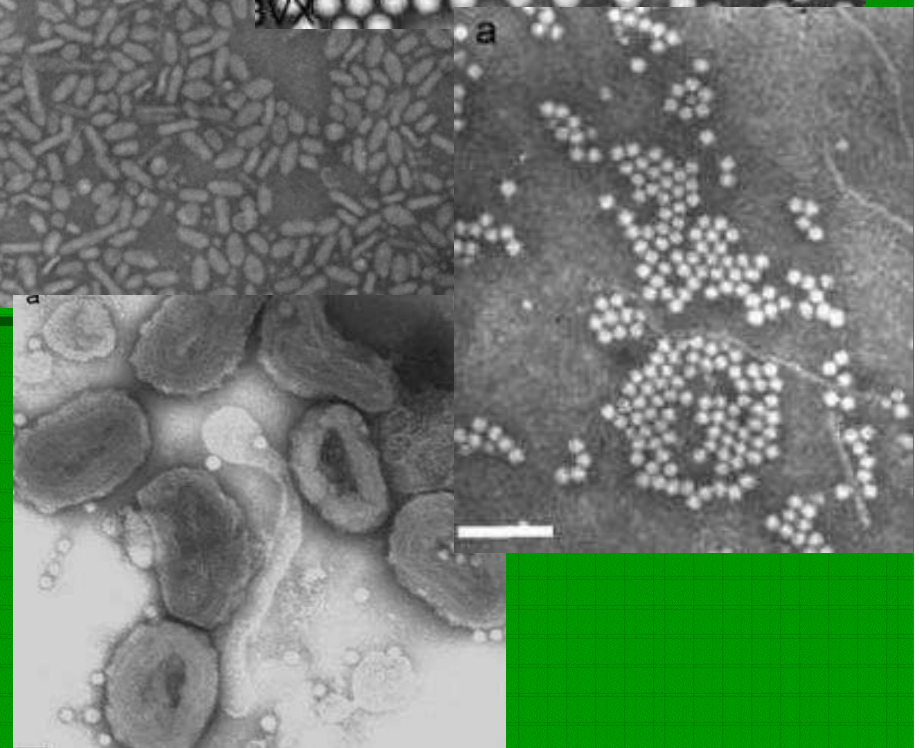
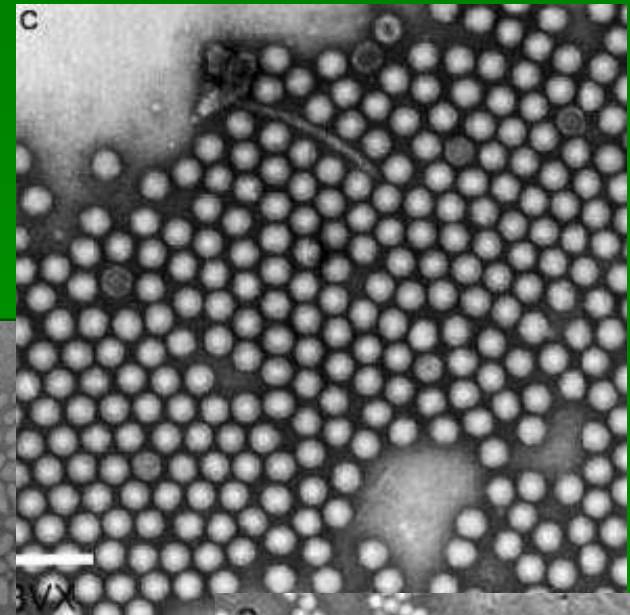
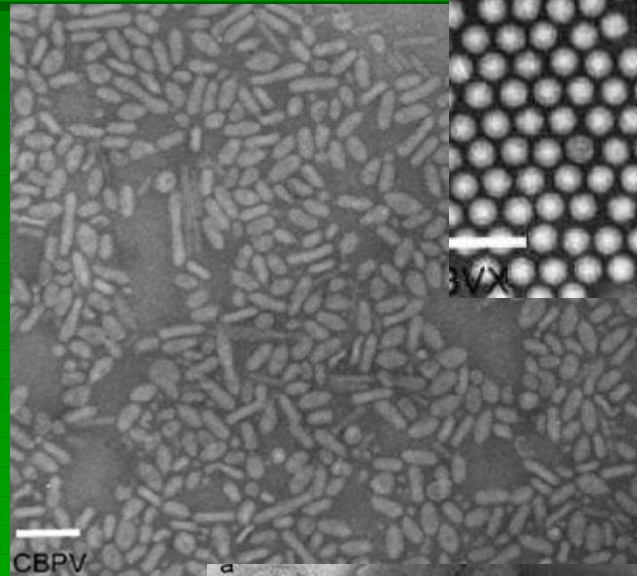
Virus israeliano della paralisi acuta (IAPV)

- Scoperto nel 2004 negli USA, successivamente isolato anche in Australia
- Associato in modo significativo con la sindrome CCD (colony collapse disorder)
- Provoca paralisi e mortalità delle api adulte, con effetti di evidente spopolamento delle colonie
- Può essere trasmesso dalla varroa

Identificazione dei virus

Metodi diversi per
sensibilità
e specificità

- ❑ Microscopia elettronica
- ❑ Metodi immunologici
- ❑ Metodi molecolari



Miceti di interesse patologico per le api

Specie	Individui colpiti	Comportamento
Ascospaerales		
<i>Ascospaera apis</i>	covata	parassita (covata calcificata)
<i>Ascospaera major</i>	covata	parassita facoltativo
<i>Bettsia alvei</i>	-	saprofita: "muffa del polline"
Aspergillus		
<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspegillus fumigatus</i>	adulti e covata	saprofita / parassita (covata pietrificata)
Lieviti		
<i>Torulopsis spp</i>	intestino adulti	patogeni occasionali
Altri		
Fungo non identificato	organi riproduttori ape regina	patogeni occasionali (melanosi api regine)
Miceti vari	-	saprofiti, patogeni occasionali

Covata calcificata

Sintomi

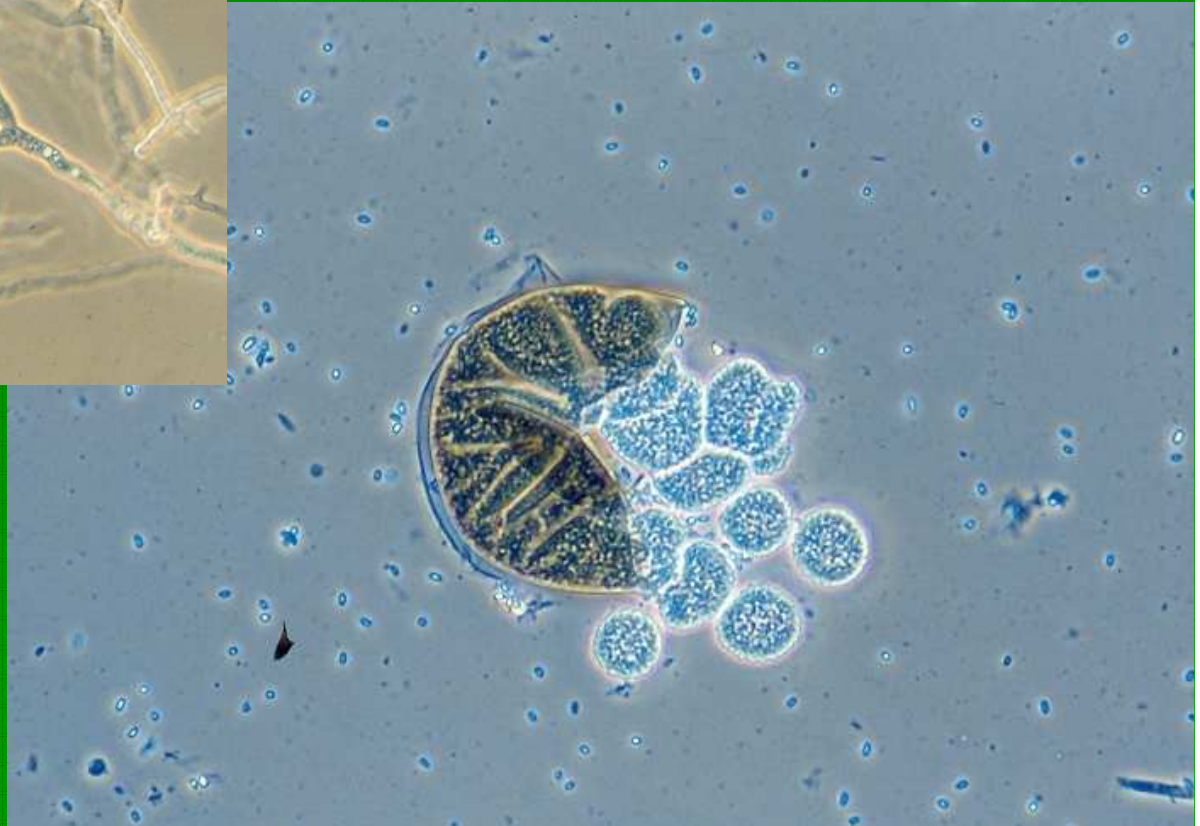
Mummificazione -
calcificazione





La malattia rimane inosservata se l'infezione non supera il 12%.

Identificazione agente eziologico

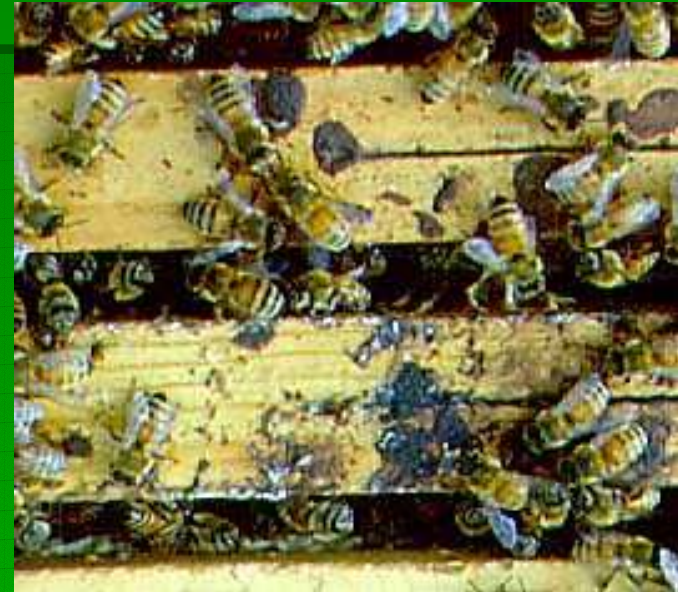


Nosemiasi

- ✓ *Nosema apis*
- ✓ *Nosema ceranae*

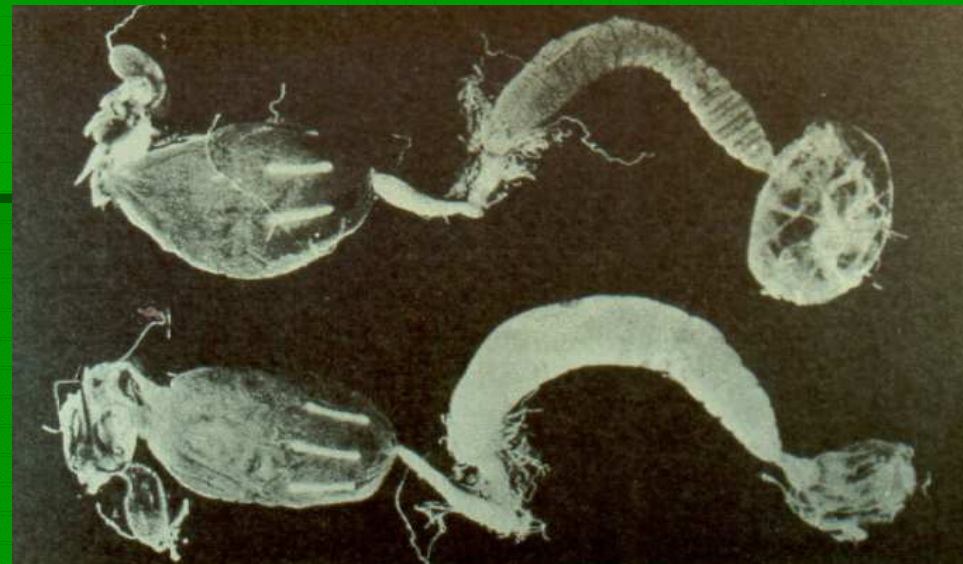
Effetti e sintomi

- ❑ Ridotta longevità api
- ❑ Mortalità invernale
- ❑ Orfanità
- ❑ Lento sviluppo primaverile
- ❑ Riduzione della produzione
- ❑ Diarrea
- ❑ Maggiore suscettibilità ad altri patogeni (*Malpighamoeba mellificae*, virus)

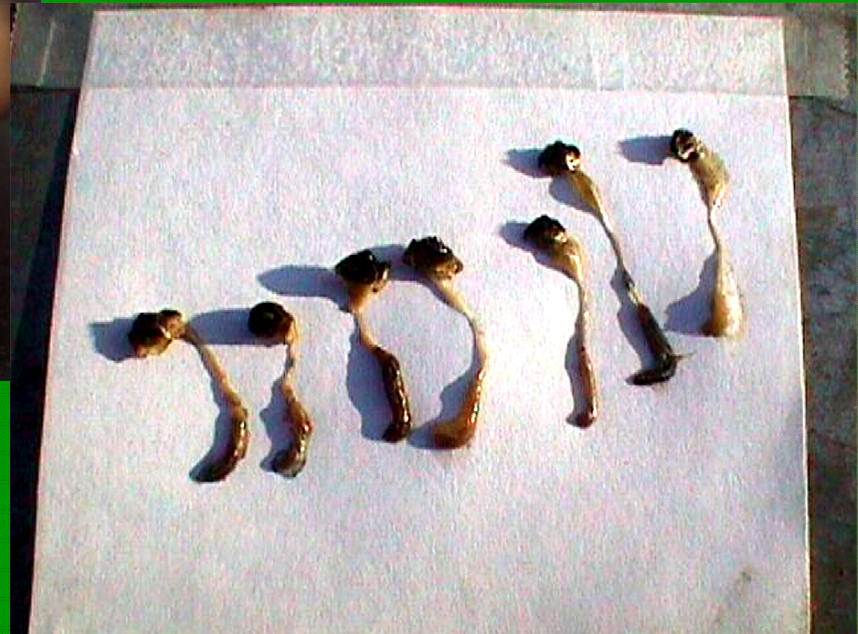


Esami diagnostici

Addome rigonfio,
intestino dilatato
e biancastro



Prelievo intestino



Campionamento

Almeno 60 api di età
8 gg



Almeno 5% api
malate ($P = 5\%$)

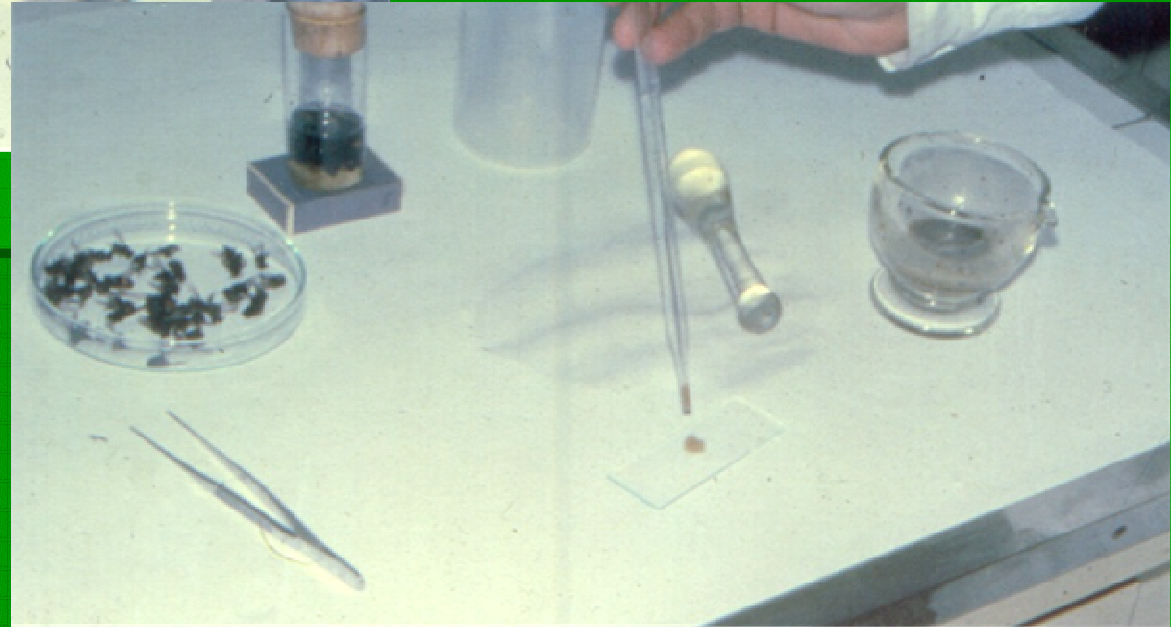
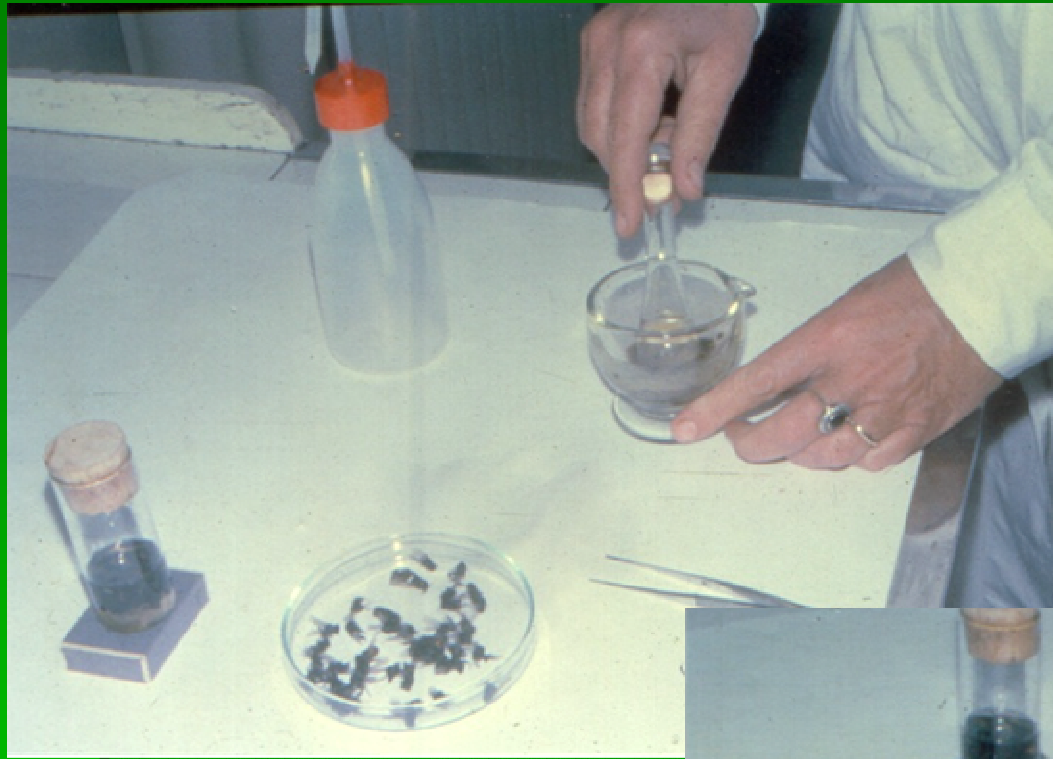


70% etanolo
4% formolo
congelamento

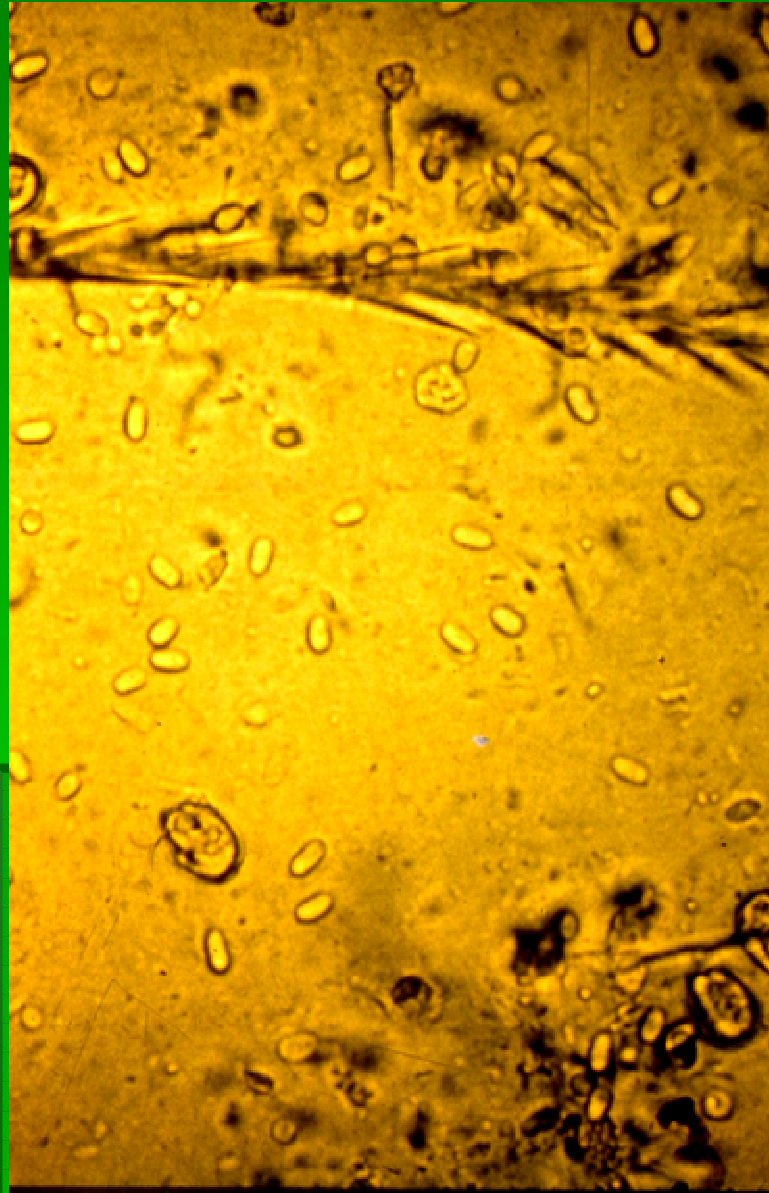
Trattamento campione api



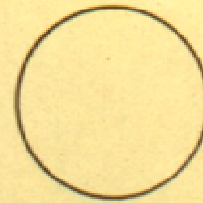
Trattamento campione api



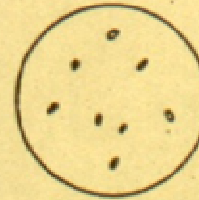
Esame microscopico contenuto intestinale



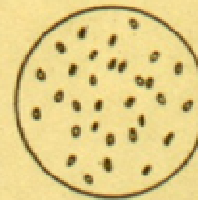
Valutazione dell'entità dell'infezione



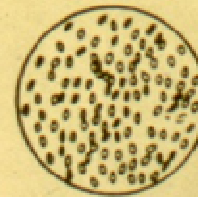
0 : Kein Befall
pas d'infection



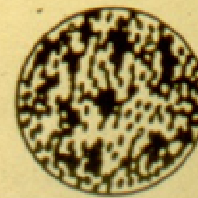
1 : Schwacher Befall
infection faible



2 : Mittlerer Befall
infection moyenne



3 : Starker Befall
infection forte



4 : Sehr starker Befall
infection très forte

Varroasi

Effetti sulle api

- Depauperamento emolinfa pupe e api adulte
- Riduzione peso api operaie (6-25%)
- Riduzione longevità (34-68%)
- Infezioni secondarie (specialmente virali)

Sintomi

- Spopolamento o indebolimento delle colonie
- Agitazione
- Api emergenti deformi o di dimensioni ridotte
- Paralisi api adulte
- Mortalità anomala api adulte
- Mortalità covata

Tecniche diagnostiche per valutare la consistenza numerica della popolazione di acari

- Rimozione e conteggio degli acari da campioni di api adulte
- Rimozione e conteggio degli acari dalle celle di covata opercolata



- **Raccolta e conteggio degli acari dal telaino diagnostico (dopo trattamento acaricida o periodicamente per rilevare la caduta naturale)**
- **Ricerca degli escreti dell'acaro nelle celle**



Valutazione mortalità api

Gabbie underbasket



Principali sostanze che possono residuare nel miele e riferimenti normativi

		L. 283/19 62	D. lgs. 179/2004	D.M. 19/5/2000	Reg. CE 2377/1990	D. lgs. 158/06 PNR
ACARICIDI	BROMOPROPILATO			10 ppb		
	COUMAFOS				100 ppb	
	CYMIAZOLO				1000 ppb	
	FLUVALINATE			10 ppb	no LMR	
	AMITRAZ				200 ppb	
	ACIDO FORMICO				no LMR	
	ACIDO OSSALICO				no LMR	
	ACIDO LATTICO				no LMR	
	CANFORA				no LMR	
	TIMOLO				no LMR	
	EUCALIPTOLO				no LMR	
	MENTOLO				no LMR	
	FLUMETRINA				no LMR	
ANTIBIOTICI	TETRACICLINE	assenza	assenza			X
	SULFAMIDICI	assenza	assenza			X
	STREPTOMICINA	assenza	assenza			X
	TILOSINA	assenza	assenza			X
	CLORAMFENCOLO	assenza	assenza			X

		L. 283/1962	D. lgs. 179/2004	D.M. 19/5/2000	Reg. CE 2377/1990	D. lgs. 158/06 PNR
PESTICIDI ORGANO- FOSFORATI	CLORFENVINFOS	assenza	assenza	10 ppb		X
	ALTRI	assenza	assenza	10 ppb		X
PIRETROIDI		assenza	assenza	10 ppb		X
PCB e DIOSSINE		assenza	assenza			X
METALLI PESANTI	PIOMBO					X
	CADMIO					X

Valori indicativi dei residui di acaricidi nel miele destinato al consumo e nella cera

PRINCIPIO ATTIVO	RESIDUI NEL MIELE	RESIDUI NELLA CERA
Fluvalinate	< 5 ppb	1000-5000 ppb
Bromopropilato	50 - 150 ppb	1000-5000 ppb
Cumafos	5-30 ppb	1000-5000 ppb
Timolo	-	150 – 40.000 ppb
Cimiazolo	100 ppb	-
Ac ossalico	contenuto naturale	-
Ac. Formico	contenuto naturale	-

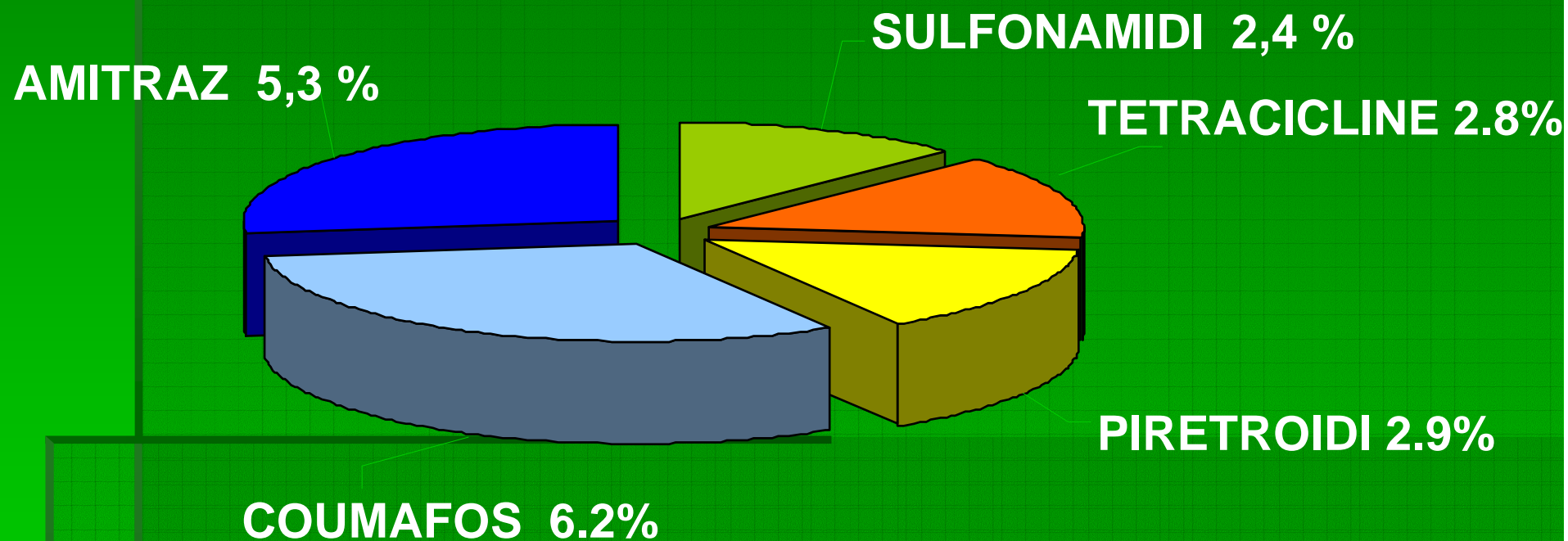
Campionamento per analisi di contaminanti chimici

- Api: 250
- Miele: 250 g
- Cera: 25 g, 1/2 favo nido 1 favo melario

Conservare a basse temperature e al riparo della luce

Dati controlli analitici

1790 campioni miele 2002 – 2003



Dati INA; IZS Venezie (PD); IZS Abruzzo e Molise (TE)

2545 campioni miele 2004 – 2005

