



*Università degli Studi di Firenze*

DOTTORATO DI RICERCA IN  
AGROBIOTECNOLOGIE PER LE PRODUZIONI TROPICALI

CICLO XXV

COORDINATORE Prof. Stefano Mancuso

Monitoraggio sanitario di famiglie di api allevate con  
metodo biologico e trattate con medicina integrata

Settore Scientifico Disciplinare AGR/19

**Dottorando**  
Dott. Claudia Lotti

---

*(firma)*

**Tutore**  
Prof. Andrea Martini

---

*(firma)*

Anni 2010/2012

<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. L'ape .....</b>	<b>7</b>
1.1.1. Classificazione sistematica .....	7
1.1.2.1. Morfologia.....	13
1.1.2. Anatomia.....	16
1.1.2.1. Sistema digerente .....	16
1.1.2.2. Sistema respiratorio .....	16
1.1.2.3. Sistema circolatorio.....	17
1.1.2.4. Sistema nervoso.....	17
1.1.2.5. sistema secretore .....	17
1.1.2.6. Sistema escretore.....	18
1.1.2.7. Sistema riproduttore.....	18
1.1.3. La socialità delle api .....	19
1.1.4. Le api e l'ambiente.....	21
1.1.4. La storia dell'apicoltura .....	24
<b>1.2. L'apicoltura oggi .....</b>	<b>27</b>
1.2.1. Legislazione comunitaria, nazionale e regionale.....	27
1.2.1.1. Legislazione comunitaria e nazionale .....	27
1.2.1.2. Legislatura regionale .....	29
1.2.2. Risoluzione del Parlamento Europeo 25 novembre 2010.....	31
1.2.3. L'apicoltura in numeri .....	32
1.2.3.1. Europa .....	32
1.2.3.2. Livello Nazionale .....	33
1.2.3.3. Livello regionale: la situazione in Toscana.....	35
1.2.4. L'impegno della Regione Toscana a sostegno dell'apicoltura.....	38
1.2.5. Moria delle api .....	38
<b>1.3. Apicoltura biologica.....</b>	<b>41</b>
1.3.2. Apicoltura biologica nel mondo .....	42
1.3.2.1. Unione Europea.....	44
1.3.2.2. Paesi non EU.....	44
1.3.2.3. Italia .....	44
<b>1.4. Principali malattie delle api .....</b>	<b>45</b>
1.4.1. Malattie parassitarie .....	47
1.4.1.1. Aethinosi .....	47
1.4.1.2. Acariosi.....	48
1.4.1.3. Senotainiosi.....	49
1.4.1.4. Tropilaelapsosi .....	49
1.4.1.5. Varroasi .....	50
1.4.2. Malattie protozoarie .....	51
1.4.2.1. Amebiasi.....	51
1.4.3. Malattie infettive .....	51
1.4.3.1. Peste americana .....	51
1.4.3.2. Peste europea.....	52
1.4.3.3. Virosi.....	52
1.4.4. Malattie fungine.....	53
1.4.4.1. Covata calcificata (ascosferosi).....	53
1.4.4.2. Covata pietrificata (aspergillosi).....	53
1.4.4.3. Nosemiasi.....	54
1.4.5. Varroasi o varroatosi .....	55
1.4.5.1. Generalità .....	55

1.4.5.2. Etiologia e ciclo biologico .....	56
1.4.5.3. Dinamica della popolazione di varroa .....	57
1.4.5.4. Effetti della parassitazione sulle api .....	58
1.4.5.5. Contagio.....	58
1.4.5.6. Valutazione del livello di infestazione .....	59
1.4.5.7. Trattamenti terapeutici e lotta .....	60
1.4.6. Nosemiasi.....	61
1.4.6.1. Introduzione.....	61
1.4.6.2. Colonizzazione e diffusione del <i>Nosema ceranae</i> in Europa .....	62
1.4.6.3. Biologia e trasmissione del <i>Nosema ceranae</i> in <i>Apis mellifera</i> .....	64
1.4.6.4. Effetti sulle api .....	68
1.4.6.5. Effetti sulla colonia.....	70
1.4.6.6. Diagnosi e profilassi.....	74
1.4.7. Le virosi .....	76
1.4.7.1. Virus della paralisi cronica (Chronic Bee Paralysis Virus - CBPV) .....	77
1.4.7.2. Virus della covata a sacco (Sacbrood Virus - SBV) .....	78
1.4.7.3. Virus della paralisi acuta (Acute Bee Paralysis Virus - ABPV) .....	79
1.4.7.4. Virus delle ali deformi (Deformed Wing Virus - DWV) .....	79
1.4.7.5. Virus Della Cella Reale Nera (Black Queen Cell Virus - BQCV) .....	80
1.4.7.6. Virus israeliano della paralisi acuta (Israeli Acute Paralysis Virus - IAPV).....	80
1.4.7.7. Virus delle Ali Opache (Clowdy Wing Virus - CWV).....	80
1.4.7.8. Virus della paralisi lenta (Slow Paralysis Virus - SPV) .....	81
1.4.7.9. Virus Y dell'ape (Bee Virus Y - BVY) e Virus Filamentoso (Filamentous Virus -FV) .....	81
1.4.7.10. Virus X dell'ape (Bee Virus X - BVX).....	81
1.4.7.11. Virus Iridescente (Apis Iridescent Virus - AIV) .....	81
1.4.7.12. Altri Virus meno conosciuti: Arkansas, Berkley, Kashmir, Kakugo .....	81
<b>1.5. Omeopatia e api.....</b>	<b>83</b>
1.5.1. Medicina non convenzionale.....	83
1.5.1.1. Le origini e la storia dell'omeopatia .....	84
1.5.1.2. Principi.....	85
1.5.2. Omeopatia in veterinaria .....	87
1.5.2.1. Le applicazioni in medicina veterinaria .....	87
1.5.2.2. I miasmi: Psora, Sicosi e Sifilide .....	88
1.5.2.3. Costituzioni .....	88
1.5.2.4. Preparazioni e modalità di somministrazione del rimedio .....	89
1.5.2.5. Profilassi .....	90
1.5.3. I rimedi omeopatici utilizzati in apicoltura .....	91
1.5.3.1. Sulphur .....	91
1.5.3.2. Nosode di <i>Varroa destructor</i> .....	92
1.5.3.3. Calcareo Sulphurica .....	93
1.5.3.4. Scelta ed efficacia del rimedio omeopatico: sintomi e letteratura .....	94
<b>2. OBIETTIVO DELLA TESI SPERIMENTALE .....</b>	<b>98</b>
<b>3. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>99</b>
<b>3.1. Ubicazione e protocollo .....</b>	<b>99</b>
<b>3.2. Trattamenti .....</b>	<b>105</b>
3.2.1. Calcareo Sulphurica 200 CH.....	105
3.2.2. Blocco di covata e Api-bioxal .....	106
3.2.2.1. Blocco di covata .....	106
3.2.2.2. Api-bioxal.....	107
3.2.2.2.1. Registrazione acido ossalico (Api-bioxal).....	108

<b>3.3. Campionamenti e monitoraggio .....</b>	<b>109</b>
3.3.1. Varroa .....	109
3.3.2. Forza dell'alveare.....	111
3.3.3. Peso delle arnie e produzione di miele .....	112
3.3.4. Virus .....	113
3.3.5. Nosema.....	115
<b>3.3. Metodologie d'individuazione del <i>Nosema spp.</i> a confronto .....</b>	<b>121</b>
<b>3.4. Elaborazione dati .....</b>	<b>125</b>
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONI .....</b>	<b>126</b>
<b>4.1. Varroa.....</b>	<b>130</b>
4.1.1. Caduta naturale della varroa ogni 3 giorni .....	130
4.1.2. Caduta naturale media giornaliera di varroa dei 21 gg di osservazione .....	136
4.1.3. Varroa conta su api adulte.....	139
<b>4.2. Peso del nido .....</b>	<b>142</b>
<b>4.3. Produzione miele .....</b>	<b>144</b>
<b>4.4. Numero di api totale .....</b>	<b>146</b>
<b>4.5. Covata totale .....</b>	<b>148</b>
<b>4.6. Nosema .....</b>	<b>150</b>
4.6.1. Analisi contingenza .....	150
4.6.2. Analisi varianza .....	151
4.6.3. Risultati individuazione del <i>Nosema spp.</i> a confronto.....	153
4.6.4. Confronto fra i laboratori di analisi.....	154
<b>4.7. Virus .....</b>	<b>156</b>
4.7.1. ABPV Virus Paralisi Acuta .....	157
4.7.2. CBPV Virus Paralisi Cronica .....	158
4.7.3. DWV Virus Ali Deformi .....	159
4.7.4. BQCV Virus Cella Reale Nera.....	160
4.7.5. SBV Virus Covata a Sacco.....	161
4.7.6. KBV Virus del Kashmiri.....	162
4.7.7. IAPV Virus Israeliano Paralisi Acuta .....	163
<b>5. CONCLUSIONI.....</b>	<b>164</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>167</b>
<b>7. RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>182</b>

Figura 1. <i>Apis dorsata</i> .....	7
Figura 2 <i>Apis florea</i> .....	8
Figura 3. <i>Apis cerana</i> .....	8
Figura 4. Distribuzione delle razze di <i>Apis mellifera</i> in Europa .....	9
Figura 5. <i>Apis mellifera ligustica</i> .....	9
Figura 6. <i>Apis mellifera sicula</i> .....	10
Figura 7. <i>Apis mellifera mellifera</i> .....	11
Figura 8. <i>Apis mellifera carnica</i> .....	11
Figura 9. <i>Apis mellifera caucasica</i> .....	12
Figura 10. <i>Apis mellifera adansonii</i> .....	12
Figura 11. <i>Apis mellifera iberiensis</i> .....	13
Figura 12. Morfologia dell'ape .....	13
Figura 13. Caste: ape operaia, regina e fuco.....	20
Figura 14. Ape bottinatrice .....	22
Figura 15. Pittura rupestre rinvenuta nella Cueva de la Araña (Valencia).....	24
Figura 16. Tacuinum sanitatis, Lombardia, tardo XIV secolo, (Biblioteca Casanatense, Roma).....	26
Figura 17. Immagine di una delle prime arnie Langstroth .....	27
Figura 18. <i>Aethina tumida</i> .....	47
Figura 19. <i>Acarapis woodi</i> .....	48
Figura 20. <i>Senotainia tricuspis</i> .....	49
Figura 21. <i>Tropilaelaps clareae</i> .....	49
Figura 22. <i>Varroa destructor</i> .....	50
Figura 23. <i>Paenibacillus larvae</i> .....	51
Figura 24. <i>Ascospaera apis</i> .....	53
Figura 25. <i>Nosema apis</i> (A) e <i>Nosema ceranae</i> (B).....	54
Figura 26. <i>Varroa destructor</i> .....	55
Figura 27. <i>Varroa destructor</i> .....	56
Figura 28. <i>Varroa</i> caduta per morte naturale sui cassettoni dei fondi antivarroa. ....	59
Figura 29. <i>Varroa</i> su pupa di ape .....	59
Figura 30. Conta in laboratorio degli acari su api adulte .....	60
Figure 31. Immagine a trasmissione elettronica di una spora di <i>Nosema ceranae</i> .....	65
Figure 32. Cellule ventricolari di api infette da <i>Nosema ceranae</i> in differenti stadi. ....	66
Figure 33. Colonia infetta da <i>N. ceranae</i> nel Maggio 2005 .....	71
Figura 34. Spore di <i>Nosema apis</i> (a) e <i>Nosema ceranae</i> (b).....	75
Figura 35. Larva colpita dal virus della covata a sacco (SBV).....	78
Figura 36. Api con ali fortemente deformate .....	80
Figura 37. Foto aerea google map apiari.....	99
Figura 38. Apiario Grassina.....	100
Figura 39. Disposizione arnie prima prova.....	100
Figura 40. Apiario Capannuccia .....	100
Figura 41. Regine .....	101
Figura 42. Disposizione arnie seconda prova .....	102
Figura 43. Api nere .....	105
Figura 44. Calcarea Sulphurica, acqua minerale e aspersori per il trattamento con il rimedio .....	106
Figura 45. Blocco di covata .....	107
Figura 46. Trattamento Api-bioxal .....	107
Figura 47. Api-bioxal.....	108
Figura 48. Conta varroa caduta naturale .....	110
Figura 49. Conta varroa su api adulte.....	110
Figura 50. Conta varroa su api adulte.....	111
Figura 51. Metodo dei sestii.....	112
Figura 52. Pesatura arnie .....	113
Figura 53. Pesatura melari .....	113
Figura 54. Preparazione del campione.....	116
Figura 55. Conta delle spore.....	116
Figura 56. Estrazione DNA.....	118

Figura 57. Raffigurazione della grandezza dei frammenti di restrizione di <i>N.apis</i> e <i>N.ceranae</i> .....	120
Figura 58. Gruppo di ricerca del CRA (Centro Apicola Regional ) di Marchamalo.....	121
Figura 59. Preparazione del campione .....	121
Figura 60. Preparazione del campione .....	122
Figura 61. Estrazione DNA .....	122
Figura 62. PCR-multiplex .....	124
Figura 63. Lettura PCR-multiplex .....	124
Figura 64. Lettura PCR-multiplex .....	153
Tabella 1. Numero di alveari in Europa .....	32
Tabella 2. Numero alveari in Italia.....	34
Tabella 3. Dati osservatorio del miele 2005-2006.....	34
Tabella 4. Situazione apicoltura regione Toscana .....	35
Tabella 5. Dati sull'apicoltura biologica nel mondo .....	43
Tabella 6. SINAB 2012 Produzioni biologiche in cifre della zootecnia .....	44
Tabella 7. Classificazione delle principali malattie delle api in funzione della natura dell'agente eziologico.....	46
Tabella 8. Classificazione delle principali malattie delle api in funzione delle categorie colpite.....	46
Tabella 9. Schema teorico di calcolo di sviluppo dell'acaro. ....	57
Tabella 10. Stime per la soglia di infestazione di varroa su api adulte .....	60
Tabella 11. Virus più importanti riconosciuti patogeni per le api .....	77
Tabella 12. Dati punto zero seconda prova.....	102
Tabella 13. Protocollo prima prova .....	103
Tabella 14. Protocollo seconda prova. ....	104
Tabella 15. Sequenza nucleotidica dei primers utilizzati per la PCR .....	118
Tabella 16. Sequenze nucleotidiche utilizzate per la RFLP-PCR.....	119
Tabella 17. Profili di Restrizione (bp = paia di basi).....	120
Tabella 18. Primers selezionati per rilevare la presenza di <i>N. ceranae</i> , <i>N. apis</i> e <i>Apis mellifera</i> .....	123
Tabella 19. Sopravvivenza alveari e regine prima prova.....	127
Tabella 20. Sopravvivenza alveari e regine seconda prova .....	128
Tabella 21. Medie dei valori delle varroe cadute ogni 3 gg.....	130
Tabella 22. Numero osservazioni e fonti di variazione .....	133
Tabella 23. Analisi statistica e significatività .....	133
Tabella 24. Numero osservazioni e fonti di variazione senza le famiglie che hanno cambiato la regina .....	134
Tabella 25. Analisi statistica e significatività senza le famiglie che hanno cambiato la regina.....	134
Tabella 26 Medie dei valori della varroa caduta giornaliera .....	136
Tabella 27. Numero osservazioni e fonti di variazione .....	137
Tabella 28. Analisi statistica e significatività .....	137
Tabella 29. Numero osservazioni e fonti di variazione senza le famiglie che hanno cambiato la regina .....	137
Tabella 30. Analisi statistica e significatività senza le famiglie che hanno cambiato la regina.....	138
Tabella 31. Medie della conta delle varroe su api adulte .....	139
Tabella 32. Numero osservazioni e fonti di variazione .....	140
Tabella 33. Analisi statistica e significatività .....	140
Tabella 34. Numero osservazioni e fonti di variazione senza le famiglie che hanno cambiato la regina .....	140
Tabella 35. Analisi statistica e significatività senza le famiglie che hanno cambiato la regina.....	141
Tabella 36. Medie del peso delle arnie.....	142
Tabella 37. Numero osservazioni e fonti di variazione .....	143
Tabella 38. Analisi statistica e significatività .....	143
Tabella 39. Medie della produzione di miele.....	144
Tabella 40. Numero osservazioni e fonti di variazione .....	145
Tabella 41. Analisi statistica e significatività .....	145
Tabella 42. Medie del numero di api nella colonia .....	146
Tabella 43. Numero osservazioni e fonti di variazione .....	147

Tabella 44. Analisi statistica e significatività.....	147
Tabella 45. Medie delle celle opercolate di covata nella colonia.....	148
Tabella 46. Numero osservazioni e fonti di variazione.....	149
Tabella 47. Analisi statistica e significatività.....	149
Tabella 48. Analisi della contingenza <i>Nosema ceranae</i> .....	150
Tabella 49. Medie del numero di spore di <i>Nosema ceranae</i> .....	151
Tabella 50. Numero osservazioni e fonti di variazione.....	152
Tabella 51. Analisi statistica e significatività.....	152
Tabella 52. Analisi contingenza <i>Nosema ceranae</i> dei due laboratori di analisi.....	154
Tabella 53. Analisi contingenza ABPV. Prima prova.....	157
Tabella 54. Analisi contingenza CBPV. Prima prova.....	158
Tabella 55. Analisi contingenza DWV. Prima prova.....	159
Tabella 56. Analisi contingenza BQCV. Prima prova.....	160
Tabella 57. Analisi contingenza SBV. Prima prova.....	161
Tabella 58. Analisi contingenza KBV. Prima prova.....	162
Tabella 59. Analisi contingenza IAPV. Prima prova.....	163
Grafico 1. Numero di alveari in Europa.....	33
Grafico 2. Numero apicoltori registrati.....	35
Grafico 3. Distribuzione apiari in Toscana.....	36
Grafico 4. Numero alveari in Toscana.....	37
Grafico 5. Numero apicoltori con più di cento arnie.....	37
Grafico 6. Temperatura max e precipitazioni.....	129
Grafico 7. Vento e umidità relativa medie.....	129
Grafico 8. Varroa caduta naturale ogni 3 gg. Prima prova.....	131
Grafico 9. Varroa caduta naturale ogni 3 gg. Seconda prova.....	132
Grafico 10. Caduta varroa naturale giornaliera. Prima prova.....	136
Grafico 11. Caduta varroa naturale giornaliera. Seconda prova.....	136
Grafico 12. Varroa conta su api adulte. Prima prova.....	139
Grafico 13. Varroa conta su api adulte. Seconda prova.....	139
Grafico 14. Peso del nido. Prima prova.....	142
Grafico 15. Peso del nido. Seconda prova.....	142
Grafico 16. Produzione di miele. Prima prova.....	144
Grafico 17. Produzione di miele. Seconda prova.....	144
Grafico 18. Numero di api all'interno dell'alveare. Prima prova.....	146
Grafico 19. Numero di api all'interno dell'alveare. Seconda prova.....	146
Grafico 20. Covata totale. Prima prova.....	148
Grafico 21. Covata totale. Seconda prova.....	148
Grafico 22. Andamento del <i>Nosema ceranae</i> . Prima prova.....	150
Grafico 23. Andamento delle spore di <i>Nosema ceranae</i> .....	152
Grafico 24. Incidenza <i>Nosema ceranae</i> laboratorio CRA Marchamalo.....	154
Grafico 25. Incidenza <i>Nosema ceranae</i> laboratorio IZS.....	154
Grafico 26. Incidenza ABPV. Prima prova.....	157
Grafico 27. Incidenza CBPV. Prima prova.....	158
Grafico 28. Incidenza DWV. Prima prova.....	159
Grafico 29. Incidenza BQCV. Prima prova.....	160
Grafico 30. Incidenza SBV. Prima prova.....	161
Grafico 31. Incidenza KBV. Prima prova.....	162
Grafico 32. Incidenza IAPV. Prima prova.....	163

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. L'ape

### 1.1.1. Classificazione sistematica

L'ape mellifica o domestica è un insetto sociale che appartiene all'ordine degli Imenotteri, famiglia degli Apidi. Il termine domestico è usato impropriamente per le api in quanto, a differenza di quanto è avvenuto per gli altri animali domestici, pur essendo allevate dall'uomo da millenni, esse non hanno subito mai, se non marginalmente, la sua influenza e le api allevate sono del tutto simili a quelle che vivono allo stato selvatico. I caratteri essenziali degli imenotteri sono la metamorfosi completa, le ali membranose, partenogenesi, dimorfismo sessuale accentuato, cervello ben sviluppato. La famiglia degli *Apidae* si suddivide nei generi *Melipona*, *Bombus*, *Trigona*, *Apis* cui appartiene l'ape domestica.

Al genere *Apis* appartengono nove specie, le più importanti sono quattro:

1. *Apis dorsata* F., o "Ape gigante" dalle dimensioni di un calabrone (Figura 1). Diffusa in India, Indocina e Indomalesia. È molto aggressiva e costruisce un unico grande favo che può raggiungere anche i 2 metri di lunghezza, si trova spesso appeso all'aperto, nudo, alle rocce o ai rami degli alberi. Costruisce un solo tipo di celle, è una specie laboriosa e buona raccoglitrice ma aggressiva. Gli indigeni Indonesiani hanno cercato di allevarla, malgrado l'indole aggressiva dell'ape e riescono a ricavare del miele raccogliendo direttamente dai favi.



Figura 1. *Apis dorsata*.

2. *Apis florea* F., o "Ape nana" di dimensioni inferiori rispetto alla mellifera (Figura 2), ha la stessa distribuzione dell'*A. dorsata*. Costruisce un unico favo nudo che appende ai rami degli alberi. Esso è molto piccolo (30 cm di lunghezza) e presenta una certa diversità tra le celle. Le celle più in alto servono per il miele, seguono quelle delle operaie, poi quelle dei maschi, infine quelle delle regine.





Figura 2 *Apis florea*.

3. *Apis cerana* (*Apis indica* F) (Figura 3). Molto simile alla mellifera, ma leggermente più piccola. È diffusa in gran parte dell'Asia, si trova in Cina, Giappone, India, gran parte della Siberia, in Afghanistan e a ovest arriva in contatto con l'ape mellifera. Costruisce i nidi entro cavità di rocce o di alberi, formati da vari favi verticali e affiancati. Le colonie d'api sono poco popolose e non raccolgono propoli. È un'ape mansueta, ma poco laboriosa e incline alla sciamatura. Può essere allevata in arnie simili a quelle usate per l'*A. mellifera*.



Figura 3. *Apis cerana*.

4. *Apis mellifera* L. o *Apis mellifica* L. (ape occidentale). Sotto il nome di *Apis mellifera*, Carlo Linneo riuniva, nel suo "Systema Naturae" (1758), tutte le api allora note. Successivamente, lo stesso Linneo, nella sua "Fauna Suecica" (1761), rivedendo attentamente il comportamento delle api, dava all'ape il nome di *Apis mellifica*. Tale seconda attribuzione, dal punto di vista etimologico, appare più esatta, in quanto il miele viene "fabbricato" dall'insetto e non semplicemente "trasportato". Tuttavia in base alla legge

della priorità appare opportuno usare, specie nelle trattazioni scientifiche, la prima citazione (Pinzauti M., 2000). L'ape mellifica è la più diffusa del genere *Apis*, questa specie popola l'Europa (Figura 4), l'Africa, l'Asia Occidentale e dopo l'esplorazione dei nuovi continenti è stata introdotta nelle Americhe, in Australia, in Nuova Zelanda. La specie *Apis mellifera* conta numerose razze che si distinguono per caratteri morfologici (dimensioni, colore, peli del tegumento, venature delle ali) e comportamentali.



Figura 4. Distribuzione delle razze di *Apis mellifera* in Europa.

Le razze di maggior importanza economica sono:

- *Apis mellifera ligustica* Spin. o ape italiana (Figura 5), è originaria del nord dell'Italia (Liguria-Piemonte) e diffusa in quasi tutto il territorio italiano, dalle zone pedemontane del Nord fino alla Calabria; in Sicilia si trova l'*Apis mellifera sicula* di colore scuro (Figura 6).



Figura 5. *Apis mellifera ligustica*.



Figura 6. *Apis mellifera sicula*.

L'ape ligustica si differenzia dalle altre razze perché le operaie hanno i primi segmenti dell'addome di colore giallo chiaro, i peli sono anch'essi di colore giallo, in particolare nei maschi e nelle regine sono gialle dorate o color rame. La colonia è operosa, docile, poco portata alla sciamatura, molto prolifica e con precoce ripresa primaverile. Di negativo le colonie hanno la tendenza al saccheggio e alla deriva da un'arnia all'altra. È considerata l'ape laboriosa per eccellenza e in zone a clima mite e con raccolti abbondanti non teme confronti. In Italia e in altri paesi esistono allevamenti specializzati che inviano regine di questa razza in tutto il mondo. Purtroppo, a causa degli incroci effettuati in passato e della ibridazione naturale con altre razze, ceppi puri di api ligustica pare che si trovino ormai solo in un'isola di fronte l'Australia.

- *Apis mellifera mellifera* L., o ape nera, è originaria dell'Europa nord-orientale e oggi è diffusa dalla Spagna alla Siberia (Figura 7). È leggermente più grande della *Apis ligustica* (pur presentando la ligula leggermente più corta) ed ha il corpo completamente scuro, quasi nero. È meno docile della precedente e presenta uno sviluppo primaverile tardivo, ha scarsa tendenza alla sciamatura e presenta buone capacità di svernare con temperature molto basse.





Figura 7. *Apis mellifera mellifera*.

- *Apis mellifera carnica* Pollmann o ape carnica (Figura 8). È originaria della zona meridionale delle Alpi austriache e dei Balcani settentrionali, oggi l'area di diffusione è l'Austria, Jugoslavia e l'intera vallata del Danubio (Ungheria, Romania e Bulgaria). Di aspetto simile alla ligustica, ma quasi completamente scura, presenta una fitta peluria che le conferisce una colorazione giallastra. Il colore è scuro e la taglia è più grande della ligustica e della mellifica. È molto docile e molto prolifica, presenta una forte tendenza alla sciamatura e sverna senza difficoltà anche in condizioni avverse.



Figura 8. *Apis mellifera carnica*.

- *Apis mellifera caucasica* Gorb o ape grigia o ape caucasica (Figura 9), è originaria delle alte vallate del Caucaso centrale ed è attualmente molto diffusa in Russia. Dall'aspetto è molto simile all'ape carnica. Si tratta di un'ape particolarmente docile con forte tendenza a propolizzare. La sua importanza è dovuta al fatto che spesso viene utilizzata per produrre ibridi.



Figura 9. *Apis mellifera caucasica*.

- *Apis mellifera adansonii* o ape africana (Figura 10), è diffusa nell'Africa centro-occidentale, ottima produttrice di miele e di cera, ma è molto aggressiva, sciamatrice e particolarmente incline al saccheggio. Nel 1956 è stata importata in Brasile e qui si è diffusa non solo occupando i luoghi disponibili ma anche le arnie già popolate da famiglie di api di origine europea che distrugge, da qui anche il nome di "ape assassina". Da allora a oggi si è incrociata ripetutamente con le api indigene e attualmente gli ibridi di api africanizzate sono diventati il tipo preferito di ape per gli apicoltori dell'America Centrale e dell'area tropicale dell'America del sud per la loro provata produttività. Comunque, in molte aree l'ibrido africanizzato è stato inizialmente temuto poiché esso tende a mantenere certi tratti comportamentali del suo antenato africano che lo rendono meno desiderabile per l'apicoltura domestica.



Figura 10. *Apis mellifera adansonii*.

- *Apis mellifera iberiensis*, o ape di Gibilterra o anche conosciuta come *A. mellifera iberica* è una sottospecie dell'ape domestica nativa della penisola iberica (Figura 11). Inoltre si ritrova anche nelle isole Baleari e alcuni aplotipi si riscontrano negli Stati Uniti del nord portati durante la conquista dell'America. Sono api di colore scuro, presentano un gran vigore e attività anche temperature in cui altre sottospecie abbandonerebbero l'alveare, tollerando lunghi inverni freddi. Il suo comportamento è nervoso e aggressivo e presenta un basso livello di sciamatura e fa grande uso della propoli.



Figura 11. *Apis mellifera iberiensis*.

### 1.1.2.1. Morfologia

Come tutti gli insetti, le api hanno il corpo suddiviso in tre parti ben distinte: capo, torace e addome (Figura 12).

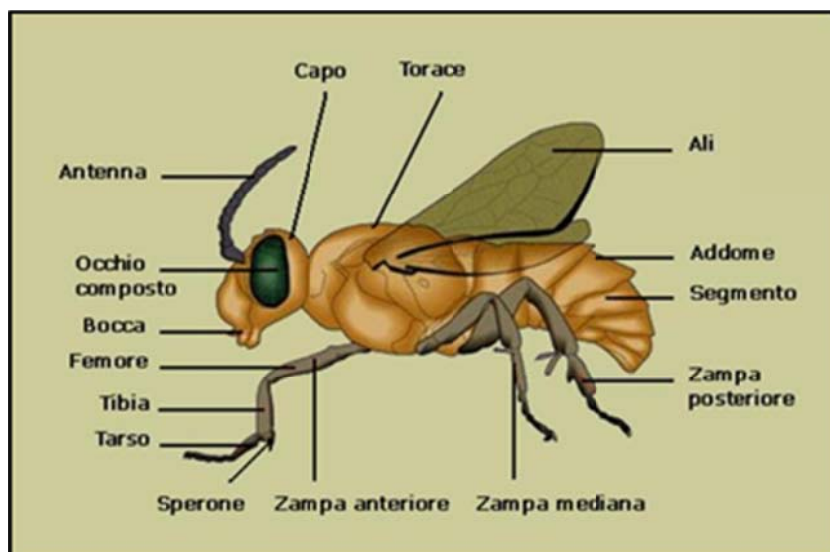


Figura 12. Morfologia dell'ape

Esternamente il loro corpo è protetto da un esoscheletro chitinoso (cuticola) che gli conferisce rigidità. Le varie parti rigide sono articolate fra di loro mediante membrane elastiche in cui la cuticola resta sottile e flessibile.

Il capo, capsula globosa subpiramidale contiene cervello, parte iniziale dell'apparato digerente ed alcune importanti ghiandole. Su di esso sono situati diversi organi:

- due occhi composti, collocati ai lati del capo, convessi e costituiti ciascuno da migliaia di elementi semplici, gli ommatidi che permettono la formazione dell'immagine dell'ambiente circostante;
- tre occhi semplici o ocelli, disposti a triangolo sulla parte superiore del capo, con la funzione di misurare l'intensità luminosa, in modo da permettere il necessario adattamento degli occhi composti.
- due antenne che sono appendici metameriche orientabili, formate da un articolo basale lungo e robusto, articolato sul cranio (scapo), su cui è articolato il flagello, composto da 11 articoli (12 nei maschi), riccamente provvisto di organi tattili, olfattivi, gustativi, termici e sensibili al grado di umidità.
- apparato boccale, lambente-succhiante si trova all'angolo inferiore della testa ed è costituito dal labbro superiore, due mandibole, due mascelle e labbro inferiore. Il labbro superiore, provvisto di sensilli gustativi, è molto ridotto. Le due mandibole a forma di pinze sono disposte ai lati della bocca e sono utilizzate per modellare la cera che fuoriesce dalle ghiandole mandibolari e impiegata per costruire i favi e per raccogliere la propoli. Le due mascelle, molto mobili, hanno la funzione principale di formare, assieme alle altre appendici, un canale di suzione degli alimenti liquidi nello stesso tempo, portano gli organi del gusto. Sono costituite da articoli distinti che servono per afferrare gli insetti avversari, per masticare e aprire gli opercoli alle api nasciture. Il labbro inferiore è originato dalla fusione di un secondo paio di mascelle, formato da vari articoli tra cui la ligula. Questa è una specie di proboscide, molto lunga, munita di un canalicolo attraverso il quale viene prodotta la saliva e di una espansione distale a cucchiaio detta labello. I liquidi e il nettare vengono aspirati per mezzo di una specie di "pompa" operante a livello della faringe. Nella raccolta del nettare l'ape inserisce la ligula nel calice florale, lambisce e aspira il nettare. Nella regina e nei fuchi l'apparato boccale è meno sviluppato e i fuchi non hanno le ghiandole mandibolari.
- strutture interne, sono alcune importanti ghiandole che sono quelli salivari, faringee laterali o sopra cerebrali (producono pappa reale) e quelle mandibolari (producono feromone di allarme) e il cervello.

Il torace, formato apparentemente da tre segmenti (ve ne è un quarto derivante dall'addome), è provvisto ventralmente di tre paia di appendici metameriche, le zampe, e dorsalmente di due paia di estroflessioni tegumentarie, le ali che pertanto non sono, come negli altri animali volanti, modificazioni degli arti. Il torace è attraversato dal tubo digerente e contiene dei sacchi aerei ed i potenti muscoli alari.

- Zampe, sono formate da sei segmenti mobili (*coxa, trocantere, femore, tibia, tarso e pretarso*), sono provviste di setole sensoriali. La particolare conformazione di ciascun paio di zampe risponde alle esigenze lavorative dell'operaia. Il primo paio ha una struttura speciale a livello del tarso, denominata *stregghia*, con cui le api si possono pulire le antenne da corpi estranei. Il secondo paio ha una

spina posta all'interno della tibia che serve per staccare la polline dalle cestelle delle zampe posteriori e per pulire le ali e gli spiracoli (aperture apparato respiratorio). Il terzo paio ha sulla parte esterna della tibia un incavo, lucido che è la cestella del polline, provvista di una setola attorno alla quale vengono formate pallottole di polline o di propoli per essere trasportate in alveare.

- Ali, sono estroflessioni membranacee del 2° e 3° segmento del torace e sono composte da due sottili lamine sovrapposte e strettamente ravvicinate, nell'interspazio sono percorse da nervature rigide e cave contenenti le trachee, terminazioni nervose ed emolinfa. Le nervature costituiscono un importante elemento distintivo fra le varie razze e sottorazze. Le ali anteriori sono più grandi e venate e vengono portate ripiegate quando sono a riposo e sovrapposte a quelle posteriori, mentre quando l'ape è in volo si muovono affiancate, strettamente collegate l'una all'altra. Le ali sono così funzionali grazie alla possente muscolatura toracica che permette alle ali di battere al ritmo di più di 200 volte al secondo (12000 battiti al minuto)
- Stigmi o spiracoli sono le aperture attraverso i quali il sistema respiratorio comunica con l'esterno. L'ape ha tre paia di stigmi toracici.

L'addome è formato da sei segmenti visibili ed è privo di appendici. È peduncolato e presenta il primo segmento, chiamato propodeo, incorporato al metatorace. I vari segmenti hanno forma di anelli, piuttosto rigidi, e sono costituiti da una parte dorsale (tergiti) e da una ventrale (sterniti), sono uniti da una membrana flessibile che gli permettono ampi movimenti; proprio qui è dove l'acaro *Varroa destructor* si attacca perforando la membrana e riesce ad alimentarsi dell'emolinfa. È ricoperto da peli che in base al colore lunghezza sono caratteristiche che contraddistinguono le diverse razze di api. Presenta stigmi. Sulla parte anteriore degli sterniti IV,V,VI,VII sono presenti delle formazioni ovoidali le ghiandole e gli specchi della cera. La cera viene prodotta solo dalle operaie tra il decimo e diciottesimo giorno di vita. L'ultimo anello dell'addome, ad eccezione del fuco, è provvisto di pungiglione, importante arma di difesa. A riposo si trova entro una tasca e viene estroflesso solo al momento dell'impiego. Questo ha la forma di uno stiletto dentellato con i denti rivolti all'indietro ed è collegato all'apparato velenifero. Inoltre presenta a livello della membrana intersegmentale fra il VI e il VII tergite, un solco seguito da una regione leggermente rialzata dove sboccano i dotti di alcune centinaia di cellule ghiandolari che prendono il nome di ghiandola di Nasonov o ghiandola odorifera. Le sostanze volatili emesse da questa ghiandola servono per le api per marcare i luoghi di bottinamento, per facilitare il ritrovamento dell'alveare e per favorire l'aggregazione dello sciame e del glomere invernale.



## 1.1.2. Anatomia

### 1.1.2.1. Sistema digerente

Il tubo digerente dell'ape attraversa tutto il suo corpo; inizia dall'apertura boccale, a cui fa seguito la faringe, provvista di muscolatura in grado di farla dilatare per favorire l'aspirazione dei liquidi nutritivi. Segue l'esofago, che dopo aver attraversato tutto il torace, entra nell'addome, dove si allarga a formare l'ingluvie (o borsa melaria). È qui che nelle operaie viene immagazzinato il nettare durante la raccolta per essere trasportato nell'alveare. All'ingluvie segue il proventricolo, separati da una valvola formata da quattro lobi triangolari che delimitano un'apertura a X. Essa consente il passaggio degli alimenti nel ventricolo o stomaco quando l'ape si nutre, ma impedisce il percorso inverso quando l'ape rigurgita il contenuto della borsa melaria. Nel mesointestino avviene la digestione del cibo ed il suo assorbimento. È proprio qui che nelle api si sviluppa la nosemiasi; qui si ha la germinazione delle spore del microsporidio *Nosema spp.* dopo essere state assunte tramite il cibo contaminato. La malattia colpisce le cellule dell'intestino medio delle api adulte, con conseguente alterazione della digestione e dell'assorbimento dei nutrienti. Nei casi più gravi vengono danneggiati i tubuli malpighiani. Questo comporta un'alterazione del metabolismo e il depauperamento delle riserve proteiche dell'ape. La reazione dell'insetto è quella di ingerire sempre maggiori quantità di cibo, accelerando così il naturale rinnovamento del tessuto epiteliale, fino a che il numero di cellule distrutte non supera il numero di quelle che l'ape può sostituire. L'intestino medio dei soggetti ammalati perde la tinta bruno chiara caratteristica di quello delle api sane e diviene bianco latte, si gonfia diviene flaccido e non più funzionale mentre la muscolatura annessa perde di tono. Il tubo digerente prosegue poi nel tenue, dove sboccano anche i tubi malpighiani (apparato escretore), per terminare nel retto a sua volta diviso in due parti: quella prossimale, cupoliforme, che presenta delle strutture denominate papille rettali, alle quali viene attribuita la funzione di riassorbire acqua e sali minerali dalle feci; quella distale, più voluminosa, allargata ed estensibile, denominata ampolla rettale, nella quale possono essere accumulati anche per molto tempo gli escrementi, ciò che permette alle api di evacuare solo in volo, fuori dall'alveare. L'ampolla rettale termina infine nell'ano.

### 1.1.2.2. Sistema respiratorio

Le api possiedono un apparato respiratorio molto sviluppato. L'aria penetra attraverso spiracoli disposti a coppie, 3 nello pseudotorace e 7 nell'addome. Dagli spiracoli partono brevi trachee, provviste di inspessimenti a forma di spirale (tenidi) che ne impediscono l'occlusione, che si immettono in particolari dilatazioni chiamati sacchi aerei (sia nel torace che nell'addome). Esistono poi numerosi tronchi tracheali che uniscono tra loro i sacchi aerei. Da questi si diparte una vera rete di trachee che si ramificano successivamente fino a ridursi in tracheole (vasi minutissimi) privi di tenidi, che raggiungono tutti gli organi. La respirazione avviene mediante la dilatazione e la compressione dell'addome, in tal modo l'aria che circola nelle trachee viene distribuita a tutte le parti del corpo e l'ossigeno, attraverso l'esile parete delle tracheole, viene ceduto direttamente ai tessuti.

### 1.1.2.3. Sistema circolatorio

La circolazione del sangue (emolinfa) avviene in parte attraverso dei vasi, ed in parte attraverso la libera circolazione tramite lacune del corpo. L'emolinfa quindi trasporta le sostanze nutritive che potendo essere in una certa misura accumulate all'interno delle cellule (cosa non possibile per l'ossigeno) possono giungere anche in maniera discontinua. Lungo la linea mediana dorsale del corpo dell'ape troviamo il vaso dorsale, costituito da una parte contrattile, l'aorta, che percorsa la regione dorsale del torace si apre direttamente nelle lacune della regione cefalica. Il cuore aspira l'emolinfa dalla cavità addominale attraverso 10 orifizi, per spingerla in avanti attraverso l'aorta, il ritorno avviene mediante circolazione lacunare.

### 1.1.2.4. Sistema nervoso

Il sistema nervoso è formato da un apparato centrale, uno viscerale e uno periferico, reciprocamente connessi. L'apparato centrale è costituito da una massa ganglionare molto sviluppata posta nel capo, sopra l'esofago, detto cervello o cervello, da una massa sottoesofagea detta gnatocerebro, collegata alla prima mediante due connettivi a formare una specie di cintola detto cingolo periesofageo e da una catena ganglionare ventrale che parte dal gnatocerebro e percorre il torace e parte dell'addome lungo la linea mediana ventrale. Tale catena è formata da gangli riuniti fra loro da lunghe connessioni longitudinali e da connessioni trasversali.

### 1.1.2.5. sistema secretore

#### 1) Apparato endocrino

Strettamente collegati al sistema nervoso centrale, vi sono una serie di organi endocrini che regolano con i loro secreti i processi di sviluppo dell'ape e ne influenzano il metabolismo e il comportamento. Questi organi sono:

- le cellule neurosecretrici, si trovano in prossimità del cervello, del gnatocerebro e della catena nervosa ventrale radunati in territori. Gli ormoni prodotti da queste cellule governano lo sviluppo postembrionale, le mute, la metamorfosi, la riproduzione, la morfogenesi i ritmi biologici ecc. Sembra inoltre che intervengono anche nel processo per l'attivazione di particolari geni che danno la forma al corpo;
- i corpi cardiaci e i corpi allati, si trovano dietro al cervello e sono collegati tra loro e con il centro neurosecretore del cervello. Hanno un ruolo importante per l'attivazione delle ghiandole endocrine e nella regolazione del metabolismo in genere. I corpi allati secernono in particolare l'ormone giovanile o neotenina, che ha l'effetto di mantenere i caratteri giovanili rendendo possibile l'accrescimento degli stadi preimmaginali. Riveste un ruolo molto importante anche nella divisione in caste delle femmine, nel metabolismo proteico e nella maturazione delle uova;

- le ghiandole toraciche, elaborano l'ormone della muta o ecdisone. Questo ormone è in contrasto con la neotenina, l'uno inibisce l'azione dell'altro.

## 2) Ghiandole esocrine

Queste ghiandole possono essere uni o pluri cellulari, sono estremamente numerose e varie. Le più importanti sono quelle della cera, presenti solo nell'addome delle operaie; le ghiandole mandibolari, con funzioni diverse a seconda delle caste; le ghiandole salivari e le ghiandole faringee laterali (o sopra cerebrali).

### 1.1.2.6. Sistema escretore

L'apparato escretore è deputato all'eliminazione delle sostanze di rifiuto (cataboliti), si compone di due sistemi, uno localizzato, l'altro diffuso. Il primo si identifica in organi localizzati, i tubi malpighiani, che si dipartono dall'intestino tenue dove hanno sbocco e sono immersi nell'emolinfa, liberi nel loro decorso; questi hanno la funzione di liberare il sangue dai rifiuti che vengono assorbiti senza una rigida selezione dai segmenti distali dei tubuli e scaricati nell'intestino, dove verranno poi eliminati previo riassorbimento dell'acqua e di tutti i prodotti recuperabili, ad opera dei segmenti prossimali dei tubuli e del proctodeo. Il secondo si identifica con un insieme di strutture unicellulari o pluricellulari presenti in diverse parti del corpo. Altri organi, pur non facendo parte dell'apparato escretore vero e proprio, svolgono anche una funzione escretoria coadiuvante: si tratta del tessuto adiposo, comprendente elementi cellulari che accumulano al loro interno cataboliti e derivati dell'acido urico, del tegumento e dell'intestino.

### 1.1.2.7. Sistema riproduttore

L'apparato riproduttore è molto complesso, esso comprende un paio di gonadi, testicoli nei maschi e ovari nelle femmine e relativi gonodotti e genitale esterni. Gli organi femminili sono completamente sviluppati solo nelle regine ed atrofizzati nelle operaie. Gli organi che lo compongono non sono visibili all'esterno: l'organo maschile viene estroflesso durante l'accoppiamento, mentre nelle operaie l'ovodepositore è trasformato in pungiglione ed è alloggiato nella camera del pungiglione. La maturità sessuale nelle regine e nei fuchi viene raggiunta in tempi diversi: le regine la raggiungono dopo pochi giorni dallo sfarfallamento, i fuchi dopo circa 16 giorni.

Generalmente 6-12 giorni dopo lo sfarfallamento (non oltre 3-4 settimane), una giovane regina si accoppia con parecchi fuchi (mediamente 8) nel corso dei voli nuziali, in cui ciascun maschio, attratto ed eccitato dal movimento della femmina e dai feromoni sessuali che si diffondono dal suo corpo, immette i propri spermatozoi nelle sue vie genitali. Gli organi copulatori del maschio vengono poi strappati per rimanere nella borsa copulatrice della femmina (costituendo il cosiddetto segno di fecondazione) finché le operaie non li estraggono dopo che essa è ritornata all'alveare. Gli spermatozoi così ricevuti nella sua spermateca devono servire per tutte le uova fecondate che essa deporrà in seguito. I suoi ovaroli si ingrossano fino a riempire il lungo addome e, dopo 1-2 giorni, essa comincia ad ovideporre. La regina

ha la facoltà di controllare il processo di fecondazione. Le uova non fecondate (o partenogenetiche, o vergini) producono fuchi, geneticamente aploidi, con 16 cromosomi (partenogenesi arrenotoca, che dà origine solamente ad individui di sesso maschile), mentre le uova fecondate producono, per eterozigosi degli alleli sessuali, femmine diploidi, con 32 cromosomi. Eventuali maschi diploidi, prodottisi per omozigosi, vengono riconosciuti nel primo stadio larvale dalle nutrici, che li eliminano. Nel periodo in cui il raccolto di nettare è abbondante, una regina arriva a deporre fino a 2000-3000 uova al giorno, attaccando ciascun uovo sul fondo di una cella. L'uovo si schiude dopo circa 3 giorni dopo la deposizione e ne emerge una minuscola larva vermiforme, apoda e anoftalma (priva di occhi composti). Le larve dei maschi restano aploidi solo nel primo stadio; prima della muta la maggioranza delle cellule diviene diploide; aploidi restano solo, oltre alle cellule germinali, anche le cellule che daranno origine all'intestino, ai tubi malpighiani, ecc..

### 1.1.3. La socialità delle api

Le api mellifere sono insetti sociali e come tali vivono in famiglie, o colonie, costituite da alcune decine di migliaia d'individui (da 10.000 a 100.000). In base al comportamento sociale si distinguono:

- Api solitarie (es. *Colletes*, *Anthophora*, ecc.). Ogni femmina costruisce uno o più nidi, approvvigiona una cella con cibo sufficiente per l'intero sviluppo della larva e vi depone un uovo; infine sigilla la cella e passa a costruirne altre. Normalmente la madre muore prima che la prole abbia raggiunto la maturità.
- Aggregazione di api solitarie (fenomeno comune in tutte le famiglie, tranne in Apidae). I singoli nidi sono costruiti con entrate più o meno vicine, senza gallerie di unione tra un nido e l'altro né costruzione di particolari zone destinate alla covata. Questi raggruppamenti sarebbero originati dalla tendenza a ritornare al luogo di nascita o a un'attrazione reciproca tra individui della stessa specie.
- Api comunitarie (es. *Andrena*, *Megachile*, ecc.). Si tratta di gruppi di femmine (da due a oltre mille) che utilizzano un unico nido comune, pur fabbricando e approvvigionando ognuna le proprie celle, con l'evidente vantaggio di una maggior difesa del nido.
- Api quasi sociali (es. alcune *Nomia*). Le femmine costruiscono e sorvegliano di comune accordo le gallerie di accesso e cooperano nella costruzione e nell'approvvigionamento delle celle di covata, ma senza alcuna divisione del lavoro.
- Api semi-sociali (es. alcuni *Halictus*). Le femmine della stessa generazione cooperano nella costruzione del nido e nell'approvvigionamento del nido, ma sono divise in due caste funzionali poiché alcune femmine non depongono uova, ma agiscono esclusivamente come operaie.
- Api sociali (es. *Apis*, *Bombus*, alcune specie di *Halictus*). L'eusocialità si raggiunge con la sovrapposizione nel nido di più generazioni e con la divisione riproduttiva del lavoro tra le caste. La distinzione tra api primitivamente sociali e api altamente sociali poggia soprattutto sulla

presenza in queste ultime di femmine strutturalmente differenti e sulla sopravvivenza, allo svernamento o alla fine del ciclo della colonia, delle sole femmine sessuate. Le colonie di *Apis* sono al massimo grado evolutivo. (Ricciardelli D'Albore G., Intoppa F., 2000).

Il massimo sviluppo sociale si raggiunge nel genere *Apis*, e in particolare nell' *A. mellifera*, con la costruzione di nidi in cui vivono insieme numerosi individui della stessa specie organizzati in complesse società, all'interno delle quali ognuno ha compiti precisi, finalizzati alla crescita e al benessere della colonia nel suo insieme. Questo peculiare comportamento, assai raro in tutto il regno animale, ha valso loro il nome di insetti eusociali.

Le api appartengono proprio a questa classe d'individui e come tali, presentano alcune caratteristiche peculiari:

- Gli individui della stessa specie cooperano nel prendersi cura della prole;
- Esiste una divisione riproduttiva del lavoro, con individui più o meno sterili che operano a vantaggio di altri individui fecondi;
- Si ha una sovrapposizione di almeno due generazioni in modo che la prole aiuti i genitori a svolgere i compiti necessari alla vita della colonia durante un certo periodo della loro esistenza.

L'organizzazione sociale comporta la suddivisione degli individui di ciascuna colonia in caste (Figura 13). Nel caso delle api la deposizione delle uova è affidata a una singola femmina fecondata, la regina. La colonia è poi formata da femmine sterili chiamate operaie, che hanno il compito di procurare il cibo, nutrire la regina, allevare la prole e difendere il nido, e da maschi, chiamati fuchi, in numero esiguo e presenti solo in certi periodi dell'anno con il solo compito di fecondare la regina durante il volo nuziale.

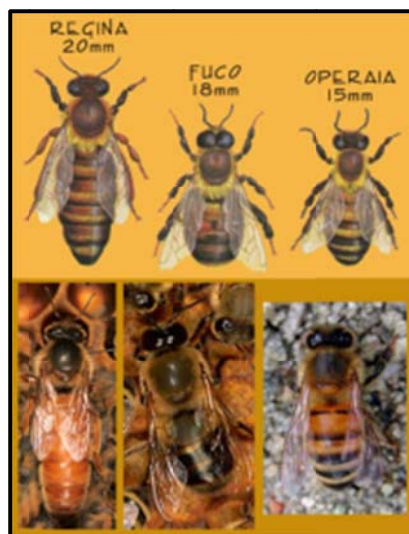


Figura 13. Caste: ape operaia, regina e fuco

I membri di una stessa famiglia comunicano in continuo tramite lo scambio di cibo, noto come trofallassi. Grazie a questo comportamento vengono trasmessi anche messaggi chimici che regolano la vita all'interno dell'alveare. Le api comunicano tra

loro grazie ad un complesso linguaggio fatto di diversi segnali che possono essere tattili, chimici, visivi, acustici, ma anche simbolici. Dagli studi di Karl von Frisch nel 1973 sulla biologia delle api, è stato possibile scoprire che queste, per indicare alle compagne bottinatrici la presenza di una ricca fonte di cibo, compiono una danza al rientro nell'alveare. Inoltre, oltre a fornire indicazioni sulla qualità e la natura del cibo, le esploratrici con la danza, riescono a dare informazioni sulla distanza del cibo da ricercare. Esistono diversi tipi di danze, ma le principali sono due: la danza circolare e la danza dell'addome. Le api fanno una danza circolare, cioè si muovono in cerchio, quando trovano una fonte di cibo vicina all'alveare. Questo tipo di danza non dà direttamente informazioni sulla direzione in cui si trovano le risorse. Quando i fiori si trovano a distanze maggiori, le api eseguono una danza più complessa chiamata danza scodinzolante, dove l'ape si sposta come per tracciare un otto. Attraverso questa danza le api riescono a segnalare la direzione della fonte di cibo. Questo grazie ad un codice basato sull'angolo tra la posizione del sole, la fonte di cibo e l'orientamento dell'otto disegnato tramite la danza.

#### **1.1.4. Le api e l'ambiente**

Le api sono degli ottimi indicatori biologici perché segnalano il danno chimico dell'ambiente in cui vivono, attraverso due segnali: l'alta mortalità nel caso dei pesticidi e attraverso i residui che si possono riscontrare nei loro corpi, o nei prodotti dell'alveare, nel caso degli antiparassitari e di altri agenti inquinanti come i metalli pesanti e i radionuclidi, rilevati tramite analisi di laboratorio (Celli, 1994). Molte caratteristiche etologiche e morfologiche fanno dell'ape un buon rivelatore ecologico: è facile da allevare; è un organismo quasi ubiquitario; non ha grandi esigenze alimentari; ha il corpo coperto di peli che la rendono particolarmente adatta a intercettare materiali e sostanze con cui entra in contatto; è altamente sensibile alla maggior parte dei prodotti antiparassitari che possono essere rilevati quando sono sparsi impropriamente nell'ambiente (per esempio durante la fioritura, in presenza di flora spontanea, in presenza di vento, ecc.); l'alto tasso di riproduzione e la durata della vita media, relativamente corta, induce una veloce e continua rigenerazione nell'alveare; ha un'alta mobilità e un ampio raggio di volo che permette di controllare una vasta zona; effettua numerosi prelievi giornalieri; perlustra tutti i settori ambientali (terreno, vegetazione, acqua, aria); ha la capacità di riportare in alveare materiali esterni di varia natura e di immagazzinarli secondo criteri controllabili; necessità di costi di gestione estremamente contenuti, specialmente in rapporto al grande numero di campionamenti effettuati (Porrini, 2007)(Figura 14).



Figura 14. Ape bottinatrice.

Il servizio d'impollinazione che le api assicurano alle sole coltivazioni d'interesse alimentare è pari a 153 miliardi di Euro/Anno. E' quanto risulta da uno studio, commissionato dall'Unione Europea nell'ambito del Progetto "ALARM", all'INRA, Istituto Nazionale della Ricerca Agronomica Francese e all'UFZ, Centro Tedesco per le Ricerche Ambientali. I due Gruppi di Ricerca hanno effettuato una valutazione economica del danno che la produzione agricola mondiale sta subendo in conseguenza della moria delle api: le analisi condotte riferiscono di una contrazione del 9,5% del valore globale dei prodotti commestibili di derivazione agricola. Più in particolare, il solo comparto ortofrutticolo registra una perdita produttiva di 50 miliardi di €/Anno, mentre il comparto degli oli di semi evidenzia una perdita produttiva pari a 39 miliardi di €/Anno. Il totale del valore che l'impollinazione delle api determina alle coltivazioni d'interesse alimentare in Europa è valutato pari a 14,2 miliardi di €/Anno. Per l'Italia, ricorda la FAI - Federazione Apicoltori Italiani, questo dato è già stato computato in 1.500 milioni di €/Anno. Almeno il 79% della produzione agricola italiana è in qualche modo beneficiato dall'impollinazione, con un RAD (Reddito Agricolo Diretto), calcolato sul 56% del PLV 1996 del comparto agricolo, pari a 1578 milioni di euro (1233 milioni di euro per sole api), con un contributo da parte di ogni singolo alveare di circa 1240 euro. Valutazione ampiamente sottostimata ma comunque sufficiente per ribadire l'importanza economica degli impollinatori ed assimilarlo al bilancio di una grande azienda (Accorti 2000).

Lo studio ha limitato i calcoli sulle sole colture i cui prodotti sono destinati al consumo umano; i ricercatori non hanno tenuto conto della produzione di colture consumate dagli animali da pascolo, della coltivazione di piante per biocarburanti, della produzione sementiera e di fiori ornamentali, dell'impollinazione delle piante spontanee. Quindi la valutazione reale sarà molto più elevata rispetto a quella riportata.

Il ruolo che l'ape svolge come "sentinella dell'ambiente" è molto importante, in quanto l'abbondante presenza di api indica una situazione ambientale equilibrata, mentre la sua scomparsa ci deve far pensare ad una situazione di possibile rischio. Come detto precedentemente, le api sono estremamente sensibili agli antiparassitari. Il numero di api morte davanti l'alveare è quindi la variabile più importante da considerare per questi agenti inquinanti (Celli *et al.*, 1996) e varia secondo un certo

numero di fattori: la tossicità (per le api) del principio attivo usato (LD50) la presenza e l'estensione delle fioriture delle piante coltivate o spontanee, la presenza delle api durante il trattamento chimico, i mezzi usati per la distribuzione del prodotto, la presenza o meno di vento, ecc. Molte api sono direttamente investite dall'insetticida in campo, mentre visitavano i fiori per raccogliere il nettare ed il polline, moriranno in campo o durante il loro volo di ritorno, mentre altre api colpite soltanto marginalmente moriranno nell'alveare. In questo caso l'ape funge da indicatore diretto. Nel caso invece di prodotti che non sono particolarmente pericolosi, l'insetto funge da indicatore indiretto, cioè non sensibile ma esposto e ci fornirà le informazioni sotto forma di residui. (Porrini, 2007).

Le api occupano da sempre un ruolo fondamentale nell'ecosistema garantendo la sopravvivenza di un grande numero di specie vegetali. Infatti riguardo alla maggior parte delle colture frutticole è possibile affermare che i principali e più importanti agenti dell'impollinazione sono proprio le api. Attualmente la loro mortalità è superiore del 30-35% rispetto al tasso naturale. Sul banco degli imputati si trovano pesticidi, parassiti e monoculture, ma anche lo stesso cambiamento climatico che, portando estati calde, indebolisce le colonie di api. Inoltre le patologie e le problematiche di ordine sanitario che esse portano hanno comportato gravi fenomeni di indebolimento degli alveari. La varroasi è attualmente considerata la più grave parassitosi dell'ape, divenendo, da un ventennio a questa parte, il flagello degli apicoltori italiani ed europei, con perdite di numerose famiglie di api. Inoltre, sono note da tempo la correlazione tra varroa e infezioni virali ed al ruolo della varroa come vettore e attivatore di virus e più volte è stata constatata la possibilità che il collasso della famiglia sia da attribuire a forti infezioni da virus, come il virus delle ali deformi o il virus della paralisi acuta quale evento terminale di una infestazione da varroa non controllata. Da non sottovalutare è anche l'infestazione da *Nosema ceranae*, che negli ultimi anni si sta diffondendo a macchia d'olio in tutta Europa. Questo microsporidio porta al collasso inaspettato della colonia dove le famiglie apparentemente sane e forti nel giro di poco tempo si ritrovano solo con poche api e la regina quando sopravvive, con conseguente inevitabile morte della colonia. Un altro problema è anche quello dovuto all'inquinamento che porta a una diminuzione delle fonti di cibo per questi insetti. Le api nutrendosi del nettare dei fiori di piante che potrebbero essere geneticamente modificate (OGM) oltre ad intossicarsi favoriscono la loro impollinazione con riduzione della biodiversità delle piante e la conseguente perdita di fonti di bottinamento. Si viene a creare così un circolo vizioso, dove da una parte la diminuzione delle api riduce la biodiversità vegetale, che a sua volta sottrae nutrimento alle api. Se da un lato tutti sono d'accordo sulla grande responsabilità dei pesticidi nella moria degli alveari, non vi è invece unanimità sulla soluzione da adottare. Attualmente un provvedimento condiviso da molti è la riduzione dell'uso di pesticidi non solo in agricoltura mentre studi sulla natura, la biologia dei parassiti e patogeni si moltiplicano di anno in anno, con la sperimentazione di nuovi formulati e l'introduzione di tecniche particolari e specifiche per la loro lotta, per cercare di contrastare questo fenomeno di scomparsa delle api.



#### 1.1.4. La storia dell'apicoltura

La venerazione dell'ape e del miele è una costante lungo tutto il corso della storia; odi, canzoni e versi sono stati scritti in loro onore in ogni epoca. La testimonianza più antica della sinergia tra uomo e ape risale al neolitico (5.000-7.000 a.C.) in una rappresentazione rupestre rinvenuta in Spagna nei pressi di Valencia, nella Cueva de la Araña intorno agli anni 20 del Novecento (Figura 15). Si tratta di un uomo con un recipiente nei pressi di un'ansa nella roccia, dove introduce un braccio per prelevare i favi. Alcune api volano attorno all'uomo e i cerchi concentrici che si distinguono probabilmente simulano il fumo. È un cacciatore di miele, figura che esiste ancora presso certe popolazioni primitive. Probabilmente l'uomo della raffigurazione sta raccogliendo le famiglie di api che vivevano nei tronchi cavi delle piante, sezionandoli e sistemandoli nei pressi delle abitazioni. Questa pratica è rimasta in uso fino alla metà del Novecento.



Figura 15. Pittura rupestre rinvenuta nella Cueva de la Araña (Valencia).

Sono stati probabilmente gli Egiziani, i primi a capire l'importanza di offrire alle api un luogo dove creare l'alveare. Nacquero così attorno al 2600 a.C. le prime arnie fatte di rami, canne intrecciate e fango essiccato, avevano forma cilindrica e venivano poste vicine l'una all'altra per agevolare il controllo e l'allevamento delle api. Si praticava l'apicoltura nomade fluviale lungo le sponde del Nilo, il viaggio durava tre mesi, seguendo le fioriture provocate dalle piene del fiume. Ogni popolo ha sviluppato il proprio modo di costruire le arnie, talvolta venivano usati anche oggetti costruiti per altri utilizzi e adattati poi allo scopo dell'apicoltura.

In Medio Oriente si prediligevano i vasi in terracotta, nell'Europa centrale i tronchi svuotati, altrove contenitori di paglia o di fibra vegetale e argilla. Altre testimonianze relativamente ai Sumeri dicono che il miele veniva usato in cosmesi già nel 2000-3000 a.C. Assiri e Babilonesi usavano il miele per le affezioni che colpivano epidermide, occhi, genitali, apparato digerente e trattavano i corpi dei defunti con la cera d'api e con lo stesso miele. I Celti lo usavano nei riti di sepoltura, mentre per gli Etruschi rappresentava una preziosa offerta votiva. I Greci lo consideravano il prodotto degli

arcobaleni e delle stelle e gli conferivano una componente divina tanto da considerarlo il cibo degli dei. L'allora comune credenza voleva che le divinità si cibassero di nettare e ambrosia e che gli dei, in uno slancio di generosità, non potendo dare l'immortalità agli uomini, per confortarli per la loro condizione svantaggiata, permettessero loro di poter gustare il miele facendolo cadere sulla terra dalle loro tavole riccamente imbandite. Lo credevano inoltre un potente elisir di giovinezza e lo somministravano regolarmente agli atleti che concorrevano ai Giochi Olimpici.

Aristotele (384-322 a.C.) è stato il primo a studiare scientificamente le api analizzandone il modo di riprodursi e notando che si dedicano ad una tipologia di fiori alla volta. Fino al termine del Medioevo i suoi scritti sono stati l'unica fonte autorevole sull'argomento. Anche gli antichi greci praticavano il nomadismo spostandosi da una regione all'altra seguendo le fioriture. Nell'antica Roma troviamo importanti studi sulle api e l'apicoltura; Plinio il Vecchio pubblica nel 79 d.C. la "Storia degli animali" dove parla spesso delle api e dell'apiario. Sappiamo per certo che presso i Romani l'apicoltura doveva essere particolarmente sviluppata, praticavano la sciamatura artificiale, costruivano arnie e sperimentavano nuove tecniche. Virgilio, apicoltore e poeta, nelle "Georgiche" tratta dell'organizzazione dell'apiario e della flora apistica; è il primo vero e proprio trattato di apicoltura che sarà utilizzato in tutto il mondo occidentale fino al Cinquecento. I Romani facevano grande uso del miele a scopo terapeutico, cosmetico e in cucina, tanto che era considerato un alimento fondamentale, presente in ogni pasto.

In India, oltre ad avere significati simbolici, il miele era considerato afrodisiaco, tanto da essere l'ingrediente principale di elisir e filtri d'amore. Per lungo tempo e in diverse popolazioni ed epoche il miele veniva inoltre impiegato nei riti religiosi. Non è un caso dunque che anche nel mondo Arabo, nel Corano, viene considerato il simbolo della guarigione sia spirituale sia materiale.

Nel 1448-1482 gli Inca conferivano miele e cera d'api come tributo ai conquistatori europei.

La diffusione dell'allevamento delle api al fine di ottenere miele e cera, due beni preziosi uno principalmente per l'alimentazione, l'altro per la realizzazione delle candele, fu rapida e capillare. La sua importanza alimentare si mantenne inalterata per tutto il Medioevo fino all'avvento dello zucchero intorno alla metà del XVIII quando si scoprì che dalla canna da zucchero si poteva estrarre un prodotto con potere dolcificante più economico del miele. È l'inizio del tracollo nell'uso del miele, che fu rapidamente soppiantato dallo zucchero, che poco dopo cominciò a essere estratto anche dalla barbabietola in modo ancora più redditizio.

Durante il medioevo e fino al XVII secolo l'apicoltura non fa grandi progressi, si trova qualche citazione legislativa, ma nulla di relativo allo sviluppo tecnologico né nella costruzione delle arnie né nello studio delle api (Figura 16). Giovanni Rucellai nel 1812 pubblica un poemetto intitolato "Le api" ricco di osservazioni sull'allevamento dell'autore.



Figura 16. Tacuinum sanitatis, Lombardia, tardo XIV secolo, (Biblioteca Casanatense, Roma)

Alla fine del XVII secolo l'apicoltura fa progressi notevoli, soprattutto grazie all'avvento del microscopio. Swammerdan scopre il doppio stomaco, il pungiglione, il sistema nervoso, il cuore, l'antenna, gli occhi, la doppia ovaia e gli ovidotti della regina. Reaumur (1637-1672) descrive compiutamente la storia delle api nella sua "Storia degli insetti". Shirah pubblica nel 1771 la "Istorie naturelle de la Reine des abeilles".

Lo svizzero Huber (1750-1837), cieco, studiò l'ape costruendo un originale alveare a fogli mobili a forma di libro. Scoprì la fecondazione della regina e la formazione della cera, pubblicò i suoi studi nel 1792 nel libro "Nouvelles observations sur les abeilles". Gli studi di Huber furono perfezionati dal reverendo americano Lorenzo L. Langstroth (1810-1895), che inventò la moderna arnia a telaini mobili. Il suo libro "L'ape e l'arnia" è un classico dell'apicoltura odierna.

Dalla metà dell'800 si diffusero in tutto il mondo i metodi moderni con le tecniche messe a punto da Langstroth (Figura 17). L'ultima scoperta significativa in campo di apicoltura è da ricondurre all'inventiva del maggiore Von Hruska (1819-1888), si tratta dello smielatore che permette di estrarre il miele senza distruggere i favi. L'arnia classica da 10 telaini deriva dal modello originale ideato da Langstroth nel 1851, successivamente modificato da Charles Dadant nel 1859 e da Blatt. Nel 1932 venne standardizzata da Carlo Carlini l'arnia italiana partendo dal modello Dadant-Blatt. L'arnia Italica-Carlini è attualmente il modello più diffuso in Italia.



Figura 17. Immagine di una delle prime arnie Langstroth

## 1.2. L'apicoltura oggi

### 1.2.1. Legislazione comunitaria, nazionale e regionale

#### 1.2.1.1. Legislazione comunitaria e nazionale

La legislazione comunitaria e nazionale si basa sulla legge del 24 dicembre 2004, n.313, che disciplina dell'apicoltura.

La legge riconosce l'apicoltura come attività di interesse nazionale utile per la conservazione dell'ambiente naturale, dell'ecosistema e dell'agricoltura in generale ed è finalizzata a garantire l'impollinazione naturale e la biodiversità di specie apistiche, con particolare riferimento alla salvaguardia della razza di ape italiana (*Apis mellifera ligustica Spinola*) e delle popolazioni di api autoctone tipiche o delle zone di confine.

La conduzione zootecnica delle api, denominata "apicoltura", è considerata a tutti gli effetti attività agricola ai sensi dell'articolo 2135 del codice civile, anche se non correlata necessariamente alla gestione del terreno. Sono considerati prodotti agricoli: il miele, la cera d'api, la pappa reale o gelatina reale, il polline, la propoli, il veleno d'api, le api e le api regine, l'idromele e l'aceto di miele.

E' imprenditore agricolo (Art. 2135 C.C.) chi esercita una delle seguenti attività: coltivazione del fondo, selvicoltura, allevamento di animali e attività connesse. Per coltivazione del fondo, per selvicoltura e per allevamento di animali si intendono le attività dirette alla cura e allo sviluppo di un ciclo biologico o di una fase necessaria del ciclo stesso, di carattere vegetale o animale, che utilizzano o possono utilizzare il fondo, il bosco o le acque dolci, salmastre o marine. Si intendono comunque connesse le attività, esercitate dal medesimo imprenditore agricolo, dirette alla manipolazione, conservazione, trasformazione, commercializzazione e valorizzazione che abbiano ad oggetto prodotti ottenuti prevalentemente dalla coltivazione del fondo o del bosco o

dall'allevamento di animali, nonché le attività dirette alla fornitura di beni o servizi mediante l'utilizzazione prevalente di attrezzature o risorse dell'azienda normalmente impiegate nell'attività agricola esercitata, ivi comprese le attività di valorizzazione del territorio e del patrimonio rurale e forestale, ovvero di ricezione ed ospitalità come definite dalla legge.».

- E' apicoltore chiunque detiene e conduce alveari.
- E' imprenditore apistico chiunque detiene e conduce alveari ai sensi dell'articolo 2135 del codice civile.
- E' apicoltore professionista chiunque esercita l'attività di cui al comma 2 a titolo principale.

Al fine di salvaguardare l'azione pronuba delle api, le regioni, nel rispetto della normativa comunitaria vigente e sulla base del documento programmatico individuano le limitazioni e i divieti cui sottoporre i trattamenti antiparassitari con prodotti fitosanitari ed erbicidi tossici per le api sulle colture arboree, erbacee, ornamentali e spontanee durante il periodo di fioritura, stabilendo le relative sanzioni. Per la difesa dell'ambiente e delle produzioni agroforestali, ai fini dell'applicazione del regolamento (CE) n. 1221/97 del Consiglio e successive modificazioni, un documento programmatico contenente gli indirizzi e il coordinamento delle attività per il settore apistico, con particolare riferimento alle seguenti materie: a) promozione e tutela dei prodotti apistici italiani e promozione dei processi di tracciabilità; b) tutela del miele italiano conformemente alla direttiva; c) valorizzazione dei prodotti con denominazione di origine protetta e con indicazione geografica protetta, , nonché del miele prodotto secondo il metodo di produzione biologico, ai sensi del regolamento; d) sostegno delle forme associative di livello nazionale tra apicoltori e promozione della stipula di accordi professionali; e) sviluppo dei programmi di ricerca e di sperimentazione apistica, d'intesa con le organizzazioni apistiche; f) integrazione tra apicoltura e agricoltura; g) indicazioni generali sui limiti e divieti cui possono essere sottoposti i trattamenti antiparassitari con prodotti fitosanitari ed erbicidi tossici per le api sulle colture arboree, erbacee, ornamentali, coltivate e spontanee durante il periodo di fioritura; h) individuazione di limiti e divieti di impiego di colture di interesse mellifero derivanti da organismi geneticamente modificati; i) incentivazione della pratica dell'impollinazione a mezzo di api; l) incentivazione della pratica dell'allevamento apistico e del nomadismo; m) tutela e sviluppo delle cultivar delle essenze nettariifere, in funzione della biodiversità; n) determinazione degli interventi economici di risanamento e di controllo per la lotta contro la varroasi e le altre patologie dell'alveare; o) potenziamento e attuazione dei controlli sui prodotti apistici di origine extracomunitaria, comunitaria e nazionale; p) incentivazione dell'insediamento e della permanenza dei giovani nel settore apistico; q) previsione di indennità compensative per gli apicoltori che operano nelle zone montane o svantaggiate; r) salvaguardia e selezione in purezza dell'ape italiana (*Apis mellifera* ligustica Spinola e dell'*Apis mellifera* sicula); sostegno e incentivazione dell'impiego di api regine italiane con provenienza da centri di selezione genetica.

Al fine della profilassi e del controllo sanitario, è fatto obbligo a chiunque detenga apiari e alveari di farne denuncia, anche per il tramite delle associazioni degli apicoltori operanti nel territorio, specificando collocazione e numero di alveari, entro centottanta giorni dalla data di entrata in vigore della presente legge e, successivamente, entro il 31 dicembre degli anni nei quali si sia verificata una variazione nella collocazione o nella consistenza degli alveari in misura percentuale pari ad almeno il 10 per cento in più o in meno. Chiunque intraprenda per la prima volta l'attività è tenuto a darne comunicazione ai sensi del comma 2 del presente articolo. Le denunce e le comunicazioni sono indirizzate ai servizi veterinari dell'azienda sanitaria locale competente. I trasgressori all'obbligo di denuncia o di comunicazione non possono beneficiare degli incentivi previsti per il settore.

Essendo dunque l'apicoltura, un'attività zootecnica a tutti gli effetti, questo ha implicato, nel corso degli anni di una regolamentazione circa la conduzione. Con il Decreto Regio (R.D.) del 17 marzo 1927, n. 614 (Regolamento per l'esecuzione del R.D. L. 23 ottobre 1925, n. 2079, contenente provvedimenti per la difesa dell'apicoltura) il censimento degli alveari diviene un obbligo degli apicoltori e già dal 1954 nel Regolamento di Polizia Veterinaria D.P.R. n.320/54, tra le malattie soggette ad obbligo di denuncia, compaiono alcune malattie delle api. Quindi le A.S.L, oltre a controllare le produzioni dell'alveare, svolgono controlli anche sulle api ed in particolare monitorizzano le patologie degli apiari e l'utilizzo di sostanze farmacologicamente attive e verificano l'igiene dell'apiario. Gli apicoltori, in base al D.Lvo 336/99 (oggi sostituito dal D.Lvo 158/06) e alla Legge 313/2004, devono registrare i propri alveari, indipendentemente dal loro numero. Con il Regolamento comunitario n. 797 del 26 aprile 2004 relativo alle azioni dirette a migliorare le condizioni della produzione e della commercializzazione dei prodotti dell'apicoltura, si rende necessario "elaborare programmi nazionali triennali comprendenti interventi di assistenza tecnica, di lotta contro la varroasi, di razionalizzazione della transumanza, di gestione del ripopolamento del patrimonio apicolo comunitario e di collaborazione nel quadro di programmi di ricerca in materia di apicoltura e dei suoi prodotti.

### **1.2.1.2. Legislatura regionale**

A livello regionale la Toscana sostiene tramite la Legge regionale del 18 aprile 1995, n° 69. Istituita la Commissione tecnica regionale apistica, la legge decreta che ai fini dell' incremento e della razionale utilizzazione delle risorse zootecniche minori della regione, dello sviluppo e del miglioramento quantitativo e qualitativo delle produzioni agricole, nel rispetto della rinnovabilità delle risorse ambientali, la Regione Toscana assume e favorisce iniziative atte ad assicurare lo sviluppo dell' apicoltura, a valorizzare i prodotti, a tutelare la razza ligustica ed a salvaguardare gli ambienti usati come pascoli per le api, considerate fattori di tutela dell' ecosistema. La Regione Toscana riconosce l'importanza fondamentale dell'attività impollinatrice svolta dagli insetti pronubi, allevati e selvatici, nella conservazione dell'ambiente naturale e nelle produzioni agricole.

La Regione Toscana, nei limiti degli stanziamenti previsti dalle leggi di bilancio, predispone programmi annuali d'intervento, orientati alla tutela, promozione ed incentivazione dell' apicoltura.

La presente legge riconosce a tutti gli effetti l'apicoltura, effettuata da produttori apistici, come attività imprenditoriale agricola di tipo zootecnico. Tale riconoscimento è valido anche qualora detta attività sia svolta da produttori apistici che non siano titolari di reddito agrario proprietà o affitto di terreni.

Ai fini di consentire la profilassi ed il controllo sanitario nonché l'acquisizione di informazioni utili per la programmazione di interventi pubblici a favore dell' apicoltura è fatto obbligo ai possessori o detentori di alveari, di qualunque tipo di farne denuncia, annualmente, all'Unità Sanitaria Locale competente. Chiunque inizi l' attività apistica o costituisca un nuovo apiario è tenuto ad ottemperare, entro 10 giorni dall'installazione, agli obblighi di detenzione e denuncia. Per gli anni successivi all'impianto dell'apiario la denuncia deve essere rinnovata nel periodo che intercorre tra il primo novembre e il 31 dicembre di ogni anno. Nella fase di prima attuazione della presente legge la denuncia deve essere effettuata entro 120 gg dalla entrata in vigore della medesima. Gli apicoltori, anche se provenienti da altre regioni, che praticano il nomadismo o il servizio d'impollinazione o che comunque spostino i propri alveari sono tenuti a comunicare per iscritto, entro 10 giorni dallo spostamento stesso, l'avvenuta installazione degli apiari alle Unità Sanitarie Locali competenti per il territorio nel quale questi vengono situati. Le Unità Sanitarie comunicano alla Giunta regionale, entro il 31 gennaio di ogni anno, i dati derivanti dalle denunce e dalle comunicazioni d'installazione di apiario nomade.

Entro un anno dall'entrata in vigore della presente legge ogni apiario, sia esso nomade o stanziale, deve essere identificato. La Giunta regionale, con proprio atto da emanare entro 6 mesi dall' entrata in vigore della presente legge, stabilisce le modalità di identificazione degli apiari.

Ciascun alveare componente un apiario deve essere collocato a non meno di quindici metri nella direzione di sortita delle api e a non meno di dieci metri nelle altre direzioni rispetto: a) ai confini di proprietà ; b) agli edifici di civile abitazione; c) gli opifici nei quali una o più persone svolgono la propria attività anche se temporaneamente; d) alle strade di pubblico transito. L'apicoltore non è tenuto al rispetto di tali distanze se tra l'apiario e gli immobili di cui al sono interposti muri, siepi od altri ripari senza soluzione di continuità. Tali ripari devono avere un'altezza di almeno due metri ed estendersi per altrettanto spazio oltre gli alveari posti all'estremità dell' apiario.

Tale legge è stata abrogata nel 2009 e sostituita con la Legge regionale del 27 aprile 2009, n. 21 riportante le "Norme per l'esercizio, la tutela e valorizzazione dell'apicoltura". Viene ribadito il concetto, già chiaramente espresso, di considerare le api quali fattori di tutela dell'ecosistema e dell'agricoltura in generale. Preservare la biodiversità delle specie apistiche ed in particolare dell'ecotipo toscano costituisce infatti un obiettivo da perseguire per la regione Toscana, tant'è che con questa legge viene sottoscritto un piano d'intervento da seguire per salvaguardare *l'Apis mellifera* dalle avversità. La programmazione regionale si impegna poi ad individuare interventi di promozione ed incentivazione dell'apicoltura e dei prodotti dell'alveare. Punti di forza della norma sono: il censimento del patrimonio apistico regionale, la

tutela dalle sostanze tossiche delle api e degli insetti pronubi e la predisposizione di norme tecniche di prevenzione delle principali malattie degli apiari.

### **1.2.2. Risoluzione del Parlamento Europeo 25 novembre 2010**

Il Parlamento europeo, viste le grandi difficoltà incontrate dall'apicoltura europea negli ultimi anni, considerando che nel 2010, anno europeo della biodiversità, su scala mondiale, il settore dell'apicoltura è stato gravemente minacciato con perdite tra cento e mille volte più rapide del normale, riconoscendo che il settore dell'apicoltura svolge una funzione strategica, poiché "le sue attività sono un limpido esempio di «occupazione ecologica» (miglioramento e mantenimento della biodiversità, equilibrio ecologico e conservazione della flora) e un modello di produzione sostenibile nel mondo rurale", alla luce delle prestazioni pubbliche ed ecologiche che gli apicoltori realizzano per la società, sottolinea la necessità di rispondere favorevolmente alle richieste degli Stati membri e degli operatori del settore, migliorando ad esempio i dati statistici relativi alle previsioni di produzione, compresa l'introduzione di identici requisiti di qualità per il miele, e migliorando e armonizzando i programmi di monitoraggio e di ricerca nel settore dell'apicoltura. Si rende altresì necessario migliorare le condizioni sanitarie del prodotto armonizzando i controlli alle frontiere, in particolare per le importazioni da paesi terzi, poiché l'importazione di miele di scarsa qualità, le sofisticazioni e i surrogati sono fattori di distorsione del mercato ed esercitano una pressione costante sui prezzi e la qualità finale del prodotto nel mercato interno dell'UE.

Grande attenzione viene posta sulle modalità di controllo delle diverse patologie. Viene riconosciuto che lo sviluppo di trattamenti innovativi ed efficaci per combattere l'acaro *Varroa destructor*, parassita responsabile in alcune regioni di notevoli perdite annuali, riveste grande importanza. Si ritiene che occorra incrementare la disponibilità di efficaci trattamenti veterinari contro tale acaro e contro tutte le patologie riconducibili ad esso nell'intero territorio europeo; viene chiesto alla Commissione di introdurre orientamenti comuni in materia di trattamenti veterinari in tale settore, con l'indispensabile collaborazione delle organizzazioni degli apicoltori. Risulta di particolare interesse realizzare indipendenti e tempestive ricerche sulle cause di mortalità delle api affinché i dati poi ottenuti siano resi pubblici indipendentemente dai danni che ne potrebbero derivare ad altri settori dell'agricoltura, come ad esempio nel caso della valutazione degli effetti sull'ambiente dei prodotti fitosanitari (quali le sementi confettate), delle colture geneticamente modificate e della diffusione di tossine da fonti varie. Perché tutto questo sia realizzabile, è necessario dunque che gli aiuti finanziari al settore apistico vengano erogati anche dopo al 2013, anno in cui termina il programma di sostegno della PAC, al fine di garantire la continuità e il miglioramento di questo settore.



### 1.2.3. L'apicoltura in numeri

#### 1.2.3.1. Europa

Tabella 1. Numero di alveari in Europa

Stato Membro	Popolazione apiari. Numero di alveari
BE	112 000
BG	617 420
CZ	497 946
DK	170 000
DE	711 913
EE	24 800
EL	1 502 239
ES	2 459 373
FR	1 338 650
IE	24 000
IT	1 127 836
CY	43 975
LV	64 133
LT	117 977
LU	8 171
HU	900 000
MT	2 722
NL	80 000
AT	367 583
PL	1 123 356
PT	562 557
RO	1 280 000
SI	142 751
SK	235 689
FI	46 000
SE	150 000
UK	274 000
EU 27	13 985 091



**Grafico 1. Numero di alveari in Europa**

In Europa nei 27 Stati si contano circa 14.000.000 alveari, come si può vedere dalla tabella e dal grafico (Tabella 1 e Grafico 1) che riportano i dati del Regolamento (EU) N° 726/2010 della Commissione del 12 agosto 2010 del consiglio relativo alle misure destinate al miglioramento delle condizioni per la produzione e la commercializzazione dei prodotti del settore dell'apicoltura. In Europa si contano circa 700.000 apicoltori, di cui approssimativamente il 97% è costituito da apicoltori non professionisti che rappresentano il 67% circa degli alveari nell'UE. Si stima che la produzione di miele si avvicini alle 200.000 tonnellate (dati pubblicati dalla Commissione europea, dicembre 2010). Inoltre si deve tenere conto anche che l'apicoltura è associata ad altri prodotti quali cera, pappa reale, propoli ecc.

#### 1.2.3.2. Livello Nazionale

A livello nazionale invece l'attività apistica viene considerata spesso un'integrazione di reddito per gli imprenditori agricoli e rappresenta un'attività primaria solo per una piccola percentuale di apicoltori. Si tratta di una pratica strettamente legata alle produzioni agricole e alla vegetazione spontanea, ma contribuisce ad una gestione sostenibile anche delle aree marginali. In Italia operano circa 70.000 apicoltori. Di questi sono imprenditori apistici circa il 14% (9.800) che si stima detengano circa 200.000 alveari.

Nel nostro Paese gli alveari denunciati presso le Aziende Sanitarie ammontano a circa 1.156.000, (Tabella 2) ma le autorità locali concordano nel definire il dato ufficiale sottostimato rispetto alla realtà produttiva (dati Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali censimento del programma nazionale anno 2007-2010 dipartimento delle filiere agricole e agroalimentari direzione generale delle politiche agricole POLAGR VII reg. ce n° 797/2004 del consiglio azioni dirette a migliorare la produzione e la commercializzazione dei prodotti dell'apicoltura stato membro: Italia programma nazionale anno 2007-2010). In base alla produzione di miele dei dati di Ismea elaborati da Unaapi il miele prodotto in un anno dalle 8.000 alle 11.000 tonnellate, a seconda dell'andamento stagionale e meteorologico, con un valore

monetario pari a 20,6 milioni di € per la produzione (materia prima, quotazioni all'ingrosso), con un valore stimato del settore compreso l'indotto 57-62 milioni di €/anno. Il Valore monetario stimato per il servizio di impollinazione all'agricoltura 2,6 miliardi di €/anno e il valore monetario stimato per impollinazione delle specie spontanee a fini di tutela ambientale 2,6-3,6 miliardi di €/anno ( Dati osservatorio del miele 2005-2006) (Tabella 3).

**Tabella 2. Numero alveari in Italia**

REGIONI	N° ALVEARI
VALLE D'AOSTA	7.206
PIEMONTE	108.311
LOMBARDIA	136.799
LIGURIA	24.027
FRIULI V. G.	27.576
BOLZANO	40.414
TRENTO	23.000
VENETO	56.661
EMILIA ROMAGNA	106.644
MARCHE	38.118
TOSCANA	97.331
UMBRIA	32.500
LAZIO	82.236
ABRUZZO	45.471
MOLISE	8.500
CAMPANIA	48.208
BASILICATA	46.853
PUGLIA	14.200
CALABRIA	57.449
SICILIA	103.801
SARDEGNA	51.434
ITALIA	1.156.739

**Tabella 3. Dati osservatorio del miele 2005-2006**

Apicoltori	50 mila (di cui 7.500 professionali)
Produzioni annua media italiana	11 mila tonnellate
Valore monetario della produzione (materia prima, quotazioni all'ingrosso)	20,6 milioni di Euro
Valore stimato del settore compreso l'indotto	57-62 milioni di Euro/anno
Valore monetario stimato per il servizio di impollinazione all'agricoltura	2,6 miliardi di Euro/anno
Valore monetario stimato per impollinazione delle specie spontanee a fini di tutela ambientale	2,6-3,6 miliardi di Euro/anno

### 1.2.3.3. Livello regionale: la situazione in Toscana

Tabella 4. Situazione apicoltura regione Toscana (Dati REGIONE TOSCANA Apicoltura-dati relativi al 31/12/2010)

ASL	N° totale miellerie presenti sul territorio	N° complessivo degli apicoltori registrati	N° complessivo degli apicoltori che hanno comunicato i dati del censimento	N° totale degli apiari censiti	N° alveari censiti	N° complessivo degli apicoltori con più di cento alveari
Massa Carrara	45	294	150	234	7239	17
Lucca	69	392	186	311	10379	32
Pistoia	26	164	109	162	3181	8
Prato	11	174	128	183	1617	0
Pisa	20	252	143	350	5075	15
Livorno	14	156	113	270	5159	10
Siena	53	388	252	459	6958	18
Arezzo	58	495	317	662	12028	26
Grosseto	35	444	114	280	10257	27
Firenze	36	491	216	378	7255	14
Empoli	24	117	91	118	3800	8
Versilia	17	95	27	41	1140	2
<b>TOTALE</b>	<b>408</b>	<b>3462</b>	<b>1846</b>	<b>3448</b>	<b>74088</b>	<b>177</b>

In base al censimento che la Regione Toscana ha effettuato nel 2010 risulta che in Toscana sono attivi circa 3462 apicoltori, questi sono gli apicoltori che sono registrati a una Azienda Sanitaria Locale (Tabella 4). La provincia che detiene il maggior numero di apicoltori è Arezzo (14%), a pari merito con Firenze (14%), a seguire Grosseto (13%), Lucca (11%) e Siena (11%), fino ad arrivare alla Versilia (~3%) che risulta come provincia con meno apicoltori (Grafico 2).

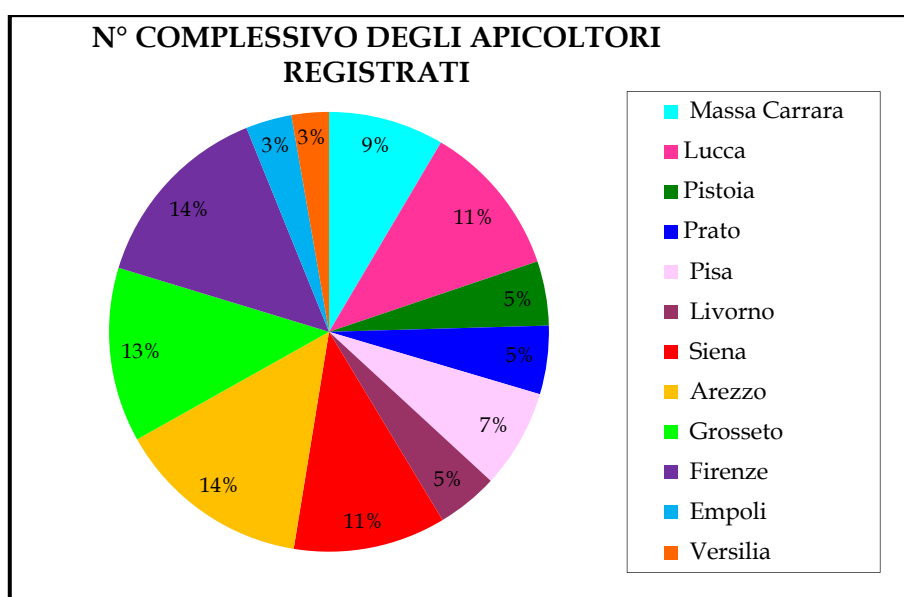


Grafico 2. Numero apicoltori registrati

Per quanto riguarda la distribuzione degli apiari, questa si concentra per circa il 50% nelle provincie di Arezzo (19.9%), Siena (13,3%), Firenze (10,9%) e Pisa (10,1%) (Grafico 3).

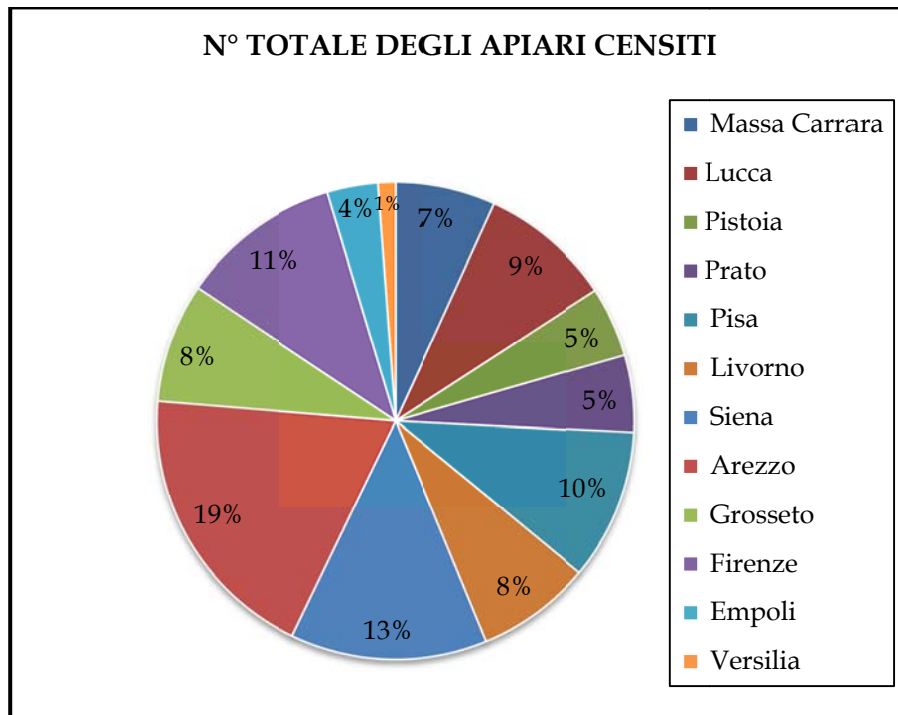
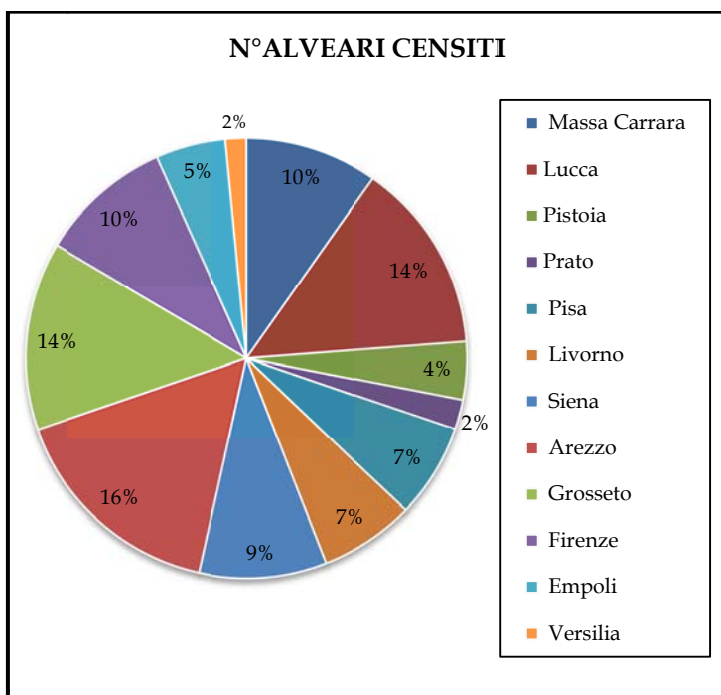
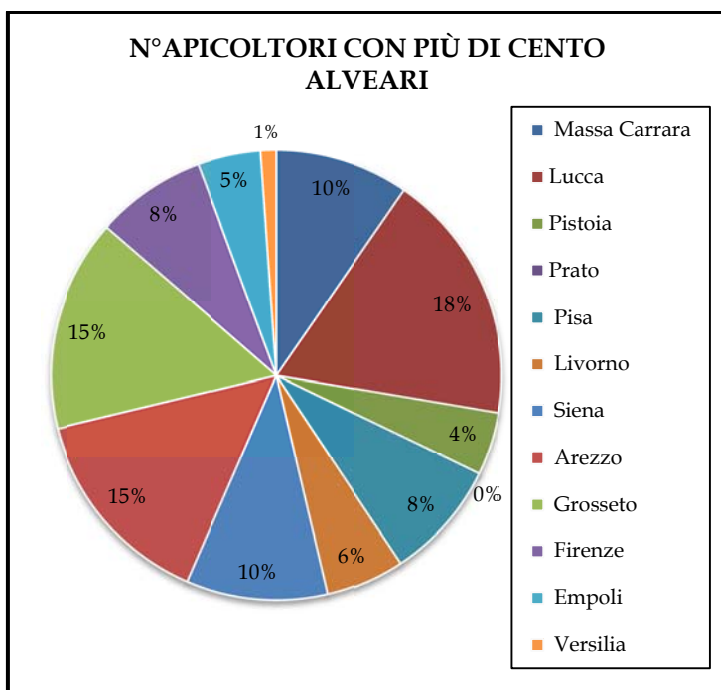


Grafico 3. Distribuzione apiari in Toscana

L'analisi sulla struttura degli alveari è stata condotta prendendo in esame il numero di arnie per alveare come indicatore della dimensione degli apiari toscani. Le province che eccedono per questo valore, e che quindi sono caratterizzate da apiari maggiormente strutturati, sono Arezzo, Lucca e Grosseto, rispettivamente con le loro percentuali di 16%, 14% e 14% (Grafico 4). Un altro parametro considerato è stato quello della consistenza degli apiari nel numero di arnie, quindi considerare il numero di apicoltori che hanno un numero maggiore di cento arnie. Nelle provincie di Lucca, Grosseto, Arezzo e Siena si hanno il maggior numero di apicoltori che hanno un numero di alveari superiore a cento, mentre in provincia di Prato nessun apicoltore supera la soglia dei cento alveari per apiario (Grafico 5).



**Grafico 4. Numero alveari in Toscana**



**Grafico 5. Numero apicoltori con più di cento arnie**

#### **1.2.4. L'impegno della Regione Toscana a sostegno dell'apicoltura**

Per approfondire le cause di morie e spopolamento degli alveari, il Ministero delle Politiche Agricole e Forestali ha finanziato nel 2009 un progetto di ricerca biennale, denominato Apenet, all'interno del quale viene condotto un piano di monitoraggio sullo stato di salute degli alveari nella maggioranza delle regioni italiane. Il Dipartimento dello Sviluppo Economico della Regione Toscana ha finanziato un'integrazione del monitoraggio regionale incrementando di altri 20 apiari (rispetto ai 5 previsti dal piano di monitoraggio nazionale), per un totale di 25 apiari dislocati nelle diverse province toscane.

Il progetto regionale, coordinato dall'IZSLT (Istituto Zooprofilattico sperimentale per il Lazio e la Toscana) ed attuato in collaborazione con le associazioni degli apicoltori, quali A.R.P.A.T. (Associazione Regionale Produttori Apistici Toscani), A.A.P.T (Associazione Apicoltori Province Toscane), Toscana Miele (A.P.A), l'Amministrazione Provinciale di Siena e le Aziende Sanitarie Locali, ha l'obiettivo di ottenere specifiche informazioni sull'estensione dei fenomeni di spopolamento e morte degli alveari nelle zone più a rischio e nelle aree naturali protette della regione Toscana. Dai risultati del primo anno di monitoraggio non sono state riscontrate morie massive di api. Sul fronte poi della valorizzazione delle competenze tecnico-scientifiche del settore apistico, la regione Toscana sta cercando di costruire una rete di eccellenza regionale che si avvale dell'apporto di enti, istituzioni ed associazioni di settore. Nell'ambito di questa rete viene promossa un'attività di supporto tecnico-scientifico e di ricerca per il miglioramento della salute delle api, della qualità del miele e della valorizzazione dei prodotti dell'apicoltura toscana.

#### **1.2.5. Moria delle api**

Negli ultimi quindici anni si sono registrati gravi fenomeni di mortalità, disorientamento e spopolamento di famiglie di api in numerosi paesi, inclusa l'Italia. Nel 2007 tali episodi hanno causato una perdita tra il 30 e il 50% del patrimonio apistico nazionale ed europeo. In Francia, il sospetto di questi spopolamenti è ricaduto quasi subito su gli insetticidi neonicotinoidi utilizzati per la concia delle sementi. Ben presto la forte mobilitazione degli apicoltori e dei ricercatori del settore ha portato alla sospensione nel 1999 del Gaucho® (imidacloprid) per la concia delle sementi di girasole e nel 2004 del Gaucho® e del Regent® (fipronil) per la concia delle sementi di mais. Negli Stati Uniti per giustificare le ingenti perdite di colonie di api si è iniziato a parlare di Colony Collapse Disorder (CCD) ovvero di una sindrome non ben identificata legata a numerose variabili, che porta alla scomparsa delle bottinatrici e al collasso dell'intera colonia. In alcune aree degli Stati Uniti il fenomeno dello spopolamento, avrebbe addirittura raggiunto punte del 60-70%. In Italia le perdite di api e d'interi colonie sono diffuse su tutto il territorio nazionale con particolare frequenza nel nord Italia sia in aree coltivate a mais che viticole a causa dei trattamenti obbligatori che si effettuano per il controllo dello *Scaphoideus titanus* vettore della micoplasmosi nota come Flavescenza dorata della vite. Proprio a questo riguardo, il 17 settembre 2008, il Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali ha firmato la sospensione cautelativa dell'autorizzazione all'impiego

di neonicotinoidi (Clothianidin, Thiame-thoxam, Imidacloprid, e Fipronil) per la concia delle sementi; sospensione che è stata riconfermata, prima nel settembre 2009 e prorogata per un ulteriore anno. Con il Decreto del 28 giugno 2011 si assiste a un prolungamento della proroga fino al 31 ottobre 2011 e ad oggi la sospensione è stata prorogata fino a dicembre del 2012. La sospensione ha dato risultati positivi comportando una drastica riduzione dei casi di avvelenamento: dai 165 del 2008 ai 2 del 2009 (peraltro dovuti sempre alla esposizione con sostanze neonicotinoidee). Va comunque considerato che, oltre ai casi di moria di api dovuti a fenomeni di avvelenamento, esistono anche molti casi di moria dovuti alle malattie delle api.

Secondo uno studio fatto dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana nel 2008, i patogeni principalmente coinvolti nei fenomeni di moria delle api sono risultati essere:

1. *Varroa destructor* associata alle virosi, che insieme danno il quadro patologico noto con il nome di: "Parasitic Mite Syndrome" - PMS;
2. *Paenibacillus larvae*, agente responsabile della peste americana (PA);
3. *Melissococcus plutonius*, agente responsabile della peste europea (PE);
4. *Nosema spp.* responsabile della nosemiasi.

In seguito ad alcune richieste del Parlamento Nazionale, il Dipartimento Difesa della Natura dell'A.P.A.T, Servizio Uso Sostenibile delle Risorse Naturali, ha avviato una serie di iniziative ed indagini volte ad accertare le attuali conoscenze sulle cause dell'aumento della mortalità delle colonie di api, con particolare riferimento alle condizioni del territorio nazionale. Lo spopolamento determina, infatti, la perdita di biodiversità, in termini di riduzione delle specie di apoidei e di flora coltivata e spontanea, e un forte calo della produzione agricola nazionale, causata dall'insufficiente impollinazione delle piante. In molti casi l'incapacità di definire con precisione le cause della mortalità degli alveari ha fatto sorgere l'idea dell'esistenza di un fenomeno "multifattoriale". Tuttavia, anche se non si può escludere a priori l'esistenza di nuove avversità delle api non ancora identificate, è necessario esaminare con molta attenzione e spirito critico fattori già ampiamente conosciuti. Varroasi, infezioni virali, nosemiasi, malattie batteriche e fungine, condizioni climatiche sfavorevoli e avvelenamenti potrebbero aver prodotto una miscela mortale ingestibile in modo ordinario. L'apicoltore, che difende le api sul campo, si sente completamente indifeso, senza le risorse e gli strumenti necessari a contrastare questo fenomeno. Il protrarsi di una situazione di questo tipo potrebbe provocare rassegnazione e abbandono del settore in modo irreversibile. A riguardo, è importante comprendere che attualmente l'imprenditore apistico non è più in grado di pianificare le produzioni e rispondere pertanto alle esigenze di mercato. Si rende perciò necessario individuare delle priorità d'intervento su cui puntare al fine di ottenere dei risultati tempestivi, efficaci e soprattutto utili agli apicoltori per la difesa dell'ape. Il pericolo principale è rappresentato dalla varroa, anche perché a essa sono legate molte altre malattie devastanti per le api ed in particolare quelle determinate da vari agenti virali.

Gli effetti dell'infestazione di *Varroa destructor* sull'ape possono essere di tipo fisico e fisiologico: diminuzione di peso, deformità, riduzione della durata di vita dell'insetto, cambiamenti comportamentali. Una conseguenza nefasta della parassitosi è senza dubbio il fatto che l'indebolimento generale della famiglia aumenta la sensibilità delle api alle infezioni fungine e batteriche; inoltre la varroa è



vettore di numerosi virus; le api parassitate e colpite dalle virosi hanno un periodo di vita molto ridotto rispetto alle api sane. In aggiunta l'inefficacia di molti trattamenti acaricidi può far insorgere fenomeni di resistenza con un aumento generalizzato dei livelli d'infestazione e può aver influito in modo determinante sulla sopravvivenza complessiva degli alveari alla chiusura della stagione produttiva.

L'affermarsi poi, delle monocolture in successione ("perenni" e con effetti addirittura desertificanti in alcuni areali), assieme a quello delle coltivazioni geneticamente modificate, comporta l'impressionante incremento d'utilizzo di diserbanti e una immensa perdita di biodiversità vegetale e di conseguenza animale. Il "deserto" di varietà botaniche, che caratterizza oramai grandi superfici agricole, penalizza in particolare le necessità di approvvigionamento delle api nei periodi dello sviluppo e nelle fasi vitali della preparazione all'invernamento e della ripresa primaverile. Altra malattia che ha causato la perdita di percentuali importanti del patrimonio apistico è la Nosemiasi, causata da un microsporidio patogeno dell'ape adulta, *Nosema ceranae*. Da non sottovalutare sono inoltre le condizioni climatiche avverse, che non permettono un'ottimale raccolta di nettare e polline, e quindi possono essere causa di carenze e stress nutrizionali che debilitano le colonie predisponendole agli attacchi parassitari.

Infine un altro fattore di spopolamento ancora più recente: *Senotainia tricuspis* (Meigen). In Italia dal 1993 è stata registrata una diffusa presenza negli apiari di tale dittero sarcofagide, mosca responsabile della miasi apiaria. Tale parassita è stato rilevato in quantità cospicua in numerosi campioni biologici provenienti da aree ove sono state riscontrate insolite morie estive ed autunnali di api mellifiche.

Proprio per questa serie di fattori qui sopra elencati, si rende necessario istituire sul territorio italiano una rete fissa di monitoraggio per conoscere l'estensione dei fenomeni e definire le azioni da intraprendere a livello nazionale. Nel settore agricolo sarebbe auspicabile ridurre la monocoltura, limitare l'impiego dei prodotti fitosanitari, aggiornare ed informare continuamente gli agricoltori per un corretto impiego dei fitosanitari, in particolare per i neonicotinoidi, i regolatori di crescita e i microcapsulati.

### 1.3. Apicoltura biologica

L'apicoltura essendo un allevamento deve sottostare a norme e leggi che disciplinano l'agricoltura, in particolare per quanto riguarda il settore biologico. Nell'apicoltura biologica l'allevamento delle api è svolto tramite metodi e pratiche rispettose sia dell'ambiente e del benessere animale, il che prevede la limitazione nell'uso e nell'emissione nell'ambiente di sostanze non presenti in natura. L'allevamento biologico dovrebbe garantire il rispetto delle esigenze comportamentali specifiche degli animali. Le condizioni di stabulazione specifiche e le pratiche di allevamento di determinati animali, comprese le api devono garantire un livello elevato di benessere, una delle priorità dell'agricoltura biologica, e per questo motivo possono andare al di là delle norme comunitarie in materia di benessere applicabili all'agricoltura in generale. L'agricoltura così come l'allevamento biologico sono regolati da Regolamenti europei, che dal 1992 disciplinano questo settore. Attualmente, il Reg. (CE) 834/2007 che indica obiettivi e principi comuni a tutti i settori del comparto biologico e detta le norme fondamentali relative alla produzione biologica, assicurando che gli obiettivi e i principi vengano applicati ugualmente a tutte le fasi della produzione biologica animale e vegetale, dell'acquacoltura e dei mangimi, nonché alla preparazione di alimenti biologici trasformati e il Reg (CE) 889/2008 che riporta invece le modalità di applicazione dei principi e degli obiettivi del suddetto regolamento sono quelli che disciplinano l'agricoltura biologica in Italia e quindi anche l'apicoltura. Per quanto riguarda il settore apicolo il regolamento stabilisce che riguardo l'origine degli animali biologici, è privilegiato l'uso di *Apis mellifera* e delle sue subspecie locali. Riguardo i requisiti e le condizioni di ricovero specifici applicabili all'apicoltura l'ubicazione degli apiari deve essere tale che, nel raggio di 3 km dal luogo in cui si trovano, le fonti di nettare e polline siano possibilmente costituite essenzialmente da coltivazioni ottenute con il metodo di produzione biologico e/o da flora spontanea e/o da coltivazioni sottoposte a cure colturali di basso impatto ambientale per assicurare una distanza sufficiente da qualsiasi fonte contaminante quali i centri urbani, le autostrade, le aree industriali o le discariche. Riguardo la gestione degli animali, sono vietate mutilazioni quali la spuntatura delle ali delle api regine e l'alimentazione delle colonie di api è autorizzata soltanto quando la sopravvivenza degli alveari è minacciata da condizioni climatiche avverse e unicamente tra l'ultima raccolta di miele e 15 giorni prima dell'inizio del successivo periodo di disponibilità del nettare o della melata ed effettuata con miele, zucchero o sciroppo di zucchero biologici. La cera dei favi e dei melari per i nuovi telaini deve provenire da unità di produzione biologica. In caso di nuovi impianti o durante il periodo di conversione, può essere utilizzata cera non biologica (in deroga) unicamente se la cera prodotta biologicamente non è disponibile in commercio, se è dimostrato che la cera non biologica è esente da sostanze non autorizzate nella produzione biologica e se la cera non biologica utilizzata proviene da opercoli. La cera biologica deve essere esente da residui, gli enti di certificazione analizzandola ricercano la presenza di principi attivi di sintesi quali Coumaphos (max 200 ppb), Fluvalinate (max 100 ppb), Clorfenvinphos (non rilevabile), Amitraz, Cimiuzolo che per un totale non superiore a 300 ppb. Il reperimento di cera biologica risulta sempre più difficile a causa dei trattamenti antivarroa con Coumaphos (sostanza liposolubile) e della contaminazione che si ha

nella lavorazione in cererie. Per evitare che l'apicoltore si trascini dietro l'inquinamento che deriva dai fogli cerei acquistati, anche se non fa direttamente uso di prodotti di sintesi sui propri alveari, una possibile soluzione è quella di utilizzare in deroga la propria cera d'opercolo o acquistare da cererie che hanno una linea biologica della cera dedicata o reperire sul mercato fogli cerei con analisi. Vengono dettate anche norme specifiche applicabili alla profilassi e ai trattamenti veterinari in apicoltura dove i medicinali veterinari possono essere utilizzati se la loro corrispondente utilizzazione è autorizzata nello Stato membro interessato secondo la pertinente normativa comunitaria o secondo la normativa nazionale in conformità del diritto comunitario. In buona parte dei grandi paesi produttori di miele la prevenzione e la lotta alle malattie batteriche viene attuata con l'ausilio di antibiotici e sulfamidici. In Italia, e nel resto dell'Unione Europea, non esistono invece preparati autorizzati a base antibiotica neanche per l'utilizzo in apicoltura convenzionale, e il miele, deve risultare esente da qualsiasi residuo di tali sostanze. Nei casi d'infestazione da *Varroa destructor* possono essere usati l'acido formico, l'acido lattico, l'acido acetico e l'acido ossalico nonché mentolo, timolo, eucaliptolo o canfora e durante un trattamento in cui siano applicati prodotti allopatrici ottenuti per sintesi chimica, le colonie trattate devono essere isolate in apposito apiario e la cera deve essere completamente sostituita con altra cera proveniente da apicoltura biologica. Successivamente esse saranno soggette al periodo di conversione di un anno.

### **1.3.2. Apicoltura biologica nel mondo**

Sono riportati qui (Tabella 5) i dati relativi al numero di apicoltori biologici presenti nei vari Paesi, sia europei che extra-europei pubblicati dopo un'intervista in occasione del primo congresso internazionale sull'apicoltura biologica svolto a Sunny Beach ad agosto 2010 ed organizzato dall'Associazione Apicoltori Bulgari in collaborazione con Apimondia.

**Tabella 5. Dati sull'apicoltura biologica nel mondo**

Paese	Numero di apicoltori bio (% del totale)	Numero di apicoltori	Commento
Aizerbaidjan	-	30.000	Ufficialmente non esistono apicoltori certificati
Bulgaria	150 (0.3 %)	45.000	44.861 ovvero circa il 6,5 % del totale degli alveari sono certificati con una media di 300 alveari per apicoltore. Esistono 10 Organismi di certificazione. Ogni apicoltore riceve circa 15 euro per ogni alveare biologico allevato
Canada	10.000* (2%)	600.000*	Le aziende certificate sono perlopiù in Quebec dove operano nove apicoltori. Il più grande ostacolo sono le colture OGM.
Germania	600 (0.7 %)	85.000	25. 000 ovvero il 3 % di tutti gli alveari sono biologici, 42 alveari per apicoltore. Sono operanti i regolamenti UE, leggi nazionali e differenti regolamenti privati e 8 organismi di certificazione Residui max di acaricidi nella cera: < 0.5 mg/kg per ciascun principio attivo
Francia	219 (0.3%)	80.000	42.500 ovvero il 3 % di tutti gli alveari sono certificate bio, 194 alveari per apicoltore, 7 % l'incremento dal 2007 al 2008.
Georgia	15 (0.2 %)	6.600	Regolamento: Elkana e regolamentazione nazionale; certificazione: Caucascert.
Grecia	100 (0.4 %)	24.000	11 organizzazioni di certificazione. La Grecia è uno dei più grandi produttori di miele di melata biologica.
Italia	9.000 (13 %)	70.000	<b>Circa 100 000 ovvero circa l'8 % di tutti gli alveari sono certificati. 11 alveari per apicoltore. 13 Organismi di certificazione. Consumo di miele biologico: 3.6 % del totale.</b> <b>Residui di acaricidi nella cera &lt; 0,2 o 0,1 mg/kg per ogni principio attivo</b>
Libano	nessuno	132.000*	Due organismi di certificazione; c'è una Associazione per l'agricoltura biologica Libanese
Repubblica della Macedonia	15.000* (20%)	75.000*	Biocert e Procert le principali etichette individuali.
Mexico	448 (1 %)	45.000	46.300 ovvero circa il 2.3 % di tutti gli alveari sono certificati. Sono esportate 1.150 tonnellate di miele bio, circa il 5 % di tutto il miele esportato. Certificazioni: IMO e Certimex.
Moldova	1	6.000	5 apicoltori in transizione
Polonia	60 (0.1 %)	44.000	1.000 ovvero lo 0.1% di tutti gli alveari sono certificati, 17 alveari per apicoltore, miele prodotto circa 25 t. 11 organismi di certificazione.
Portogallo	49 (0.15 %)	16.267	6.120 ovvero l'1 % di tutti gli alveari sono certificati, 124 alveari per apicoltore. 7 Organismi di certificazione
Romania	620 (0.8 %)	80.000	20% degli operatori biologici.
Russia	nessuno	300.000	Le statistiche ufficiali non comprendono apicoltori biologici ma alcune volte il miele è venduto sotto la denominazione di biologico
Slovacchia	1 (< 0.1 %)	20.000	400 o 0,2 % di tutti gli alveari sono certificati. Un nuovo regolamento nazionale del 2010 potrebbe creare migliori condizioni per lo sviluppo dell'apicoltura biologica
Spagna	194 (0.8 %)	25.000	57.600 ovvero circa il 3% di tutti gli alveari sono certificati, 300 alveari per apicoltore.
Svizzera	400 (2 %)	20.000	Regolamento nazionale, Demeter e Bio-Suisse, Residui di acaricidi nella cera: < 0.5 mg/kg per ogni principio attivo
Turchia	147 (0.1 %)	115.000	318 apicoltori in conversione; nessun residuo ammesso. 400 t di miele biologico prodotto ovvero il 5 % del totale.
UK	1 a 6 (0.01%)	40.000	Non vi sono ufficiali statistiche sull'apicoltura biologica. 6 organismi di certificazione e ognuno di essi ha un proprie norme in accordo con UK Standard biologici
Ucraina	1 (< 0.01 %)	50.000	

### 1.3.2.1. Unione Europea

Nei Paesi dell'Unione Europea gli apicoltori biologici rappresentano tra lo 0,1% e il 13% (Italia) di tutti gli apicoltori. Il numero di alveari certificati biologici in 7 paesi esaminati varia tra i 1.000 e 100.000, in rappresentanza 0,1-8% del totale alveari; il maggior numero è presente in Italia. Ciascun apicoltore, in questi 7 paesi, gestisce da 11 (Italia) a 300 (Bulgaria e Spagna) colonie. In media un apicoltore biologico, in questi paesi, gestisce 141 alveari, mentre ogni apicoltore convenzionale gestisce solo 28 alveari. L'Italia è leader con circa 100.000 alveari certificati biologici, ovvero circa l'8% di tutti gli alveari del paese, seguita dalla Spagna con 57.600 alveari. Al terzo posto si trova la Bulgaria con 44.861 alveari certificati. Anche se non ci sono informazioni relative agli alveari biologici provenienti da Romania o dall'Ungheria, la loro produzione biologica sembra essere significativa e il loro miele è spesso commercializzato in Germania, soprattutto mieli di acacia e tiglio.

### 1.3.2.2. Paesi non EU

Nella maggior parte dei paesi non EU l'apicoltura biologica è solo all'inizio, ad eccezione della Repubblica di Macedonia, con 15.000 colonie certificate, che rappresentano il 15% del totale delle colonie di api allevate. Il Brasile è il più grande produttore non europeo di miele biologico. Una parte importante della sua produzione totale annuale che è di 40.000 tonnellate, è biologica e ci sono diverse società che si occupano di commercializzare esclusivamente miele biologico. L'Argentina è il secondo produttore al mondo di miele biologico. Secondo un recente rapporto alla fine del 2008 vi erano 51.970 alveari certificati biologici con una produzione totale di miele di 1.279 tonnellate. Anche il Messico ha un significativo potenziale per la produzione di miele biologico e produce attualmente circa 1.150 tonnellate.

### 1.3.2.3. Italia

In Italia in base ai dati del SINAB 2012 come si può vedere dalla tabella 6 si hanno più di 100.000 arnie, ovvero circa l'8 % di tutti gli alveari sono certificati biologici. Questo numero da anni si aggira intorno a questa quantità, facendo così raggiungere al nostro paese la maggior percentuale in Europa. Si stimano che si hanno circa 11 alveari per apicoltore. Inoltre sul territorio nazionale si hanno 13 organismi di certificazione. È stato stimato un consumo di miele biologico: 3.6 % del totale e misurato un residuo di acaricidi nella cera < 0,2 o 0,1 mg/kg per ogni principio attivo.

Tabella 6. SINAB 2012 Produzioni biologiche in cifre della zootecnia

Animali Numero di capi	2010	2009	2008	2007
Api (in numero di arnie)	113.932	103.216	102.280	112.812

## 1.4. Principali malattie delle api

Come tutti gli esseri viventi, anche le api soffrono di malattie ed ogni apicoltore dovrebbe conoscerne i sintomi ed i possibili rimedi. Conoscere i sintomi delle malattie consente all'apicoltore di intervenire in tempo per evitare la morte di una famiglia di api ed evitare il contagio.

Sono molteplici i fattori rappresentati da animali o malattie che sono da considerarsi come un pericolo per l'incolumità e il benessere di ciò che sta alla base del lavoro dell'apicoltore. L'allevamento delle api, come gli altri tipi di allevamento deve farsi carico in qualche misura della protezione e cura degli animali. L'alveare va considerato come un unico "essere vivente" infatti, sulla distinzione delle patologie in funzione dello stadio di sviluppo dell'ape non si deve credere che una patologia che affligge la covata non si ripercuota sull'intero "sistema famiglia"; così come una malattia che colpisce le api adulte non abbia le sue ripercussioni sulla covata. Ogni famiglia deve essere considerata come un unico "sistema". E' molto importante valutare la forza e l'equilibrio di una famiglia perché costituisce una difesa contro le patologie.

Le malattie delle api hanno sempre attratto l'attenzione di numerosi ricercatori i quali sono giunti oggi, valendosi di moderni strumenti d'indagine, a chiarire molte questioni e a sciogliere molti interrogativi, mettendo nello stesso tempo in evidenza tutta la complessità del problema e la molteplicità dei suoi lati. Come per tutti gli allevamenti animali, anche per l'allevamento delle api le patologie costituiscono un vero danno per l'azienda incidendo negativamente sull'economia del singolo apicoltore, ostacolandone lo sviluppo in intensità ed estensione. Quindi, al danno dovuto alla perdita degli apiari, si aggiunge quello dovuto alla minore produzione delle famiglie ammalate, alle spese per le cure e al conseguente maggior costo di produzione del miele e di tutti gli altri prodotti.

Sono molteplici i criteri adottati per classificare le malattie delle api. In particolare:

- Malattia infettiva (virus, batteri)
- Malattia parassitaria (funghi, protozoi, metazoi)
- Malattia non parassitaria: quando causata da problemi fisiologici correlati ad esempio all'ambiente circostante (alimentazione, clima, umidità)

Gran parte delle patologie che possono colpire l'alveare riguarda il campo delle malattie infettive e parassitarie. Queste malattie sono causate da un patogeno (virus, batteri, funghi e parassiti), definito agente eziologico, che ha la capacità di provocare una serie di danni all'economia strutturale e funzionale dell'ape (Tabella 7).

Tabella 7. Classificazione delle principali malattie delle api in funzione della natura dell'agente eziologico

Malattia	Agente eziologico	Natura
<b>Varroatosi</b>	<i>Varroa destructor</i>	Parassitaria
<b>Acariosi</b>	<i>Acarapis woodi</i>	Parassitaria
<b>Tropilaelapsosi</b>	<i>Tropilaelaps spp.</i>	Parassitaria
<b>Amebiasi</b>	<i>Malpighamoeba mellificae</i>	Protozoaria
<b>Senotainiosi</b>	<i>Senotainia tricuspis</i>	Parassitaria
<b>Aethinosi</b>	<i>Aethina tumida</i>	Parassitaria
<b>Peste americana</b>	<i>Paenibacillus larvae</i>	Batterica
<b>Peste europea</b>	<i>Melissococcus pluton</i>	Batterica
<b>Nosemiasi</b>	<i>Nosema ceranae</i>	Fungina
<b>Covata calcificata</b>	<i>Ascospheera apis</i>	Fungina
<b>Covata pietrificata</b>	<i>Aspergillus flavus</i>	Fungina
<b>Virus della covata a sacco (Sacbrood Virus - SBV)</b>	virus Picorna-like	Virale
<b>Virus della paralisi cronica (Chronic Bee Paralysis Virus - CBPV)</b>	non classificato	Virale
<b>Virus della paralisi acuta (Acute Bee Paralysis Virus - ABPV)</b>	virus Picorna-like	Virale
<b>Virus delle ali deformi (Deformed Wing Virus - DWV)</b>	virus Picorna-like	Virale
<b>Virus della cella reale nera (Black Queen Cell Virus - BQCV)</b>	virus Picorna-like	Virale

Dati dal quaderno di zooprofilassi

Un altro criterio si fonda sulla distinzione tra le patologie dell'ape adulta (ape operaia, regina e fuco) e quelle della covata (uova, larva e pupa) (Tabella 8).

Tabella 8. Classificazione delle principali malattie delle api in funzione delle categorie colpite.

Malattie della covata	Malattie delle api adulte	Malattie sia della covata che delle api adulte
<b>Aethinosi</b>	Acariosi	Covata pietrificata
<b>Covata a sacco</b>	Nosemiasi	Varroatosi
<b>Covata calcificata</b>	Senotainiosi	Virosi ( ABPV, CBPV, DWV)
<b>Peste americana</b>		
<b>Peste europea</b>		
<b>Tropilaelaps</b>		
<b>Virus della cella reale nera</b>		

Le modalità con cui la malattia si trasmette influenza tutte le procedure che vengono attuate al fine di gestire la patologia in corso, le misure di terapia, profilassi e i relativi interventi sanitari. Sono principalmente due le modalità con cui una malattia si può trasmettere all'interno di un apiario:

- Tramite le api (ad esempio, in caso di saccheggio, le api possono gravemente infestarsi di varroa o ammalarsi di peste americana).
- Tramite l'apicoltore o tramite le attrezzature e il materiale apistico contaminato (ad esempio, in caso di recupero di sciami; di spostamento di telaini di covata da famiglie malate a famiglie sane; oppure di alimentazione degli alveari con miele infetto).

Le api, in quanto animali, hanno, come tutti gli altri, dei nemici naturali che sono rappresentati quasi esclusivamente da uccelli insettivori (falco pecchiaiolo, picchio, rondini, rondoni, balestrucci, topini, cince di ogni tipo, merli, gruccioni, etc.) e da altri insetti (vespe, calabroni, tarme, coleotteri e ditteri). Tra i mammiferi possiamo annotare come pericolosi per le api in primo luogo l'uomo, che nonostante pur cercando di salvaguardare le api, con la formazione di apiari costituiti da numerose arnie dislocate a distanza ravvicinata, col commercio, con le comuni pratiche apistiche e con il diffondersi del nomadismo spesso è causa della trasmissione e della diffusione di pericolose malattie infettive. Un altro mammifero nemico ancestrale è l'orso, altri di dimensioni più modeste come tasso, volpe, puzzola, martore, riccio, topo ragno, ghio, topo campagnolo, possono attaccare le api per cibarsi del miele o per cercare rifugio nell'arnia.

### 1.4.1. Malattie parassitarie

#### 1.4.1.1. Aethinosi

Agente eziologico: *Aethina tumida* (coleottero degli alveari), malattia denunciabile (D.P.R. 320/1954) (Figura 18).



Figura 18. *Aethina tumida*

Epidemiologia: attualmente non è presente nel territorio dell'UE (Charrière J.D. *et al.* 2011). Massima incidenza in primavera. Si trasmette per contatto diretto attraverso



favi/api, candito, materiale apistico o altra materia organica (terra/frutta/legname) infestato dalle forme larvali del parassita. Di particolare importanza la prevenzione e i controlli di materiale apistico importato da Paesi Terzi.

Manifestazioni cliniche: le larve scavano gallerie nei favi da nido e da melario, defecano nel miele, dove inducono una sua fermentazione. Sia le larve sia gli adulti possono essere visibili a occhio nudo. Forti infestazioni del parassita provocano il collasso della famiglia.

Terapia: la terapia non è autorizzata data l'assenza della malattia sul territorio nazionale.

Profilassi: buone pratiche apistiche, quali il controllo rigoroso delle fonti di approvvigionamento di regine e sciami, l'eliminazione delle famiglie deboli, la smielatura dei melari subito dopo la loro raccolta (Charrière J.D. *et al.* 2011), la rimozione di favi e altro materiale apistico abbandonato in apiario. Controlli rigorosi sulle attività d'importazione di api regine e api nei paesi dove è presente la parassitosi (Langella V., Formato G. 2010).

#### 1.4.1.2. Acariosi

Agente eziologico: *Acarapis woodi* (acaro delle trachee), malattia denunciabile (D.P.R. 320/1954)(Figura 19).



Figura 19. *Acarapis woodi*

Epidemiologia: attualmente non segnalato in Italia. Massima incidenza da Marzo a Maggio. Si trasmette di ape in ape (Charrière J.D. *et al.* 2011), per contatto diretto mediante la sciamatura, il saccheggio e la deriva.

Manifestazioni cliniche: irrequietezza, tremori, incapacità al volo e debolezza della famiglia (Charrière J.D. *et al.* 2011). Il parassita si localizza a livello delle trachee e nei sacchi aerei.

Terapia: trattamenti con acaricidi con un utilizzo razionale dei presidi farmacologici.

Profilassi: buone pratiche apistiche e controllo rigoroso delle fonti di approvvigionamento di regine e sciami (Langella V., Formato G. 2010).

### 1.4.1.3. Senotainiosi

Agente eziologico: *Senotainia tricuspis* (dittero-miasi apiaria) (Figura 20).



Figura 20. *Senotainia tricuspis*

Epidemiologia: segnalazioni in anni recenti soprattutto in località vicine alla costa (Toscana) e nel sud Italia (Calabria). Massima incidenza in primavera/estate. Si trasmette per contatto diretto: le femmine del dittero inoculano le larve direttamente nel corpo delle api bottinatrici.

Manifestazioni cliniche: alterazioni comportamentali con posizione anomala delle ali (a K); improvvisa e progressiva difficoltà al volo; api striscianti sul terreno davanti all'alveare. Riduzione della durata della vita delle api adulte. Forti infestazioni possono provocare il collasso della famiglia.

Terapia: a oggi non esistono presidi terapeutici. È però possibile controllare l'infestazione mediante copertura del terreno sotto e davanti gli alveari con film plastici, oppure utilizzando trappole cromotropiche vischiose.

Profilassi: buone pratiche apistiche: film plastici sotto e davanti gli alveari; trappole cromotropiche vischiose (Langella V., Formato G. 2010).

### 1.4.1.4. Tropilaelapsosi

Agente eziologico: *Tropilaelaps clareae*, *Tropilaelaps koenigerum* (acaro), malattia denunciabile (D.P.R. 320/1954) (Figura 21)



Figura 21. *Tropilaelaps clareae*

Epidemiologia: attualmente non segnalata nel territorio dell'UE (Charrière J.D. *et al.* 2011). Si trasmette per contatto diretto mediante la sciamatura, il saccheggio, la deriva e il materiale apistico contaminato (Charrière J.D. *et al.* 2011). Particolarmente a rischio l'importazione di api da Paesi Terzi.

Manifestazioni cliniche: ali deformate e atrofizzate; zampe deformi. Covata a mosaico con alterato sviluppo e progressiva riduzione della famiglia fino alla morte. La parassitosi determina una maggiore propensione alla sciamatura (che a sua volta favorisce la diffusione dell'acaro).

Terapia: la terapia non è autorizzata data l'assenza della malattia sul territorio nazionale.

Profilassi: buone pratiche apistiche, controllo rigoroso delle fonti di approvvigionamento di regine e sciami. Controlli rigorosi sulle attività di importazione di api regine e api dai paesi dove è presente la parassitosi. (Langella V., Formato G. 2010)

#### 1.4.1.5. Varroasi

Agente eziologico: *Varroa destructor* (acaro) (Figura 22).



Figura 22. *Varroa destructor*

Epidemiologia: malattia endemica, presente su tutto il territorio nazionale. Massima incidenza nei mesi di settembre-ottobre, con morie autunno-invernali. Si trasmette tramite deriva delle api operaie e dei fuchi infettati, saccheggio delle colonie fortemente colpite da varroa, sciami, scambio di favi da nido opercolati tra colonie (Charrière J.D. *et al.* 2011).

Manifestazioni cliniche: ali deformate, addome più corto, irrequietezza e aggressività. La malattia può progredire con progressiva riduzione della forza della famiglia e la sua totale estinzione. In caso d'inadeguati trattamenti antivarroa, è tipica la moria d'interi apiari. Possibile associazione con altre malattie: virosi (DWV, ABPV, CBPV) e covata calcificata (*Ascospaera apis*).

Terapia: utilizzo razionale dei presidi farmacologici (trattamenti acaricidi), rotazione dei principi attivi. Possibili fenomeni di acaro-resistenza e residui nei prodotti dell'alveare.

Profilassi: adozione delle buone pratiche apistiche (es. lotta integrata con ingabbiamento della regina, distruzione della covata maschile) (Langella V., Formato G. 2010).

## 1.4.2. Malattie protozoarie

### 1.4.2.1. Amebiasi

Agente eziologico: *Malpighamoeba mellificae* (protozoo).

Epidemiologia: diffusione non nota, massima incidenza da marzo a maggio. Si trasmette tramite la sciamatura, il saccheggio, la deriva ed i favi e materiale apistico contaminato.

Manifestazioni cliniche: diarrea, forti infestazioni possono provocare il collasso della famiglia. Spesso associata a Nosemiasi.

Terapia: attualmente non esistono antibiotici autorizzati.

Profilassi: buone pratiche apistiche, disinfezione del materiale apistico (Langella V., Formato G. 2010).

## 1.4.3. Malattie infettive

### 1.4.3.1. Peste americana

Agente eziologico: *Paenibacillus larvae* (batterio sporigeno), malattia denunciabile (D.P.R. 320/1954) (Figura 23).

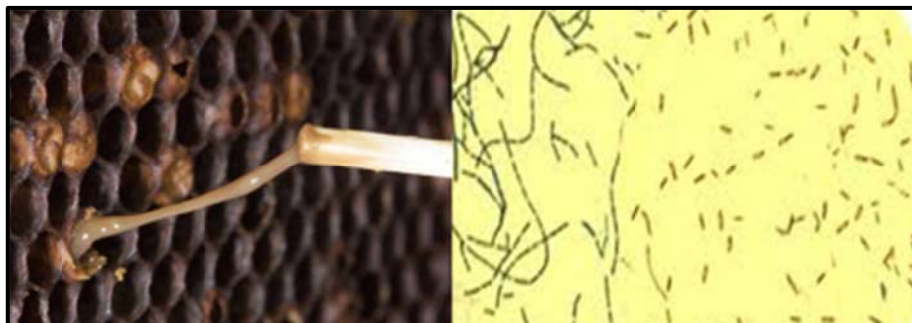


Figura 23. *Paenibacillus larvae*.

Epidemiologia: l'infezione è diffusa in tutto il mondo e quindi presente su tutto il territorio nazionale. Massima incidenza in primavera/estate. Si trasmette da famiglie malate a famiglie sane tramite la sciamatura, il saccheggio, la deriva, il trasferimento di favi ed altro materiale apistico contaminato e la somministrazione di miele infetto come alimentazione (Charrière J.D. *et al.* 2011).

Manifestazioni cliniche: moria delle larve dopo opercolatura delle cellette. Covata irregolare con opercoli depressi e forati; odore caratteristico di colla di falegname. Favi anneriti. Larve opercolate colliquate, di consistenza vischiosa e filanti (prova dello stecchino positiva); formazione di scaglie tenacemente adese alle pareti delle cellette dopo 6-7 settimane dalla morte delle larve. Prognosi solitamente infausta.

Terapia: attualmente non esistono antibiotici autorizzati. La messa a sciame, abbinata alla sostituzione della regina e di tutti i favi può essere curativa, se effettuata su famiglie forti in primavera/inizio estate.

Profilassi: buone pratiche apistiche quali la sostituzione dei 3 telaini più vecchi ad alveare ogni anno; sostituzione ogni 2-3 anni delle regine; visite periodiche degli alveari; apiario con famiglie sane e forti; distruzione delle famiglie e dei favi contaminati; disinfezione del materiale apistico contaminato (Langella V., Formato G. 2010).

#### **1.4.3.2. Peste europea**

Agente eziologico: *Melissococcus plutonius*, batterio principale, spesso abbinato a germi secondari quali: *Enterococcus faecalis*, *Paenibacillus alvei*, etc. malattia denunciabile (D.P.R. 320/1954)

Epidemiologia: l'infezione è presente su tutto il territorio nazionale. Massima incidenza in primavera/estate. Tende a guarire spontaneamente in caso di andamento stagionale favorevole. Si trasmette tramite sciamatura, saccheggio, deriva, trasferimento di favi e altro materiale apistico contaminato da famiglie malate a famiglie sane (Charrière J.D. et al. 2011).

Manifestazioni cliniche: covata irregolare, posizione irregolare della larva nelle cellette non opercolate; larve di colore giallastro/brunastro di consistenza flaccida; formazione di scaglie dopo 6-7 settimane facilmente asportabili dalla celletta. Odore aspro, acido, putrido, anche in funzione dei batteri presenti nelle larve infette.

Terapia: attualmente non esistono antibiotici autorizzati.

Profilassi: buone pratiche apistiche quali la sostituzione dei 3 telaini più vecchi ad alveare ogni anno; sostituzione ogni 2-3 anni delle regine; visite periodiche degli alveari; apiari con famiglie sane e forti; distruzione delle famiglie e dei favi contaminati; disinfezione del materiale apistico contaminato (Langella V., Formato G. 2010).

#### **1.4.3.3. Virosi**

Agente eziologico: attualmente sono stati individuati 18 virus delle api, la maggior parte dei quali sono Picornavirus-like appartenenti alla Fam. Dicistroviridae, Picornavirus-like/Flavivirus.

Epidemiologia: le virosi apiarie sono segnalate su tutto il territorio nazionale, con presenza soprattutto di: ABPV, CBPV, SBV, DWV e BQCV. Manifestazioni cliniche: negli adulti difficoltà di movimento e del volo, paralisi. Le virosi sono strettamente associate ad altre malattie, quali varroasi e nosemias. Le infezioni virali possono comportare lo spopolamento della colonia fino alla morte della famiglia.

Terapia: attualmente non sono disponibili presidi sanitari.

Profilassi: buone pratiche apistiche in generale (ad esempio, appropriata ubicazione dell'apiario, sostituzione delle api regine ogni 2-3 anni, etc.), ma soprattutto una buona lotta alla varroa (Langella V., Formato G. 2010).

## 1.4.4. Malattie fungine

### 1.4.4.1. Covata calcificata (ascosferosi)

Agente eziologico: *Ascosphaera apis* (fungo) (Figura 24).



Figura 24. *Ascosphaera apis*

Epidemiologia: malattia presente su tutto il territorio nazionale. Massima incidenza in primavera/estate. Si trasmette per via alimentare deriva delle api, saccheggio, scambio di api e fuchi contenenti spore, alimentazione con polline e miele contenenti spore (Charrière J.D. *et al.* 2011). La larva si infetta a 3-4 gg di età.

Manifestazioni cliniche: malattia della covata che si manifesta con una mummificazione e/o calcificazione delle larve. Può anche non presentare sintomi particolari se l'infezione è inferiore al 12%.

Terapia: attualmente non sono disponibili presidi sanitari.

Profilassi: posizionare l'apiario in maniera adeguata. Non sottoporre la famiglia a stress alimentari. Allevare famiglie forti (Charrière J.D. *et al.* 2011 e Langella V., Formato G. 2010).

### 1.4.4.2. Covata pietrificata (aspergillosi)

Agente eziologico: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* (funghi).

Epidemiologia: malattia presente su tutto il territorio nazionale. Potenziale rischio zoonosico. Massima incidenza da aprile ad agosto. Si trasmette tramite per via aerea.

Manifestazioni cliniche: negli adulti si osservano alterazioni comportamentali con agitazione, debolezza, paralisi e alterazioni morfologiche con addome dilatato e successiva mummificazione mentre nella covata, mummificazione di larve e pupe; massa indurita ricoperta di micelio di colore verde-giallastro (*A. flavus*) o verde-grigiastro (*A. fumigatus*).

Terapia: attualmente non sono disponibili presidi sanitari.

Profilassi: disinfezione del materiale apistico (Langella V., Formato G. 2010).



### 1.4.4.3. Nosemiasi

Agente eziologico: *Nosema apis*, *Nosema ceranae* (fungo unicellulare, microsporidio), malattia denunciabile (D.P.R. 320/1954) (Figura 25)

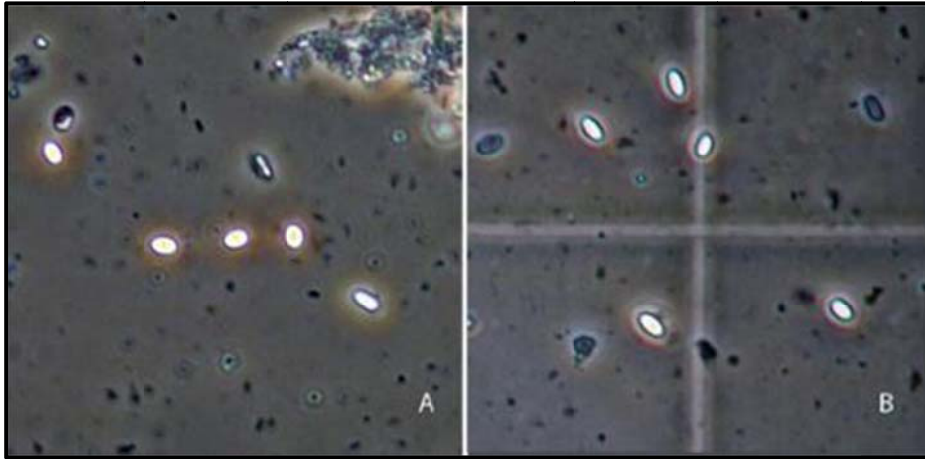


Figura 25. *Nosema apis* (A) e *Nosema ceranae* (B)

Epidemiologia: L'agente patogeno di questa malattia è il *Nosema spp.* Esistono due specie: *Nosema apis*, che era diffuso in Europa e lo è tuttora in alcune regioni, e *Nosema ceranae*, una nuova specie originaria dell'Asia (Charrière J.D. et al. 2011). Il *Nosema ceranae* sta soppiantando il *Nosema*. Massima incidenza: primavera e autunno per il *Nosema apis* mentre è ancora da definire per il *Nosema ceranae*. Si trasmette per deriva di api, saccheggio, fuchi, abbeveratoi (acqua contaminata da spore), scambio e spostamenti di api malate, utilizzo di strumenti sporchi di escrementi (Charrière J.D. et al. 2011).

Manifestazioni cliniche: alterazioni morfologiche con ventricolo gonfio ed intestino biancastro. Diarrea (*Nosema apis*) e lento spopolamento fino al collasso della colonia (*Nosema ceranae*). Riduzione delle produzioni.

Terapia: attualmente non esistono presidi sanitari autorizzati (Charrière J.D. et al. 2011). Esistono in commercio prodotti fitoterapici in grado di ridurre i livelli d'infezione.

Profilassi: buone pratiche apistiche; evitare di posizionare l'apiario in zone umide; acquisto di api da apicoltori con apiari sani (Langella V., Formato G. 2010).

## 1.4.5. Varroasi o varroatosi

### 1.4.5.1. Generalità

Si tratta di una malattia che colpisce sia la covata che gli adulti; causata da un acaro *Varroa destructor* Anderson & Trueman, specie appartenente alla famiglia delle Varroidae (Figura 26).



Figura 26. *Varroa destructor*

Alla famiglia appartengono i generi *Euvarroa* (Delfinado & Baker, 1974) e *Varroa* (Oudemans, 1904) entrambi evoluti in oriente. Al primo genere appartengono due specie che affliggono api nane e fino ad ora sono rimaste confinate nei territori di origine anche se si possono riprodurre su *Apis mellifera*. Al genere *Varroa* appartengono invece quattro specie, tutte associate a *Apis cerana* Fabr.:

- *Varroa jacobsoni* Oudemans
- *Varroa underwoodi* Delfinado & Aggrwaal
- *Varroa rindereri* de Guzman & Delfinado
- *Varroa destructor* Anderson & Trueman

Quest'ultima è stata distinta solo recentemente da *V. jacobsoni*, sulla base di studi sia morfologici che genetici.

Anderson & Trueman (2000) hanno verificato che si tratta di una specie complessa, suddivisa in 5 o 6 sottospecie, solo due delle quali sono state descritte, mentre delle altre ancora si sa poco. *Varroa jacobsoni* fu scoperta da Oudemans nel 1904 nell'isola di Giava ed è diffusa esclusivamente in Indonesia, su *Apis cerana* e su altre "api delle rocce" e non è in grado di riprodursi su *Apis mellifera* ed ha scarsa importanza economica.

Anche *Varroa destructor* in origine era parassita di *Apis cerana*, alla quale non arreca particolari danni, in quanto si riproduce prevalentemente a spese della covata maschile, riuscendo così a convivere, anche grazie a particolari comportamenti di pulizia messi in atto dalle operaie.

L'occasione che ha consentito alla specie di passare su *Apis mellifera* è stata offerta negli anni '40, quando api europee furono introdotte in Asia Sud-Orientale per aumentare la produzione di miele. Il primo rinvenimento ufficiale di *Varroa destructor* sull'ape domestica è avvenuto in Cina nel 1958. A partire dagli anni '60 la Varroa ha fatto riscontrare attacchi massicci di *Apis mellifera* ed è stata segnalata in Russia, diffondendosi da Oriente verso Occidente. Probabilmente attraverso il commercio di



regine è stata introdotta in Bulgaria, dove è stata segnalata per la prima volta nel 1967. Successivamente si è diffusa in maniera capillare con segnalazioni ufficiali in quasi tutti i paesi dell'Asia meridionale e sud-orientale (Cina, Filippine, Vietnam, Corea, Giappone, Thailandia, e Formosa), dell'America Latina, del Nord Africa, dell'Europa (Romania, ex Jugoslavia, Germania, Austria, Repubblica Ceca, Slovacchia, Francia, Spagna, Italia, Grecia, ecc.) e successivamente negli stati Uniti (1987) e in Nuova Zelanda. Solo l'Australia sembra per il momento esserne esente. In Italia la presenza del parassita è stata segnalata per la prima volta il 16 giugno 1981 nel Comune di Staranzano (Gorizia), ai confini con la Slovenia, successivamente, come era prevedibile, si è rapidamente diffusa su tutto il territorio nazionale. Attualmente la sua presenza è ubiquitaria, se non si contrasta, la malattia conduce sistematicamente a morte gli alveari, quindi occorre conoscerla al pari, o più, di quelle che sono sempre state presenti sul nostro territorio.

#### 1.4.5.2. Etiologia e ciclo biologico

La *V. destructor* è di dimensioni piuttosto cospicue e le femmine (1,1-1,7x 1,5-1,9 mm) sono facilmente distinguibili a occhio nudo (Figura 27). Sono di color bruno-rossiccio, di forma ellissoidale ed appiattita, hanno quattro paia di zampe e il corpo più largo che lungo. L'acaro possiede un apparato boccale pungente-succhiante e si comporta da ectoparassita per tutta la durata della sua vita, sia a spese della covata (con predilezione di quella maschile) sia a spese degli adulti (fuchi e operaie). *V. destructor* è caratterizzata da un notevole dimorfismo sessuale, i maschi sono bianchi-giallastri, più piccoli delle femmine (0,8 mm) e di forma allungata. Essi muoiono entro pochi giorni dalla nascita, di solito più o meno allo sfarfallamento delle api. I maschi adulti non possono assumere cibo in quanto le loro appendici boccali sono trasformati in organi atti al trasferimento delle spermatofore, contenenti spermatozoi, nelle vie genitali delle femmine. Sono provvisti di un solo testicolo, come pure le femmine hanno un solo ovario. I gameti maschili non si sviluppano completamente nel corpo del maschio e terminano la maturazione in quello della femmina.



Figura 27. *Varroa destructor*

Lo sviluppo della varroa passa attraverso due stadi, o età, caratterizzati ciascuno da una fase mobile e una fase immobile. Il primo stadio, denominato protoninfa, termina con una fase immobile (protocrisalide), alla quale segue una muta che libera una prima esuvia. Il secondo stadio, denominato duetoroninfa, termina con una

seconda fase immobile (crisalide) la quale si conclude con la liberazione di una seconda esuvia e la comparsa dell'adulto.

Il ciclo biologico della varroa è sincronizzato con quello delle api. Quando le famiglie sono prive di covata le varroe femmine svernano sul corpo delle operaie, normalmente infossate tra le lamine ventrali dei segmenti dell'addome. Qui possono rimanere anche per sei mesi in attesa che ricompaia la covata nell'alveare. In primavera quando riprende la covata da parte delle api anche la varroa ricomincia il suo ciclo riproduttivo, con una ripresa graduale. La riproduzione avviene esclusivamente dentro la covata opercolata. Le varroe possono compiere fino a 7 cicli riproduttivi, però tuttavia la maggior parte depone solo una volta e la percentuale di quelle che depongono più volte è molto bassa. Le femmine adulte penetrano all'interno delle celle contenenti larve prossime all'opercolazione (6-9 gg femminili, 7-10 gg maschili). Qui attende l'opercolatura, e inizia a nutrirsi dell'emolinfa della larva dell'ape in via di sviluppo per deporre le uova. Due giorni e mezzo dopo l'opercolazione ( $62 \pm 2$  ore), la varroa è in grado di deporre un uovo maschile e da tre a cinque uova femminili a seconda della durata dell'opercolazione della cella (maschio o femmina), dei fattori genetici (specie e razza) che della temperatura. Di norma, dal primo uovo deposto ha origine un maschio (Rehm & Ritter, 1989), dal secondo uovo ha origine una femmina (Martin, 1994), i quali raggiungono la maturità quasi contemporaneamente, circa 9 giorni dopo l'opercolatura. Dalle altre uova deposte nascono tutte femmine. Una volta giunte a maturazione sessuale il fratello si accoppia con le sorelle (2-3 nelle celle delle operaie, 3-4 nelle celle dei fuchi); dopo l'accoppiamento il maschio muore e le varroe già fecondate si attaccano all'ape nascita o sono pronte per uscire per andare alla ricerca di un'altra cella per riprodursi.

### 1.4.5.3. Dinamica della popolazione di varroa

Ipotizzando che un ciclo riproduttivo completo si compia mediamente in 17 giorni (5 gg su api adulte e 12 in covata femminile o 3 gg su adulti e 14 in covata maschile), durante la stagione riproduttiva (circa 7 mesi) la varroa può arrivare a compiere 12 cicli. È stato calcolato che gli acari che si sviluppano in celle di operaia hanno coefficiente di moltiplicazione pari a 1,3 e quelle in celle di fuco 2,6. In assenza di fattori limitanti la varroa si moltiplicherebbe come riportato in tabella 9 (Contessi, 2004).

**Tabella 9. Schema teorico di calcolo di sviluppo dell'acaro.**

Dopo giorni	17	34	51	68	85	102	119	136	153	170	187	204
N° varroe covata ♀	1,3	1,7	2,2	2,8	3,7	4,8	6,3	8,1	10,6	13,7	17,9	23,3
N° varroe covata ♂	2,6	6,7	17,6	45,7	119	309	803	2.088	5.429	14.116	36.703	95.428

Lo schema è teorico, anche perché bisogna tener conto di numerosi fattori che limitano lo sviluppo dell'acaro quali, la mortalità naturale delle varroe, il numero di uova varia a seconda della stagione, sterilità delle varroe (Infantidis, 1987), disponibilità di polline della colonia, caratteristiche feromonalie dell'ospite, razza dell'ape, la durata del periodo di opercolazione (Harbo, 1990. Buchler & Drescher,

1994), umidità, profondità della cella (Calderone, 2000), periodo dell'anno (Martin *et al.* 2001), temperatura.

#### **1.4.5.4. Effetti della parassitazione sulle api**

Le api parassitate hanno livelli più bassi di concentrazione di proteine nella testa e nell'addome, dell'ordine del 20% e una più basso concentrazione di carboidrati nell'addome. Molte delle api nascenti (8.5%) mostrano deformazioni. Presentano nell'emolinfa un numero doppio di batteri rispetto alle api non parassitate. Può avere riflessi negativi sul sistema immunitario dell'ape con il risultato di aumentare la suscettibilità a svariati patogeni.

La varroa porta a quella che è stata definita "sindrome da acari" che nelle api adulte conduce a riduzione della popolazione, api con difficoltà di volo che strisciano, sostituzione della regina, presenza di acari tracheali e api che lasciano in massa l'alveare in autunno-inverno; nella covata invece si riscontra covata irregolare, pupe morte con la ligula estroflessa.

Inoltre è causa d'infezioni secondarie e malattie associate, come batteri (Glinski & Jarosz, 1992), funghi e soprattutto virus. La principale causa di collasso e di mortalità delle famiglie infestate da varroa è da ricercarsi nelle infezioni virali (Bowen *et al.*, 2002). Il virus trasmesso più dannoso, pare che sia quello delle ali deformi (DWV). Altro virus a presente che normalmente è inoffensivo ma se trasmesso alla covata provoca danni è il virus della paralisi acuta (APV) che associato a DWV sono secondo alcuni autori tra le maggiori cause della morte durante l'inverno delle api.

Nelle famiglie fortemente parassitate è possibile apprezzare già ad occhio nudo le varroe femmine sul corpo delle api adulte; è inoltre possibile notare la covata sparsa (indice di elevata mortalità), un odore tipico di covata morta, api piccole, con ali deformi, raggruppamenti di api piccole ed incapaci di volare sul predellino, un indebolimento della famiglia, fenomeni di sciamatura, orfanità e di sostituzione di regina. La durata media della vita delle api molto parassitate diminuisce sempre di un valore che va dal 25% al 50%.

È bene sottolineare che l'azione della varroa consiste non solo nel suggerire l'emolinfa dell'ape adulta o della larva (azione sottrattiva), ma anche nel colpire direttamente determinati apparati dell'ape in fase di sviluppo (azione meccanico-traumatica) e nell'esporre le api ad altri patogeni quali i virus in primis, ma anche funghi e batteri. Questo acaro, infatti, può essere vettore di agenti patogeni con diversa natura eziologica: virus soprattutto, ma anche funghi e batteri.

#### **1.4.5.5. Contagio**

Gli acari si trasferiscono da apiario ad apiario e da un alveare all'altro tramite derive, saccheggi, trasferimento di fuchi, movimentazione di alveari, raccolta sciame, ecc. anche le operazioni apistiche come il trasferimento di favi di covata parassitata da una famiglia ad un'altra, oppure mediante la pratica del nomadismo (in caso di alveari molto malati oppure quando viene trascurata la lotta alla varroa negli alveari spostati) contribuiscono al trasferimento degli acari da una famiglia all'altra. In assenza di api le varroe muoiono nel giro di poco tempo. Una volta trattato con

prodotti acaricidi la reinfestazione è inevitabile e più rapida soprattutto in autunno-inverno a causa dei saccheggi rispetto al periodo primaverile.

#### 1.4.5.6. Valutazione del livello di infestazione

È molto importante valutare il grado di infestazione, perché da questo, in base al periodo dell'anno, può dipendere il futuro della colonia. Esistono diversi metodi per valutare il grado di infestazione. Si può valutare la caduta naturale della varroa, contando sul cassetto le varroe presenti: si calcola che moltiplicando per 100 la media degli acari caduti giornalmente fornisca una stima attendibile per un numero di varroe presenti nell'alveare. Se in primavera-estate si raggiunge una media di caduta superiore a 5 acari al giorno il livello di infestazione è già pericoloso. Più avanti nella stagione al raggiungimento di 10 varroe cadute al giorno si dovrà intervenire (Figura 28).



Figura 28. Varroa caduta per morte naturale sui cassetto dei fondi antivarroa.

Un altro metodo è quello di disopercolare una decina di celle da fuco e se ne trovano più di tre infestate da varroa, il livello di infestazione inizia a essere preoccupante (Figura 29).



Figura 29. Varroa su pupa di ape

Un altro metodo consiste nella conta degli acari presenti sulle api adulte. Consiste nel porre un campione di api all'interno di un contenitore, si aggiunge acqua e

detergente, si scuote il tutto per qualche minuto e poi si filtra in un apposito vaglio che fa passare le varroe e trattiene le api. L'unico difetto di questo metodo è che ogni volta si devono uccidere una certa quantità di api (Figura 30).



Figura 30. Conta in laboratorio degli acari su api adulte

Ultimamente si sta diffondendo un nuovo metodo con il medesimo principio, che è il metodo tedesco dello zucchero a velo (IASMA Notizie 2012). Il procedimento è lo stesso, solo che le api una volta nel barattolo vengono agitate con lo zucchero a velo, che fa separare le varroe dagli insetti e questi non vengono così uccisi ma rimessi nell'arnia. La soglia di questo metodo è stata stimata come è riportato in Tabella 10.

Tabella 10. Stime per la soglia di infestazione di varroa su api adulte

SITUAZIONE COLONIA	Luglio	Agosto	Settembre
Colonia non in pericolo	< 5 acari	< 10 acari	< 15 acari
Trattamento necessario presto	5-25	10-25	15-25
Soglia superata, trattamento immediato		> 25 acari	

#### 1.4.5.7. Trattamenti terapeutici e lotta

Con mezzi chimici

I problemi dell'uso di prodotti chimici sono l'insorgere della resistenza al principio attivo (Della Vedova, 2000) e la residualità di questo nei prodotti delle api. Un buon trattamento chimico deve avere un'efficacia del 90% fin dalla prima somministrazione, non deve essere tossico per la famiglia né su breve né sul lungo periodo, non deve essere pericoloso né per l'apicoltore né per i consumatori. Deve essere di facile impiego e con un costo adeguato. Tutti i trattamenti chimici vanno impiegati in assenza di melario. I prodotti registrati in Italia a base di principi attivi di sintesi per la lotta alla varroa sono: Apistan® (Fluvalinate) e API-Var® (Amitraz), Perizin (Coumaphos), Apitol (Cimiazolo cloridrato). I prodotti registrati in Italia a base di principi attivi di origine naturale invece sono: Apilife-VAR® (timolo, mentolo, eucaliptolo), Apiguard® (timolo). Si utilizzano anche sostanze naturali come acido lattico, acido formico e soprattutto acido ossalico, (Api-bioxal® prodotto registrato nel 2011) che abbinato ad altre tecniche di lotta meccanica come il blocco di covata ha un ottimo risultato e inoltre è consentito anche nell'allevamento biologico.



## 1.4.6. Nosemiasi

Higes Mariano, Martín-Hernández Raquel, Meana Aranzazu (2010). *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie*

### 1.4.6.1. Introduzione

La scoperta del *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in *Apis mellifera* Linnaeus è avvenuta in Europa e in Asia nel 2005 (Higes *et al.*, 2005, 2006; Huang *et al.*, 2007). Caratterizzato in origine in *Apis cerana* (Fries *et al.*, 1996), la diffusione di *N. cerana* da *A. cerana* ad *A. mellifera* probabilmente è avvenuta nell'ultimo decennio (Klee *et al.*, 2007), benché debba essere ancora confermato (Fries, 2009). Ad oggi, due specie di microsporidi infettano le api di tutto il mondo: *Nosema apis* Zander e *Nosema ceranae*. È stato mostrato che *Nosema apis* infetta *A. mellifera* da più di cento anni ed è stato il primo microsporidio ad essere descritto. Effettivamente, la malattia causata da questo microsporidio nelle api è stata riconosciuta prima che l'agente eziologico fosse scoperto. I corpuscoli brillanti e ovali presenti nel tratto digestivo indicano l'origine fungina della malattia (Donhov, 1857; Higgins, 1858; dati da Neveu-Lemaire, 1938). In Germania, i corpuscoli sono stati definitivamente attribuiti alla causa della malattia e sono stati classificati come *N. apis* da Zander nel 1909. Sono stati prodotti diversi studi riguardanti la biologia e l'epidemiologia della noseemiasi (Fantham and Porter, 1912; Maassen, 1912, 1914; e Trappmann, 1920; Neveu-Lemaire, 1938) e ci sono molti altri lavori relativi alla noseemiasi causati da *N. apis*, sebbene sia stata rilevata a livello molecolare solo di recente (Webster *et al.*, 2004). Gli studi su *N. ceranae* si sono limitati alla scoperta del parassita in *A. cerana* (Fries *et al.*, 1996). Fino al 2005 si dava per scontato che quando si riscontravano spore del microsporidio nelle api queste appartenevano sempre a *N. apis*. Tuttavia, nel 2005, è stata ottenuta la sequenza isolata da un microsporidio in uno studio riguardante le malattie di *A. mellifera* lavorando sull'infezione di *N. apis* (Huang *et al.*, 2007). Nello stesso anno ma in un continente differente, *N. ceranae* è stato isolato in api europee mentre si tentava di standardizzare il rilevamento molecolare di *N. apis* da campioni raccolti da famiglie che avevano avuto una diminuzione o nessuna produzione di miele (Martín-Hernández *et al.*, 2005; Higes *et al.*, 2006). Tradizionalmente il termine "nosemiasi" veniva usato per indicare l'infezione delle cellule ventricolari delle api adulte da *N. apis*, l'agente eziologico (OIE, 2004). Questa malattia è stata caratterizzata a partire da forme acute di api operaie con tremore, di api con addome dilatato, di arnie che presentavano residui fecali bruni nei favi e di fronte all'entrata dell'arnia, di api malate o morte presenti nelle vicinanze dall'alveare, di arnie con una diminuzione della covata e della popolazione soprattutto in primavera (Bailey, 1955; Cornejo and Rosi, 1975; Faucon, 2005; OIE, 2008). Comunque l'emergenza della malattia causata da *N. ceranae* adesso è nota in tutti e cinque i continenti (Martín-Hernández *et al.*, 2007; Klee *et al.*, 2007; Giersch *et al.*, 2009; Higes *et al.*, 2009) e presenta differenti modelli epidemiologici, sintomatologie e patologie. Infatti, è considerata al momento uno dei maggiori problemi di salute per quanto riguarda sia le singole api (Paxton *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2009a; Antúnez *et al.*, 2009) che tutta la colonia (Higes *et al.*, 2008a, 2009b). Prima dell'identificazione del *N.*

*ceranae* nelle api, è stata osservata, con differenti sintomi, una “nosemiasi secca” derivante da forme acute per *N. apis* (Faucon, 2005). I differenti sintomi presentati dalle specie di *Nosema* nelle api evidenziano la necessità di differenziare i due distinti modelli clinici: nosemiasi tipo A causata da *N. apis* e nosemiasi tipo C causata da *N. ceranae* come stabilito recentemente nel meeting internazionale (COLOSS, 2009). La maggior parte degli studi riguardanti *N. ceranae* in Europa sono stati esposti al meeting EU COST (FA0803) riguardante le ricerche dei vari gruppi europei, che ha avuto inizio con la riunione nel marzo 2007 a Wageningen. Questo gruppo adesso è conosciuto come COLOSS (Prevention of Honey Bee Colony Losses; [www.coloss.org](http://www.coloss.org), organizzato dal Dr. Neumann) che comprende più di 150 membri di 40 differenti paesi, inclusi paesi non della Comunità Europea con lo scopo di trarre le conclusioni da tutti i lavori svolti su *N. ceranae*, evidenziando le cause che scatenano la patologia nelle api e i fattori epidemiologici relativi a questa emergente malattia in Europa.

#### 1.4.6.2. Colonizzazione e diffusione del *Nosema ceranae* in Europa

In questi ultimi anni, l’infezione di *N. ceranae* sulle api (*A. mellifera*) si è rilevata in numerosi paesi europei quali Spagna, Francia, Germania, Svizzera, Danimarca, Finlandia, Grecia, Ungheria, Italia, Olanda, Inghilterra, Serbia, Polonia, Slovenia, Bosnia e Erzegovina e Svezia (Higes *et al.*, 2006; Fries *et al.*, 2006; Martín-Hernández *et al.*, 2007; Klee *et al.*, 2007; Chauzat *et al.*, 2007; Topolska and Kasprzak, 2007; Paxton *et al.*, 2007; Tapasztó *et al.*, 2009; Kryeger, 2009; Santrac, 2009) così come in altri continenti (Huang *et al.*, 2007; Cox-Foster *et al.*, 2007; Giersch *et al.*, 2009; Higes *et al.*, 2009a). La data di arrivo esatta del *N. ceranae* in Europa non è stata determinata. La simultanea individuazione del parassita sia in Europa sia in Asia non può essere correlata a un salto di *A. mellifera* ma piuttosto allo sviluppo di nuove tecnologie molecolari specifiche e altamente sensibili per la determinazione della malattia. Le spore di *N. apis* non sono facilmente distinguibili da quelle di *N. ceranae* quindi le tecnologie molecolari hanno giocato un ruolo fondamentale per studiarle (Weiss and Vossbrinck, 1999; Klee *et al.*, 2007). La colonizzazione di *A. mellifera* da *N. ceranae* per prima cosa ha implicato che il parassita raggiungesse nuove aree geografiche. L’analisi retroattiva dei dati e dei campioni suggerisce che *N. ceranae* è stato riscontrato in Europa negli ultimi dieci anni (Higes *et al.*, 2006; Martín-Hernández *et al.*, 2007; Klee *et al.*, 2007; Paxton *et al.*, 2007). Questo non sorprende poiché la dinamica di sviluppo della popolazione in un nuovo habitat normalmente segue l’andamento di una curva sigmoideale (Bush *et al.*, 2001). Attualmente, l’incremento quasi esponenziale nella dimensione della popolazione di *N. ceranae* associato anche alla sua elevata presenza è dovuto alla crescita stabile delle popolazioni in quasi tutti i paesi dove è allevata *A. mellifera*. Una situazione simile si è verificata per l’acaro di *Varroa destructor* (precedentemente *Varroa jacobsoni*: Anderson and Trueman, 2000), la cui diffusione in tutto il mondo è avvenuta dopo il suo primo ritrovamento in Asia nel 1904. Nonostante i campioni storici siano ancora limitati, i dati ottenuti indicano chiaramente che *N. ceranae* in Europa è un patogeno esotico di *A. mellifera*. Comprendendo le origini e lo sviluppo di *N. ceranae* attraverso le colonie di *A. mellifera* e di Imenotteri selvatici avremo bisogno di nuovi marcatori molecolari genetici per determinare la filogenesi del patogeno (Paxton *et al.*, 2007). I geni

dell'RNA del microsporidio sono stati usati per le analisi filogenetiche (Rice, 2001; Keeling and Fast, 2002; Williams *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009b), nonostante ciò esistono alcune variazioni genetiche del gene 16S rRNA correlati al microsporidio (Tay *et al.*, 2005). Quindi dovrebbero essere chiaramente stabilite relazioni epidemiologiche o filogenetiche tra isolati di *N. ceranae*, basate su sequenze ripetute come l'rDNA. L'esistenza di copie multiple di rDNA nel genoma di *Nosema* suggerisce che parte delle variazioni genetiche individuate possono essere rappresentate da diverse copie all'interno della stessa spora (O'Mahony *et al.*, 2007). Questo inoltre indica che sono necessari nuovi marcatori polimorfici per definire gli isolati che serviranno per differenziare genotipi o i ceppi (COLOSS workshop, 2009). La sequenza genomica di *N. ceranae* è basata su dati pirosequenziali ed è stata recentemente pubblicata (Cornman *et al.*, 2009) incluso i modelli iniziali dei geni e la comparazione del genoma con altri funghi derivanti dalla stessa classe. Questo ha mostrato che il genoma di *N. ceranae* è estremamente ridotto e fortemente legato a AT-discriminazione (74% A+T). La sequenza genomica dovrebbe essere interessante per i futuri studi riguardo l'interazione del *Nosema* sulle api, l'identificazione di nuovi marcatori epidemiologici e nuovi obiettivi terapeutici. Secondo le caratteristiche epidemiologiche l'infezione del microsporidio *N. ceranae* presenta modelli differenti rispetto a quelli descritti per il *N. apis* nelle zone temperate dell'Europa. Specificamente, le colonie affette da *N. apis* generalmente mostrano un livello basso d'infezione durante l'estate, con un lieve picco in autunno e hanno un lento incremento dell'infezione in inverno (Bailey, 1955). La principale differenza tra i due agenti è che in *N. ceranae* i campioni possono essere rilevati durante tutto l'anno (raccolti in qualsiasi stagione o mese; Martín-Hernández *et al.*, 2007). La diminuzione delle spore del *Nosema* in base alla stagione è stata individuata analizzando mensilmente la presenza del microsporidio in 5776 campioni di api di tutta la Spagna dal 1999 al 2005 (Martín-Hernández *et al.*, 2007). Di conseguenza, la stagionalità di *N. apis* si è conservata durante gli anni (1999–2002) sebbene sia gradualmente diminuita nel periodo successivo (2003–2005). Questa diminuzione in base alla stagione è connessa all'incremento di morte di colonie riportata dagli apicoltori, anche all'assenza di segni evidenti del *Nosema* nelle famiglie. Riduzioni stagionali simili sono state riscontrate anche in altri studi (Tapasztó *et al.*, 2009). È stato ammesso che *N. ceranae* prevale in climi caldi rispetto a *N. apis* (Fries, 2009). Appare che tra le due specie di microsporidi in condizioni naturali e con colonie allo stesso livello il *N. ceranae* si adatta meglio a completare il suo ciclo biologico a differenti temperature. (Martín-Hernández *et al.*, 2007, 2009a). Ci sono anche differenze nella resistenza delle spore. Per esempio in *N. ceranae* le spore sono più resistenti all'essiccazione e hanno una maggior termotolleranza fino a 60°C per 6 ore (Fenoy *et al.*, 2009) rispetto a *N. apis*, le cui spore dopo 15 minuti a 60°C muoiono (Cantwell and Shimanuki, 1970). Al contrario *N. apis* ha un minor tasso d'infezione dopo il congelamento rispetto a *N. ceranae* (Fries and Forsgren, 2009; Fries, 2009), sebbene la perdita di vitalità nelle spore di *N. ceranae* non è drammatica quando si mantiene uno standard medio (RPMI+10%DMSO), in cui più dell'80% delle spore rimane vitale dopo tre settimane di congelamento (Fenoy *et al.*, 2009). Così sembra che il metodo di conservazione delle spore sia un fattore importante da considerare in tutti i protocolli sperimentali. Nella maggior parte delle api europee analizzate fino a oggi parassitizzate da *Nosema spp.* (Chauzat *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2007; Klee *et al.*, 2007; Tapasztó *et*



al., 2009; Van der Zee, 2008; Granato *et al.*, 2009; Korpela, 2009), l'alto tasso di *N. ceranae* rilevato ha portato a un spostamento apparente del *N. apis*. Tuttavia la riduzione in base alla stagione, l'alta diffusione rilevata nella maggior parte degli studi, la maggior resistenza al disseccamento delle spore, hanno portato a una incrementata possibilità di individuare di *N. ceranae* rispetto al *N. apis*, fatto che poteva dare l'impressione che il *N. apis* fosse stato sostituito. Tale conclusione non è nata dopo un breve periodo di studi, ma bensì dopo più di cinque anni di ricerca in tutta Europa sul *N. ceranae*. Questo è accettabile fino a che l'innalzamento della temperatura della terra e il suo effetto sul ciclo vitale dei parassiti influiranno su di esso. (Brooks and Hoberg, 2007). I cambi climatici possono influire sulla distribuzione, sulla stagionalità e sulla virulenza di una malattia infettiva quale la nosemiasi (De la Rocque *et al.*, 2008), e l'adattamento della specie a un nuovo ambiente aumenta la probabilità di diffusione della malattia e influiscono anche le differenti condizioni ambientali che possono rinforzare l'espandersi della malattia in un nuovo ecosistema. Per questo, sono necessarie molte ricerche per riuscire a stabilire le caratteristiche epidemiologiche della nosemiasi tipo C nei differenti paesi europei.

#### 1.4.6.3. Biologia e trasmissione del *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*

I microsporidi sono un grande e vario gruppo ubiquitario di eucarioti, riscontrabili in un vasto range di ospiti, inclusi praticamente tutti i phyla degli invertebrati (specialmente insetti) e tutte le cinque classi dei vertebrati (Canning and Lom, 1986; Mathis, 2000; Franzen and Muller, 2001; Weiss, 2003). Sono organismi unicellulari intracellulari obbligati, parassiti sporigeni che appartengono al phylum Microspora e ci sono più di 1300 specie formalmente descritte in 160 generi, quasi la metà delle quali ha come ospite un insetto (Wittner and Weiss, 1999; Becnel and Andreadis, 1999; Keeling, 2009). È uno dei gruppi di organismi più sorprendenti per molti aspetti, recentemente riclassificati da protozoi a funghi, all'interno degli Opisthokonta (Adl *et al.*, 2005). In base ai diversi punti di vista di biologia evolutiva e parassitismo, i microsporidi rappresentano un affascinante e importante modello per comprendere la questione della manipolazione della cellula dell'ospite, l'interazione molecolare tra ospite-parassita e l'adattamento a un ambiente extracellulare. (Williams, 2009). L'infezione delle api avviene dopo l'ingestione di spore di microsporidio mature, probabilmente assunte durante l'attività di pulizia o di trofallassi. Le spore entrano nelle api attraverso il canale boccale e germinano nell'intestino mediano, dove avviene l'infezione delle cellule epiteliali dopo la germinazione delle spore (estrusione del tubulo polare e invasione della cellula ospite). Il microsporidio di *Nosema* è diplocariotico ed è in contatto diretto con le cellule citoplasmatiche dell'ospite in tutti gli stadi della parassitazione e completa il suo ciclo vitale in meno di tre giorni. Le spore mature di *N. ceranae* hanno un'elevata resistenza. Esse sono piccole, ovocilindriche e variano da 3,3 a 3,5  $\mu\text{m}$  di lunghezza e da 2,3 a 3  $\mu\text{m}$  di larghezza (Figure 31) (Fries *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2009a).

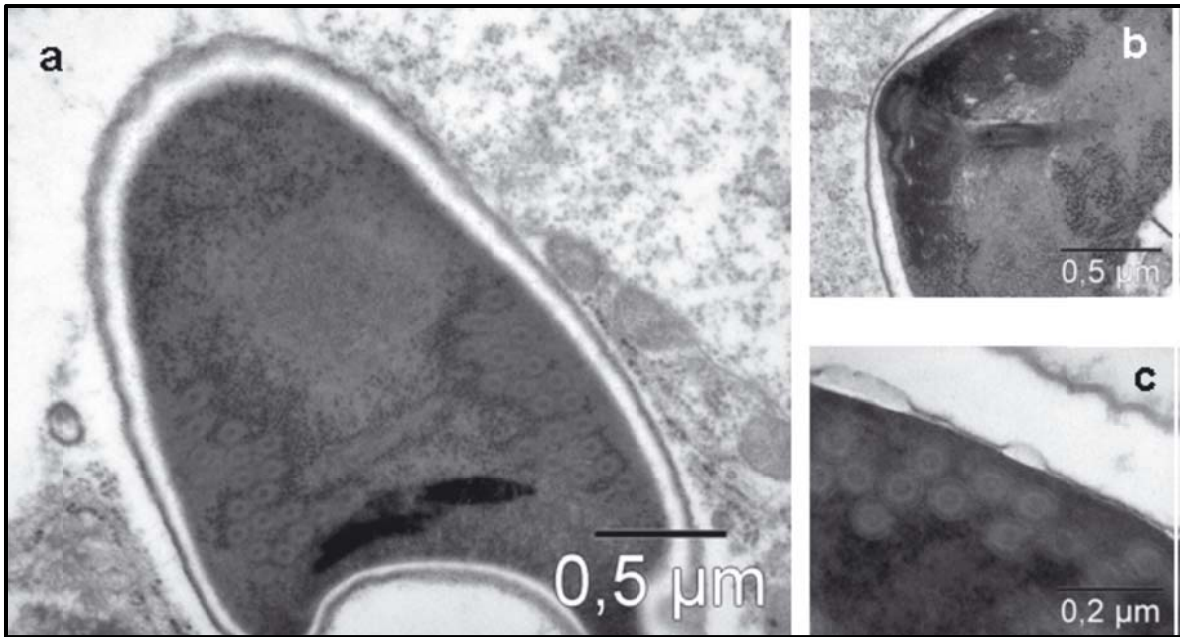
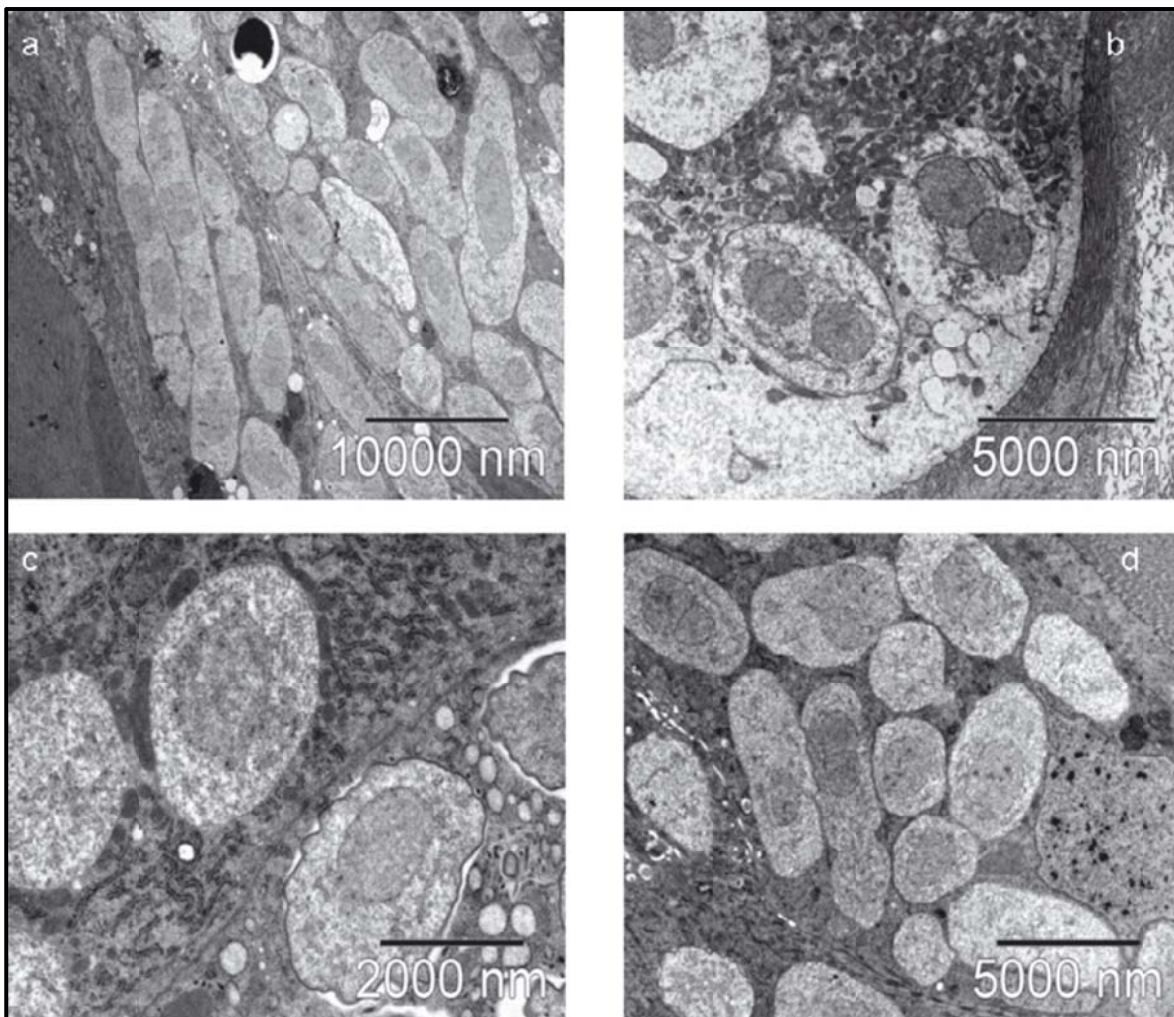


Figure 31. Immagine a trasmissione elettronica di una spora di *Nosema ceranae*. Sezione longitudinale della spora (a). porzione anteriore della spora mentre si ancora con il filamento polare (b) dettaglio del filamento polare (c).

Le spore fresche sono facilmente distinguibili nei contenuti fecali o intestinali delle api perché sono rifrangenti quando sono osservate al microscopio con fase di contrasto. Dalla microscopia elettronica si rivelano tipiche spore binucleate (Fries *et al.*, 1996; Higes *et al.*, 2007) con il rivestimento esterno che presenta una regione fitta di elettroni chiamata ascospora che misura 14-17 nm in *N. ceranae* e una regione interna che è elettro-lucente che è l'endospora (Fries *et al.*, 1996) (Figura 31). La parte finale anteriore è ripiena di dischi uncinati, dove inizia anche il filamento polare. (Figura 31). La membrana lamellare e tubulare del polaroplasto è la parte prevalente del contenuto della spora che nei diplocarioni è circondata dal tubo polare. Questa struttura si trova nella parte posteriore e centrale della spora, con 18-23 ripiegamenti (Fries *et al.*, 1996; Higes *et al.*, 2007, 2008c; Chen *et al.*, 2009a) ed è seguita dalla periferia della spora che racchiude il materiale dello sporoplasma. Nella parte posteriore si trovano i vacuoli, materiale flocculante o composti tubulari ad alta densità che possono apparire come glomeruli. Con appropriate condizioni le spore si attivano nell'intestino delle api ambientandosi e innescando la reversione del tubo polare (l'estrusione del tubo polare è chiamata anche germinazione della spora) che diventa un tubo cavo. La spora diventa pronta o attiva per l'infezione (infettare la cellula ospite) quando si ha un cambiamento di pH, della concentrazione di anioni/cationi all'interno del sistema digestivo o dall'avvicinarsi di un potenziale ospite (recensione di Keohane and Weiss, 1999; Williams, 2009)

La via di segnalazione che porta alla germinazione ancora non è ben chiara, sebbene sia stato indicato che il rapporto calcio/calmodulina alla superficie della spora potrebbe attivare una cascata di segnali che conduce alla sua attivazione (Weidner and Byrd, 1982). Quando l'estroflessione del tubo polare perfora la cellula intestinale dell'ape, lo sporoplasma è iniettato dentro per iniziare la disseminazione. Una volta inoculato inizia il periodo di proliferazione, in cui *N. ceranae* mantiene un contatto diretto tra plasmalemma e citoplasma della cellula ospite in assenza di un involucro

d'interfaccia o di vescicole parassitofore o sporolifere. Una volta iniettato, lo sporoplasma binucleato, attua lo stadio vegetativo di merogonia. Il citoplasma circostante al nucleo, a volte con quattro diplocarioti, (Figure 32), si allunga dentro la struttura nastriforme. Il numero di cicli di proliferazione può variare ed è ancora da stabilire. Le cellule infettate sono allargate e il citoplasma ha più mitocondri e ribosomi liberi. Molti mitocondri si possono vedere vicino o intorno al plasmalemma del parassita, (Figure 32), che probabilmente facilitano l'assorbimento dell'ATP dalle cellule dell'ospite (recensione di Williams, 2009).



**Figure 32. Cellule ventricolari di api infette da *Nosema ceranae* in differenti stadi. Plasmodio merogonale frequentemente osservato con quattro diplocarioti (a) mitocondrio contornato dal plasmalemma (b) sporonti (c) nuclei in posizione apicale in alcune cellule mature e immature nei differenti stadi di *N. ceranae* invaginati nella membrana nucleare**

In questa fase, le cellule epiteliali del nucleo si distribuiscono nella zona apicale e cambiano morfologicamente. Numerose invaginazioni e cellule parassitiche proliferative possono essere osservate vicino alla membrana nucleare della cellula epiteliale (Figure 32). La fase sporigena richiede la formazione, degli sporonti, degli sporoblasti e delle spore. Gli sporoblasti sono cellule derivate dalla divisione finale dello sporonte e essi danno luogo alle spore. Essi formano l'apparato di estrusione



che produrrà il filamento polare, il suo complesso di ancoraggio, le membrane e i tuboli del polaroplasto e il vacuolo posteriore.

Nelle cellule con fase sporogoniale, il contenuto di RER è più alto rispetto alla fase proliferativa ed è intimamente unito al plasmalemma del parassita durante lo sviluppo. L'aumento della densità del citoplasma è il risultato della produzione rapida di RER, del rigonfiamento dei ribosomi e dello sviluppo della struttura interna delle spore. Prima di tre giorni dall'infezione, si possono osservare le spore mature dentro le cellule infettate (Higes *et al.*, 2007). Questo fenomeno di germinazione intracellulare indica che *A. mellifera* è infettata da *N. ceranae* con conseguente trasmissione orizzontale tra le cellule epiteliali come osservato in *N. apis*. Fino ad ora, non sono state osservate spore vuote in *Apis cerana*, che indicano che la germinazione intracellulare non può avvenire (Fries *et al.*, 1996) o che hanno debole capacità di disseminazione nell'ospite. Infatti, le lesioni istopatologiche nelle api asiatiche normalmente coinvolgono una sola cellula infetta piena di parassiti ma sono circondate da cellule epiteliali sane non infette. Le tracce fecali nell'arnia sono normalmente riscontrate nelle colonie affette da *N. apis* e le spore del microsporidio infette sono comunemente diffuse tra le api per ingestione (Bailey, 1954; Cornejo and Rossi, 1975). Tuttavia, le tracce fecali non sono state riscontrate in colonie infettate da *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2008a, 2009b) e quindi, il meccanismo di trasmissione potrebbe essere diverso. Infatti, le api infette possono contaminare gli strumenti dell'apicoltore durante la visita dell'alveare (Malone *et al.*, 2001). La regina è suscettibile alla maggior parte delle malattie che attaccano la sua prole e *N. ceranae* senza eccezione. In condizioni sperimentali, *N. ceranae* può trasmettere infezione orizzontalmente da api operaie infette alla regina tramite l'alimentazione (Higes *et al.*, 2009c). Infatti, la trofallassi può essere una delle più importanti forme di trasmissione da ape ad ape, di colonia in colonia, a causa della deriva.

Comunque i cambiamenti comportamentali delle api in laboratorio possono modificare la modalità di trasmissione visto che le api infette sono meno inclini a condividere la soluzione di saccarosio con le altre api (Naug and Gibbs, 2009).

Il polline stoccato nelle celle è un serbatoio di patogeni per le api (Mehr *et al.*, 1976; Moffet *et al.*, 1978; Gilliam *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 2006), come nel caso dell'infezione da *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2008c).

Le bottinatrici raccolgono il polline dai fiori, lo mettono nelle cestelle del polline situate nelle loro zampe posteriori. Questo polline corbicolare è depositato nelle celle, normalmente accanto o sopra la covata. La presenza di spore infettive di *N. ceranae* nel polline corbicolare può essere dovuto all'autocontaminazione durante il processo di raccolta del polline (rigurgitazione, saliva, etc.), sebbene questo meccanismo sia ancora da definire bene. Inoltre la possibilità di raccogliere polline contaminato direttamente dai fiori non si può del tutto scartare, sebbene questo sia altamente improbabile (Higes *et al.*, 2008c). La conversione da polline corbicolare a polline impastato si presuppone che sia il risultato di una reazione microbica, soprattutto fermentazione dell'acido lattico causata da batteri, lieviti e muffe (Gilliam *et al.*, 1989). L'effetto di questo processo nelle spore vitali di *Nosema* deve essere ancora valutato. Il miele (Giersch *et al.*, 2009) e la pappa reale (Cox-Foster *et al.*, 2007) sono stati riportati come fonte di spore di *N. ceranae* anche se non è ancora chiaro come possano sopravvivere le spore in queste matrici. La presenza di spore di *N. ceranae* nei rigurgitati del Gruccione, (*Merops apiaster*) possono essere potenziali fonti di

disseminazione dell'infezione delle spore di *N. ceranae* per l'Europa (Higes *et al.*, 2008b), soprattutto per gli uccelli che si nutrono di api e bombi (Fry, 1983; Martínez, 1984; Cramp, 1985). Il Gruccione può predare migliaia di bottinatrici (Galeotti and Inglisa, 2001), che è la popolazione che contiene il numero più alto di spore (Higes *et al.*, 2008a). Un Gruccione adulto spende quasi la metà del suo tempo giornaliero volando in cerca di cibo e le spore infette ingerite possono essere disperse a distanze molto elevate. Per questo gli apiari normalmente non sono collocati nelle zone di migrazione del *M. apiaster* (Yosef *et al.*, 2006) e la maggior parte sono collocati in luoghi strategici e riutilizzati di anno in anno. La dispersione locale delle spore è in base all'area di foraggiamento, che è intorno ai 5 km nelle vicinanze del nido (recensione di Cramp, 1985). Recenti dati sull'allevamento di *M. apiaster* in molte aree del nord (Volet and Burkhardt, 2006) hanno registrato che i cambiamenti climatici potrebbero influire e apportare importanti alterazioni se gli uccelli sono considerati come fonte di dispersione delle spore del patogeno. Il commercio mondiale dei prodotti dell'alveare e il materiale apistico possono giocare un ruolo importante nella dispersione delle spore infette di *N. ceranae* da apiario ad apiario fino a differenti aree geografiche (Klee *et al.*, 2007). In questo senso il commercio di regine e le poche api operaie che la accompagnano possono essere fonte d'infezione in qualsiasi area (Giersch *et al.*, 2009). La diffusione e la trasmissione di spore infette di *N. ceranae* deve essere presa in considerazione per spiegare la sua presenza nelle colonie di *A. mellifera* anche nei luoghi geograficamente lontani teoricamente isolati da fonti infette (Colin *et al.*, 2009). Inoltre *N. ceranae* infetta un ampio range di altre specie di *Apis* (e.g. *Apis koschevnikovi*; Botías *et al.*, 2009b) e alcune specie di bombi (Plischuk *et al.*, 2009). Anche se è stata confermata in Asia e in America meridionale, la possibilità di incontrarla in altre specie di ospiti dovrebbe essere ben studiata anche in Europa.

#### 1.4.6.4. Effetti sulle api

La prima infezione sperimentale di *N. ceranae* su *A. mellifera* mostra (Higes *et al.*, 2007) chiaramente che questo parassita ha un'elevata patogenicità nei confronti dei nuovi ospiti e che porta maggiormente alla morte delle api comparato con *N. apis* (Paxton *et al.*, 2007). In seguito, sono state riscontrate differenze nel tasso di mortalità (Chauzat *et al.*, 2009; Hartmann *et al.*, 2009). Diversi fattori influenzano il tasso di mortalità, tra cui lo stoccaggio del polline, la purificazione e la vitalità, l'età delle api giovani non ancora infettate, sottospecie di ospiti, lo stress del parassita e la giusta identificazione delle spore. Tutte queste variabili mettono in luce l'importanza di standardizzare un protocollo per l'infezione sperimentale, com'è stato suggerito durante la conferenza del COLOSS (Neumann, 2009). Le operaie infettate in laboratorio presentano una chiara degenerazione dell'epitelio delle cellule ventricolari, durante la prima settimana dopo l'infezione, così come la presenza di vacuoli nel citoplasma, lisosomi (la maggior parte secondari), la distruzione delle cellule della membrana e della condensazione del nucleo (pyknosis: Higes *et al.*, 2007). La maggior parte delle cellule epiteliali parassitizzate ha uno spostamento apicale del nucleo e in alcune fasi di sviluppo di *N. ceranae* si trovano invaginazioni della membrana nucleare. Le cellule epiteliali infette mostrano ampie lisi, evidentemente dovute ai vacuoli presenti e agli aggregati di ribosomi e lisosomi. Le cellule pesantemente infette possono sia morire sia essiccarsi e eventualmente

portare alla morte precoce delle api a causa della fame come descritta in *N. apis*. (Liu, 1984). Sono state rilevate lesioni patologiche simili a quelle viste nelle api operaie in laboratorio. Le lesioni che appaiono nella morte dell'ape regina (Higes *et al.*, 2009c) si possono osservare anche nelle bottinatrici disidratate raccolte in campo e nelle api bottinatrici e nutrici raccolte in una colonia normalmente infettata (Higes *et al.*, 2008a, 2009b). Le cellule di queste api hanno l'epitelio dell'intero ventricolo con alterazioni simili a quelle descritte sperimentalmente (Higes *et al.*, 2007). Quindi, l'esclusione all'accessibilità al polline fresco in condizioni naturali non previene la ripercussione patologica del *N. ceranae* nelle api infette, come descritte per il *N. apis* (Mattila and Otis, 2006; Avilez and Araneda, 2007). Le spore non sono state trovate nelle api operaie nelle sezioni istologiche di colture di epitelio, proverticoli, tubi malpighiani, intestino tenue e retto o nelle ovaie della regina. Quindi, *N. ceranae* sembra che abbia un tessuto specifico da parassitizzare sia sulla regina che sull'operaia (Higes *et al.*, 2009c). L'individuazione tramite PCR suggerisce che anche altri tessuti possono essere infettati da *N. ceranae* (Chen *et al.*, 2009a), sebbene questi tessuti non sono stati analizzati istologicamente. Per comprovare l'infezione di diversi tessuti causati da *N. Ceranea*, servono studi di Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM) che comunicano informazioni più attendibili sulla patologia comparandola con il rilevamento molecolare. Come menzionato in precedenza, le differenti temperature hanno diversi effetti nel ciclo vitale endogeno del *N. apis* e *N. ceranae* (Martín-Hernández *et al.*, 2009a). Infatti, gli stadi iniziali dell'infezione di *N. ceranae* sono associati a più stadi parassitari immaturi (70%) di quelli delle spore mature a 33°C. Questo differisce dalle api infette da *N. apis*, in cui è stata riscontrata una uguale proporzione di stadi maturi e immaturi (50%) allo stesso punto dopo l'infezione alla stessa temperatura. Questo fenomeno potrebbe spiegare perché le conseguenze patologiche dell'infezione in ogni parassita sono diverse, anche se il numero di spore presenti è lo stesso. Un altro importante effetto del *N. ceranae* è relativo al sistema immunitario dell'ape. Sette giorni dopo l'infezione sperimentale, le api operaie mostrano che le quantità di geni di Abacina, Imenopteacina Glucosa Deidrogenasi (GLD) e Vitellogenina (Vg) sono significativamente diminuite (Antúñez *et al.*, 2009). Inoltre, *N. ceranae* sembrerebbe che attua una soppressione umorale e cellulare dei meccanismi di difesa delle api, e questo non succede nell'infezione da *N. apis*. L'effetto del Vg può produrre uno specifico comportamento nelle colonie infettate poiché questo peptide influisce sull'organizzazione sociale delle api attraverso il suo effetto pleiotropico sulla divisione dei compiti lavorativi e di bottinamento (Amdam and Omholt, 2003; Nelson *et al.*, 2007). Inoltre la resistenza allo stress ossidativo nelle api è stata correlato all'espressione del Vg. (Seamus *et al.*, 2006; Corona *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2007). La minore espressione di Vg dopo l'infezione con *N. ceranae* è correlata con la riduzione della durata della vita delle api infette (Nelson *et al.*, 2007; Tremolina *et al.*, 2007). *N. ceranae* ha anche un effetto sul comportamento delle bottinatrici infette attraverso un forte stress, dimostrato da un incremento della loro fame fino a comprometterne la sopravvivenza. Tutti insieme, questi effetti probabilmente alterano il comportamento alimentare e la transizione a diventare bottinatrici. (Maybank and Naug, 2009). Anche se le linee patologiche d'infezione da *N. ceranae* sono simili a *N. apis* (Martín-Hernández *et al.*, 2009a), alcuni sintomi clinici normalmente associati all'infezione di *N. apis* non sono stati riscontrati, come tremore e dissenteria attraverso tracce fecali nell'arnia (Martín-Hernández *et al.*, 2009a). Il

meccanismo di fondo di queste differenze nell'infezione delle api non è ancora del tutto chiaro visto che è un microsporidio che infetta lo stesso tessuto causando lesioni simili. Quindi è importante esaminare in modo più approfondito le conseguenze funzionali dell'infezione da entrambi le specie di *Nosema*.

#### **1.4.6.5. Effetti sulla colonia**

I postulati di Koch hanno mostrato che nelle colonie infettate da *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2008a; COLOSS workshop, 2009), in precedenza, si riscontravano singole api infette. Il patogeno estratto dalla malattia della colonia e trasmesso in colonie sane, induce la malattia e morte della colonia, nonché la capacità di recuperare *N. ceranae* dalle nuove colonie infettate. La moltiplicazione del patogeno si ha durante tutto l'anno senza pause del ciclo biologico. Inoltre non ci sono differenze di alterazioni patologiche delle api infette nelle diverse stagioni, confermando precedenti osservazioni di campioni patologici (Martín-Hernández *et al.*, 2007). Gruppi d'individui strettamente sociali come le api sono considerate come un sistema di organismi viventi complesso che funziona come se fosse un unico individuo. Questo è indispensabile per comprendere la differenza tra malattie della colonia o dei singoli individui. Questo gruppo sociale è particolarmente attrattivo per gli organismi patogeni perché questo è un'ottima opportunità di trasmissione attraverso il microambiente omogeneo dell'ospite (Naug and Gibbs, 2009). Infatti, un patogeno può essere particolarmente letale per le singole api, ma la colonia può essere in grado di compensare la morte delle singole api perché la sua organizzazione sociale fornisce uno strumento, potenzialmente, per resistere alla rapida diffusione del patogeno (Naug and Camazine, 2002; Naug and Smith, 2007). In questo senso, la regina è essenziale per il mantenimento a un corretto livello della popolazione della colonia (Higes *et al.*, 2008a). I risultati della parassitazione delle singole api da *N. ceranae* ha un chiaro effetto a livello di colonia dovuto alla morte continua della api altamente infettate (Figure 33).



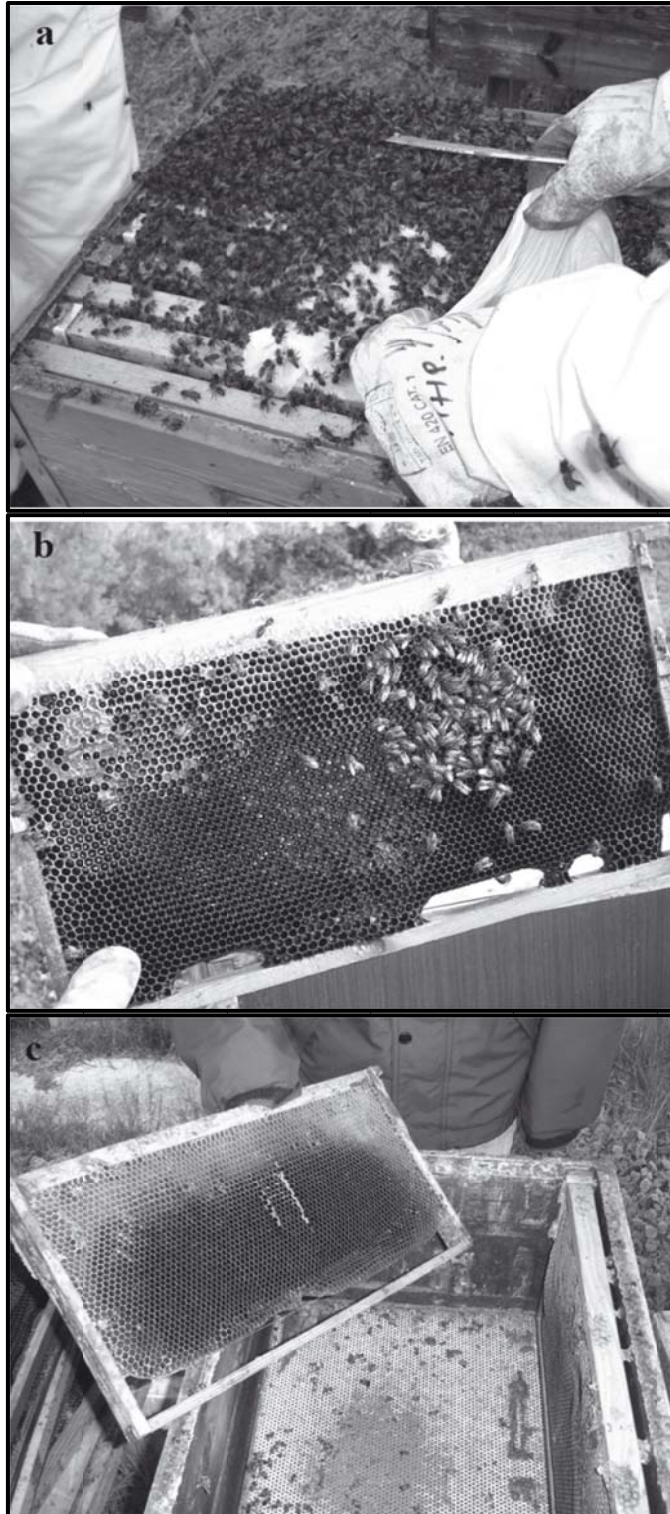


Figure 33. Colonia infetta da *N. ceranae* nel Maggio 2005 (fase asintomatica) (a) stessa colonia un anno e mezzo dopo (dicembre 2006) mostra chiari sintomi di spopolamento (b). Questa colonia dopo pochi giorni è morta all'interno di riscontrano solo poche api e la regina (c).

Le spore di *N. ceranae* sono normalmente riscontrate nelle api di arnie morte o indebolite, dove si ha un'evidente perdita di api adulte e una riduzione della forza della colonia (Higes *et al.*, 2008a, 2009b). L'indebolimento della colonia è dovuto probabilmente al fatto che le api più infette (prevalentemente bottinatrici) non ritornano all'alveare in quanto si presume che queste api adulte muoiano lontano



dalla colonia (Higes *et al.*, 2008a, 2009b; Kralj and Fuchs, 2009). D'altronde una notevole riduzione di produzione di miele è stata riscontrata in colonie infette ma asintomatiche comparandole con quelle cui è stato somministrato un trattamento contro il microsporidio (Botías *et al.*, 2009a). Le colonie controllate per *Nosema*, trattate con Fumagallina (sostanza proibita dal Regolamento), producono cinque volte più miele rispetto alle arnie di controllo (senza trattamento) e hanno molta più covata e api adulte. Una delle conseguenze di quest'alto tasso di mortalità delle bottinatrici è che le api non infette iniziano a bottinare prima. L'età alla quale le api diventano bottinatrici varia in base alle condizioni della colonia e all'età delle api (Huang and Robinson, 1996). Quando il numero di bottinatrici diminuisce, dovuto per esempio a *N. ceranae*, le api diventano bottinatrici a un'età più precoce (Huang and Robinson, 1996; Amdam and Omholt, 2003). Inoltre le operaie infette o affette da altri fattori dannosi iniziano a bottinare e svolgono altri compiti rischiosi a un'età più precoce comparate alle api della stessa fascia di età di altri alveari sani (Tofilski, 2009). Vg e l'ormone giovanile (JH) svolgono un ruolo fondamentale in questo fenomeno, attuando come comune repressore nella transizione da ape nutrice-bottinatrice. (Amdam and Omholt, 2003; Guidugli *et al.*, 2005). Le api nutrici hanno un basso livello di JH ma un alto di Vg, mentre le api bottinatrici mostrano un rapporto contrario (Robinson *et al.*, 1991). Questo suggerisce che l'incremento del titolo di JH o la soppressione di Vg influenzano il passaggio da nutrici a bottinatrici (Whitfield *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 2007) e l'anticipo del bottinamento, provocando una riduzione della durata della vita delle api (Nelson *et al.*, 2007). Allo stesso modo un'età precoce di passaggio a bottinatrici è stata descritta in colonie affette da *N. apis* (Hassanein, 1953; Woyciechowski and Morón, 2009; Lin *et al.*, 2009), sebbene la soppressione dell'espressione di Vg è stata osservata solo nelle api infettate da *N. ceranea* e non nelle api infette da *N. apis* (Antúnez *et al.*, 2009). Questo decremento di Vg probabilmente affetta anche l'espressione di JH e le alterazioni del contenuto Vg-JH possono influenzare la precoce formazione di api bottinatrici, anche se questa ipotesi rimane da confermare (M. Spivak, pers. commun.). La presenza di parassiti e patogeni, come *Varroa destructor* e *Nosema* spp, influenza il volo delle bottinatrici causando il non ritorno in alveare (Kralj and Fuchs, 2006, 2009). Questo è stato anche interpretato come un comportamento adattativo delle api per espellere il patogeno dalla colonia, processo chiamato "rimozione suicida del patogeno". La popolazione di nuove api che deve sostituire le bottinatrici mancanti, presumibilmente inizierà a volare fuori dall'arnia alcuni giorni prima del normale e questo può essere causato dall'alterazione ormonale sopra descritta e dai cambiamenti del comportamento sociale. Infine, nello spopolamento degli alveari diventa evidente che la regina non può compensare la perdita di bottinatrici e di api infette e la morte diventa imminente (Figura 33) (Higes *et al.*, 2008a). Sebbene sia chiaro che la noseiasi causata da *N. ceranea* ha differenti partner epidemiologici in Europa (COLOSS workshop, 2009), questa malattia ha una lunga incubazione asintomatica a livello di colonia, il che spiegherebbe l'assenza di sintomi evidenti prima della morte dell'alveare. La conta delle spore delle api infette che stanno all'interno dell'arnia ha un andamento molto variabile, dall'inizio alla fine della malattia e non è una misura reale della infezione da *Nosema ceranae*. Infatti, quasi venti anni fa è stato stabilito che l'infezione da *Nosema* non si può stabilire secondo campioni di api prelevate dalla covata (El-Shemy and Pickard, 1989). La percentuale di api bottinatrici infette da *N.*

*ceranae* è l'indicatore più valido per la determinazione della malattia della colonia, mentre la conta delle spore è un parametro non molto attendibile (Higes *et al.*, 2008a). Le colonie infette diventano chiaramente deboli e povere di api adulte e collassano nel giro di 1,5-2 anni. Due differenti tipi di collasso si possono verificare nel momento in cui la colonia muore. Quando il collasso avviene durante i mesi freddi, più del 50% delle api trovate nell'arnia era infetta. Infatti, la conta delle spore in questo caso risulta quasi sempre superiore a 10 milioni e la regina (quando c'è) risulta infetta. Quando il collasso avviene nella tarda primavera la percentuale di api infettate e la conta delle spore sono inferiori. In questa circostanza la regina normalmente non è infetta. È probabile che la differenza tra le due situazioni stia nel numero di api vecchie e giovani in ogni stagione. Nella prima primavera la percentuale di api nate riduce la percentuale d'infezione, con ciò il ritardo dell'infezione della regina (Higes *et al.*, 2009c).

Sono state individuate quattro fasi d'infezione da *N. ceranae* (suddivise su due anni) nelle famiglie di api prima di giungere al collasso.

La fase 1 (o fase asintomatica) all'inizio del contagio è caratterizzata da condizioni di sviluppo entro i parametri di normalità. Meno del 60% delle bottinatrici sono risultate infettate e il conteggio delle spore non ha mai fatto verificare quantità maggiori di un milione per ape. Si può considerare che questa fase duri dall'inizio del contagio fino all'autunno della stagione d'infezione (in questa condizione è verosimile che le famiglie e le produzioni non siano eccezionali).

La fase 2 (o fase di rimpiazzo) ha mostrato l'insolito prolungamento del comportamento di deposizione della regina durante i mesi invernali, a causa di un aumento della mortalità delle larve. Il numero di api vecchie infette risulta in percentuale sempre più alto rispetto a quanto riscontrato nella fase 1. Per tale motivo viene anche rinvenuto in esse un maggior numero di spore.

La fase 3 (o di falso recupero) inizia nella primavera successiva quando la famiglia comincia a svilupparsi più velocemente. I parametri clinici (percentuale di api infette e numero di spore) sono simili alla fase 1, come risultato dell'aumento di popolazione. Finché la popolazione cresce, la famiglia riesce a fronteggiare la malattia. Fino a tutto maggio risultano in diminuzione sia la percentuale di bottinatrici infette che la percentuale delle api infette prelevate dall'interno delle arnie, nonché la carica di spore/ape per entrambe. Da giugno però lo sviluppo della popolazione non ha più la stessa intensità, la popolazione di api tende a diminuire ed il patogeno ricomincia ad avere lentamente il sopravvento. Aumenta quindi la percentuale di api infette sia bottinatrici che nell'arnia nonché il livello di infezione per ape.

La fase 4 (o di spopolamento) inizia a settembre. L'aumento del numero di spore è esponenziale sia nelle bottinatrici che nelle api all'interno dell'arnia. Diventa anche progressivamente crescente la percentuale delle bottinatrici infette fino a raggiungere oltre l'80%, ma in parallelo aumenta anche la percentuale di infezione delle api dell'arnia, fino al 90%. Nella fase 4, da settembre a novembre, è repentino il calo di popolazione. Il numero di favi popolati si riduce drasticamente fino al ritrovamento di sole poche api con spesso la regina morta. Miele e polline sono presenti e in molti casi è rinvenibile una piccola rosetta di covata opercolata.

*N. ceranae*, in Spagna è stato recentemente proposto come il fattore chiave che determina la perdita degli alveari degli apicoltori professionali (Higes *et al.*, 2009d).

Inoltre ci sono diverse versioni sulle conseguenze dell'infezione di *N. ceranaea* in apiari dei diversi paesi europei, dove è stata osservata la relazione tra la diminuzione delle api all'interno dell'arnia e infezione da *N. ceranaea*. In Polonia, in Olanda, Austria e Francia (Topolska *et al.*, 2008; Gajda e Topolska, 2009; Van der Zee *et al.*, 2008; Derakhshifar *et al.*, 2009; Borneck, pers. comun.), la presenza di *N. Ceranaea* è stata legata alla morte degli alveari, incluso un recente documento dove si hanno perdite massive di arnie in tutto il nord Europa (Korpela, 2009). In altri studi l'infezione da *N. ceranaea* sembra non avere nessun effetto sugli alveari (Charrière, 2009; Gómez, 2008). È importante portare avanti studi paralleli per comparare le conseguenze nel lungo periodo in diverse condizioni climatiche e con differenti tecniche apicole, perché è evidente che questi parametri possono influenzare l'effetto dell'infezione nelle colonie.

#### **1.4.6.6. Diagnosi e profilassi**

Il controllo delle malattie infettive negli animali che producono alimenti è un aspetto essenziale e include la diagnosi della malattia e le misure per il trattamento dei malati e la prevenzione della diffusione della malattia. Il controllo delle malattie delle api è necessario per salvaguardare i prodotti alimentari (miele, polline etc.) e gli impollinatori per le piante siano esse colture o specie selvatiche. Come detto in precedenza, le api bottinatrici sono l'esempio più attendibile per la determinazione di *N. ceranaea*. Queste devono essere raccolte all'entrata dell'arnia (evitando di campionare le api giovani che escono per il volo di orientazione) o direttamente nell'arnia dai telaini prendendo le api più vecchie. Dal momento che la sensibilità della diagnosi è altamente influenzata dal numero di api analizzate (Martín-Hernández *et al.*, 2009b; Gajda, 2009), è importante raccogliere il maggior numero possibili di bottinatrici e registrare il numero (o il peso) delle api analizzate. L'individuazione di *N. ceranaea* può essere realizzata tramite microscopio (OIE, 2008) (Figura 34), tramite metodi molecolari di o con microscopia elettronica a trasmissione (ad esempio il numero delle spore o il numero di spirali dei filamenti polari).

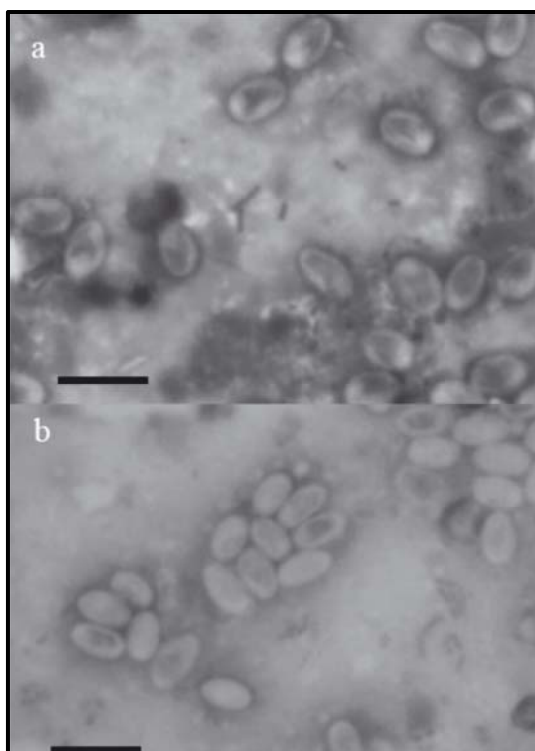


Figura 34. Spore di *Nosema apis* (a) e *Nosema ceranae* (b) evidenziate con blu di metilene (microscopio×1000). Le spore di *N. ceranae* sono più piccole di quelle di *N. apis*. (5 µm.)

Molti protocolli di PCR sono stati descritti, tra cui PCR-RFLP (Klee *et al.*, 2007; Tapasztó *et al.*, 2009), PCR con primers specifici (ad esempio Chen *et al.*, 2008), PCR-RT (real-time) (Cox-Foster *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009b; Bourgeois *et al.*, 2010) o PCR multiplex (Martín-Hernández *et al.*, 2007). Quest'ultimo è raccomandato da OIE (OIE, 2008). L'individuazione non è considerata come una diagnosi della malattia poiché dal punto di vista patologico, la diagnosi si basa nell'analisi dei segni clinici e dei sintomi che non sono facili da riconoscere nelle malattie provocate da *N. ceranae*. È necessario anche considerare la nosemiasi tipo C in diverse aree geografiche, e dovrebbero essere definiti parametri clinici per stabilire con precisione la prognosi della malattia, come la proporzione di api bottinatrici o nutrici infette. L'antibiotico Fumagallina è efficace contro entrambe le specie di *Nosema* ed ha un'efficacia di sei mesi (Higes *et al.*, 2008a, 2009b). La Fumagallina deriva da *Aspergillus fumigatus* (Bailey, 1953; Didier, 1997) ed è uno dei pochi farmaci che è efficace contro i microsporidi (MacCowan *et al.*, 1951). Tuttavia, a causa dell'assenza di limite massimo fissato di residui nel miele è attualmente proibito in tutta la Comunità Europea. Di conseguenza è importante trovare trattamenti alternativi. Api operaie infettate in laboratorio e alimentate con timolo o candito di resveratrolo mostrano un'infezione significativamente più bassa e il resveratrolo inoltre aumenta la durata della vita delle api (Maistrello *et al.*, 2008). Questi prodotti potrebbero essere usati come alternativa al controllo del *Nosema*, anche se sono necessari ulteriori studi e test in campo, in condizioni naturali. Altre possibili alternative per i trattamenti sono Protofil (Chioveanu *et al.*, 2004), Vita Feed Gold (Costa *et al.*, 2009), Api-Herb (Nanetti, 2009; Giacomelli *et al.*, 2009), Nonosz (Bekesi *et al.*, 2009), basati su estratti di erbe, hanno un controllo potenziale sul *N. ceranae*. In alternativa una tecnica apistica di prevenzione alla malattia, come la sostituzione dei telaini del nido (favi), della

regina e un'appropriate gestione igienica dell'arnia sembrano influire sul controllo della nosemiasi (Korpela, 2009; Kryeger, 2009). *N. ceranae* ha causato una piccola pandemia negli ultimi dieci anni. Quindi si sta considerando come una malattia emergente che causa un importante problema sanitario sia a livello delle singole api che delle colonie probabilmente dovuto al forte impatto della recente colonizzazione delle api europee. Ci sono ancora poche informazioni sui fattori epidemiologici e sui sintomi clinici di questa malattia sia per quanto riguarda l'Europa e che le altre parti del mondo, dovuta all'elevata diversificazione delle pratiche apistiche e delle condizioni climatiche. Studi sulla nosemiasi tipo C causata da *N.ceranae* si sono limitati a osservare la malattia durante pochi anni e quindi studi sul lungo periodo sono indubbiamente necessari per chiarire il ruolo che questo microsporidio ha nella salute delle colonie e per aumentare la nostra comprensione delle incognite ancora presenti su questa malattia.

#### **1.4.7. Le virosi**

Secondo i quaderni di zooprofilassi le virosi delle api sono patologie spesso sottovalutate da apicoltori, esperti apistici e veterinari. Diffuse in tutto il mondo, possono causare infatti gravi perdite economiche qualora associate ad altre malattie. L'avvento di *Varroa destructor* (arrivata nel 1981 in Italia) ha fortemente contribuito ad un aumento dell'incidenza delle virosi. La varroa, infatti, rappresenta sia un vettore passivo per la trasmissione dei virus mediante la saliva (Shen *et al.*, 2005), sia un fattore scatenante la riattivazione di virus allo stato latente. È stato osservato, infatti, che l'azione traumatica dell'acaro su cute ed organi dell'ape e l'attività enzimatica dei succhi inoculati, provocando immunodepressione, determinano la manifestazione di infezioni virali latenti. Altre patologie predispongono l'insorgenza delle virosi, sono la nosemiasi, la peste europea e l'amebiosi. La trasmissione dei virus avviene solitamente per via orizzontale (ad esempio, tramite le deiezioni delle api, la pappa reale delle nutrici, la saliva della varroa, l'attività dell'apicoltore), ma studi recenti (Chen *et al.*, 2006) hanno evidenziato la trasmissione dei principali virus delle api anche per via verticale (dall'ape regina alla covata). La maggioranza delle malattie virali sono caratterizzate da incidenza variabile in funzione del periodo dell'anno (andamento stagionale) e dell'area geografica in cui è ubicato l'apiario. Praticamente tutte le virosi sono presenti negli apiari in forma latente o asintomatica. In coincidenza di eventi scatenanti (quali, per esempio, altre patologie dell'alveare o fattori stressanti di varia natura) si evidenziano manifestazioni cliniche che possono assumere a volte forme così eclatanti da portare a morte le api o da rendere consigliabile la distruzione delle famiglie e/o dei favi colpiti. Il virus della covata a sacco (SBV), il virus della cella reale nera (BQCV) ed il virus della paralisi cronica (CBPV), provocano sintomi abbastanza caratteristici quali, rispettivamente: larve sacciformi, celle reali annerite ed api piccole e nere. Per le altre virosi, invece, i sintomi sono solitamente più generici e comuni: presenza di api con ali deformate, assenza di compattezza /elevata mortalità della covata, opercoli forati. In ogni caso, per la conferma della diagnosi eziologia è sempre necessario ricorrere alle analisi di un laboratorio specializzato (tra i quali, ad esempio, gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali in Italia). Ad oggi, sono almeno 18 (Allen & Ball, 1996) i virus evidenziati e classificati nelle api (Tabella 11). Fatta eccezione del CBPV, del Virus



Filamentoso e del Virus Iridescente, la maggior parte sono virus picorna-like di circa 28-30 nm di diametro, privi quindi di envelope e con forma icosaedrica; morfologicamente simili, sono evidenziabili al microscopio elettronico a trasmissione. Per l'identificazione di specie sono però necessarie prove immunologiche (che prevedono cioè una reazione tra antigene ed anticorpo specifico) come l'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) e l'IEM (ImmunoElectron Microscopy), oppure test biomolecolari quali la PCR (Polimerase Chain Reaction).

**Tabella 11. Virus più importanti riconosciuti patogeni per le api**

<b>Virus della paralisi cronica (Chronic Bee Paralysis Virus - CBPV)</b>
<b>Virus della covata a sacco (Sacbrood Virus - SBV)</b>
<b>Virus della paralisi acuta (Acute Bee Paralysis Virus - ABPV)</b>
<b>Virus israeliano della paralisi acuta (Israeli Acute Paralysis Virus - IAPV)</b>
<b>Virus delle ali deformi (Deformed Wing Virus - DWV)</b>
<b>Virus della cella reale nera (Black Queen Cell Virus - BQCV)</b>
<b>Virus dell'ala opaca (Cloudy Wing Virus - CWV)</b>
<b>Virus della paralisi lenta (Slow Paralysis Virus - SPV)</b>
<b>Virus Y dell'ape (Bee Virus Y- BVY)</b>
<b>Virus X dell'ape (Bee Virus X - BVX)</b>
<b>Virus filamentoso (Filamentous Virus - FV)</b>
<b>Virus iridescente (Apis Iridescent Virus - AIV)</b>
<b>Altri virus meno conosciuti:</b>
<b>Arkansas Bee Virus (ABV), Berkley Bee Picornavirus (BBPV), Kashmir Bee Virus (KBV),</b>
<b>Egypt Bee Virus (EBV)</b>

#### **1.4.7.1. Virus della paralisi cronica (Chronic Bee Paralysis Virus - CBPV)**

Eziologia ed epidemiologia. È stato uno dei primi virus isolati dalle api; prima che il CBPV venisse riconosciuto ed identificato, la sintomatologia che lo caratterizzava era erroneamente attribuita ad altre malattie (nosemiasi, varroasi, amebiasi ed acariosi). In caso di CBPV, infatti, è tipico il riscontro di piccoli gruppi di api tremolanti, piccole, nere ed incapaci di volare sul predellino delle arnie. L'infezione non ha andamento stagionale, rimane spesso allo stato latente ed è endemica in numerosi Paesi; quando però si manifesta in forma acuta, è possibile assistere ad un'elevata mortalità nelle famiglie colpite. Di solito la malattia diviene clinicamente rilevabile in situazioni di "sovraffollamento" dell'alveare abbinato ad eventi sfavorevoli quali: carenza delle risorse nettarifere, condizioni climatiche avverse od orfanità della famiglia. Anche determinate pratiche apistiche, quali ad esempio la chiusura forzata e la formazione di pacchi d'ape, possono fungere da fattori predisponenti. Il virus della paralisi cronica si rinviene con maggior frequenza in colonie scarsamente o mediamente infestate da varroa. Nei casi in cui il CBPV si trova associato all'ABPV (con il quale può trovarsi in competizione), può portare a morte colonie di api mediamente colpite dall'acaro. La trasmissione dell'infezione per via orale, richiede molti milioni di particelle virali mentre, se inoculato direttamente nell'emolinfa, ne

bastano solo un centinaio o meno. Questo spiega almeno in parte perché la varroasi ha provocato un aumento dell'incidenza dell'infezione da CBPV. Nel 2006 Chen ha dimostrato la possibilità di una trasmissione verticale del virus.

Sintomatologia. In base alle caratteristiche genetiche delle api, si possono delineare due sindromi ben distinte:

1) "Mal della foresta" - Sindrome così chiamata in quanto coincideva con il raccolto della melata: le api perdono la capacità di volare muovendosi tremolanti e senza finalità apparente davanti all'arnia, raggruppandosi spesso su fili d'erba, dove muoiono. Si possono notare anche soggetti con dilatazione dell'addome per accumulo di liquido nella borsa melaria ed ali allargate a K. Nei casi più gravi, gruppetti di api con la stessa sintomatologia si rinvencono nella parte superiore del favo. La famiglia può ridursi numericamente fino ad arrivare a poche centinaia di soggetti.

2) "Mal nero": le api appaiono nere a causa della perdita dei peli. In questo caso non perdono la capacità di volare, ma sono di dimensioni più piccole delle altre; passato qualche giorno dalla comparsa dei primi sintomi, vengono a morte dopo aver presentato evidenti tremori. Spesso, al rientro nell'alveare, vengono attaccate dalle guardiane perché non riconosciute.

#### **1.4.7.2. Virus della covata a sacco (Sacbrood Virus - SBV)**

Eziologia e sintomatologia. È un virus picorna-like di circa 28 nm di diametro, poco resistente agli agenti chimici, fisici e ambientali: 10' a 55-65°C, 6 giorni all'azione diretta dei raggi solari; nel miele perde la sua virulenza dopo 5-6 settimane. Per via orale, infetta le giovani larve delle api, già molto sensibili a due giorni. Il quadro sintomatologico si evidenzia nelle larve opercolate (Figura 35), mentre gli adulti sono asintomatici. Gli opercoli sono forati ed all'interno delle cellette le larve, dapprima giallognole divengono brunastre pervenendo a morte. Il corpo si fluidifica mentre il tegumento rimane integro: questo fa assumere un tipico aspetto "sacciforme" alle larve nel momento in cui, mediante pinzetta, vengono estratte dalle cellette.



**Figura 35. Larva colpita dal virus della covata a sacco (SBV)**

Successivamente la larva infetta si dissecca assumendo forma di scaglia nerastra mummificata. Normalmente non si notano odori particolari anche se, a volte, la covata può emanare un blando odore acidulo.

Trasmissione e diffusione dell'infezione. L'infezione ha tipico andamento stagionale con maggiore incidenza nel periodo primavera/inizio estate (di solito è particolarmente evidente dai primi di giugno ai primi di luglio). Normalmente tende a rimanere poco evidente, scomparendo entro l'autunno; associata però alla varroa, tale virus può determinare effetti devastanti ed assumere carattere epidemico. Il SBV si trasmette alle api nel momento in cui vanno a ripulire le cellette dalle larve morte infette. Il virus replica quindi a livello delle ghiandole ipofaringee e viene trasmesso alle larve dalle nutrici mediante la somministrazione di pappa reale. È stata dimostrata anche la trasmissione verticale, per via transovarica.

#### **1.4.7.3. Virus della paralisi acuta (Acute Bee Paralysis Virus - ABPV)**

Eziologia ed epidemiologia. Si tratta di un Picornavirus-like, di circa 30 nm di diametro.

Di norma è riscontrabile nei tessuti adiposi dell'ape e non provoca sintomatologia.

Abbinata alla varroa, l'infezione può invece assumere un andamento particolarmente grave provocando mortalità sia a carico della covata che delle api adulte. In questi casi è possibile isolarlo anche dall'emolinfa. La sua carica infettante è direttamente proporzionale al grado di infestazione da varroa: studi sperimentali (hanno dimostrato che, in caso di bassa infestazione da varroa, il 10% degli alveari risultano positivi al virus; mentre, con forte infestazione da varroa possono risultarne infetti da ABPV, fino al 100%. Solitamente è abbinato al virus della paralisi cronica (CBPV): in caso di varroasi massiva, però, il ABPV prevale sul CBPV, in quanto caratterizzato da una più rapida attività di replicazione. Sembrerebbe, infine, che il ABPV sia fortemente correlato anche alla peste europea.

Sintomatologia. Si osserva mortalità nella covata; nelle api adulte, si rilevano paralisi e mortalità, riduzione della longevità e alterazioni del comportamento con carente accudimento della covata.

#### **1.4.7.4. Virus delle ali deformi (Deformed Wing Virus - DWV)**

Eziologia ed epidemiologia. Anche il virus delle ali deformi è stato classificato come Picornavirus-like.

L'infezione è relativamente diffusa, sebbene si presenti spesso in forma subclinica. Infatti, i casi di infezione da DWV non associati a *Varroa destructor* passano spesso inosservati.

Questo virus colpisce le forme immature delle api durante il loro sviluppo nelle cellette. A differenza dell'ABPV, è caratterizzato da un ciclo di replicazione molto lento, consentendo generalmente alle api di sfarfallare nonostante deformazioni gravissime (es. a carico delle ali) o ridotte dimensioni del corpo ed aspettativa di vita molto breve (Figura 36).





Figura 36. Api con ali fortemente deformate

In relazione alla carica virale infettante, questa virosi può comunque provocare, oltre alle malformazioni sopra citate, anche la morte della covata nelle cellette. Nei casi di associazione ad infestazione da *Varroa destructor*, la mortalità può interessare sia larve che api adulte. Il virus è stato isolato da *Apis mellifera* in Europa, Africa, Medio Oriente e Asia; da *Apis cerana* in Cina. Recentemente ne è stata dimostrata anche la trasmissione verticale.

#### 1.4.7.5. Virus Della Cella Reale Nera (Black Queen Cell Virus - BQCV)

Eziologia ed epidemiologia. Questo Picornavirus-like colpisce esclusivamente le celle delle api regine e rappresenta una delle cause più frequenti di mortalità tra le larve delle api appartenenti a questa casta. Venne isolato per la prima volta nel 1974 da larve e pupe di regine trovate morte dopo opercolatura delle celle reali. Il nome del virus deriva dall'annerimento delle forme larvali e delle pareti delle relative celle. In realtà, anche le api operaie e la covata di fuchi possono essere infettati dal BQCV, ma generalmente in questi non si manifesta alcun tipo di sintomatologia. L'infezione è più frequente quando le famiglie sono affette da nosemiasi in quanto le lesioni a carico dell'intestino facilitano il passaggio del virus nell'emolinfa. È stata dimostrata la trasmissione del virus anche per via verticale. Sono riscontrate infette anche le api bottinatrici.

#### 1.4.7.6. Virus israeliano della paralisi acuta (Israeli Acute Paralysis Virus - IAPV)

Attualmente una delle ipotesi formulate sulla eziologia della CCD (Colony Collapse Disorder o Sindrome dello spopolamento degli alveari) è l'infezione da virus israeliano della paralisi acuta delle api (Israeli Acute Paralysis Virus - IAPV). Trattasi di un picornavirus-like, correlato a ABPV e KBV. Sperimentalmente sono stati riprodotti i seguenti sintomi: annerimento di addome e torace, movimento circolare, atassia, scarsa attitudine al volo e a mangiare, paralisi, spasmi e morte.

#### 1.4.7.7 Virus delle Ali Opache (Clowdy Wing Virus - CWV)

È mortale solo in caso d'infezione grave. Sembrerebbe associato alla varroa e si trasmette, oltre che per contatto diretto, anche per via aerogena a brevi distanze. Colpisce sia le api adulte che le larve. L'infezione non sembrerebbe soggetta ad alcuna variabilità di tipo stagionale. Il CWV è largamente diffuso in Europa ed è

stato segnalato in tutti i continenti. Negli apiari della Gran Bretagna è stata riscontrata una positività del 15%.

#### **1.4.7.8. Virus della paralisi lenta (Slow Paralysis Virus - SPV)**

Solitamente presente allo stato latente nelle colonie colpite. Nei casi in cui è associato alla varroosi può provocare elevata mortalità sia nelle api adulte che nella covata. È un virus non ancora classificato, a lenta replicazione. In infezioni sperimentali, induce mortalità con paralisi degli arti anteriori.

#### **1.4.7.9. Virus Y dell'ape (Bee Virus Y - BVY) e Virus Filamentoso (Filamentous Virus -FV)**

Questi due virus solitamente, non portano a morte le api. Come il BQCV, sono in stretta associazione con l'infestazione da *Nosema* spp., in cui l'intestino tenue danneggiato consente loro di passare nell'emolinfa: la conseguente diffusione per via sistemica, aggrava la sintomatologia. Il picco dell'infezione coincide con la comparsa dei casi di nosemiasi, in primavera/inizio estate.

#### **1.4.7.10. Virus X dell'ape (Bee Virus X - BVX)**

Il BVX replica nell'intestino dei soggetti adulti e si può isolare nelle api morte in tardo inverno/inizio primavera. Compare frequentemente in associazione con l'amebiasi, malattia protozoaria provocata dal *Malpighamoeba mellificae*. Il virus, infatti, va ad amplificare i danni di questo patogeno (minore vitalità delle api, mortalità precoce). Il BVX è stato isolato in tutto il mondo, ad eccezione dell'Asia e predilige i climi freddi.

Con le basse temperature, infatti, si ha un rallentamento del metabolismo delle api ed un conseguente allungamento della loro vita. Il virus, a lenta replicazione, dispone così di più tempo per indurre l'infezione.

#### **1.4.7.11. Virus Iridescente (Apis Iridescent Virus - AIV)**

Il virus iridescente delle api è un virus a DNA con dimensioni piuttosto grandi (130 nm di diametro), caratterizzato dalla presenza di envelope. Tassonomicamente è stato collocato nel genere Iridovirus, famiglia Iridoviridae.

In un paio di mesi può portare a morte la colonia. L'AIV venne isolato in India da *Apis cerana*, in colonie affette dalla "malattia del glomere" (Clustering disease) in cui le api, inattive ed incapaci di volare, tendono a formare grappoli separati. L'andamento della malattia in relazione alle stagioni appare estremamente variabile.

#### **1.4.7.12. Altri Virus meno conosciuti: Arkansas, Berkley, Kashmir, Kakugo**

I virus Arkansas e Berkley presentano una limitata distribuzione in natura.

Il "Kashmir Bee Virus" (KBV) fu inizialmente isolato da api adulte nelle regioni del nord e dell'ovest dell'India. Vi è scarsità di notizie circa la sintomatologia caratteristica dell'infezione da KBV, ma alcuni autori ritengono che KBV sia il più

virulento fra i virus delle api attualmente conosciuti (elevata mortalità sia negli adulti che nelle larve). Infine, è stata recentemente dimostrata una correlazione fra la presenza nel cervello delle api di una molecola di RNA con sequenza polinucleotidica simile a quella di diversi virus "Picornalike" (Kakugo RNA) e l'insorgenza di manifestazioni aggressive nelle operaie (in giapponese Kakugo significa "pronto all'attacco").

A tutt'oggi non esistono in commercio rimedi terapeutici specifici ed efficaci per le malattie virali delle api. In caso di sintomatologia particolarmente grave, il rimedio più efficace resta la distruzione delle famiglie colpite: investire troppo tempo nella gestione degli alveari potrebbe avere esiti peraltro dubbi. Negli altri casi si possono realizzare le seguenti pratiche apistiche: distruzione dei favi contenenti la covata infetta (possono essere sostituiti con favi contenenti una covata nascente prelevata da alveari sani), messa a sciame abbinata a trattamento antivarroa e sostituzione delle api regine. Le arnie delle famiglie infette vanno opportunamente lavate e disinfettate prima di essere utilizzate per immettervi altre api.

Negli Stati Uniti ed in Italia è in sperimentazione un agente antivirale denominato Remebee™, in grado di limitare l'impatto dell'infezione causata da IAPV. Sviluppato con la tecnologia dell'RNA interferenza (RNAi), l'antivirale viene addizionato alla soluzione di saccarosio somministrata alle api nel periodo in cui non bottinano. Sono in studio soluzioni analoghe contro altri virus delle api e contro altri patogeni come il nosema.

Di fondamentale importanza sono infine le misure preventive e indirette, quali:

- applicazione delle buone pratiche di allevamento in apiario (essenziali per mantenere e potenziare le difese naturali delle colonie; per prevenire e per evitare la diffusione delle infezioni virali);
- attuare misure preventive la diffusione del Nosema spp. (es. somministrazione di prodotti adatti allo scopo nella alimentazione delle api);
- attuare una accurata lotta alla varroa;
- monitorare i livelli di infestazione da varroa e di infezione da nosema.

Ridurre al minimo ogni fattore predisponente e scatenante (stress di ogni natura: chimico, fisico, metabolico, infettivo) può evitare infatti, la riattivazione di infezioni virali latenti.

## 1.5. Omeopatia e api

### 1.5.1. Medicina non convenzionale

Nell'attuale medicina non convenzionale in medicina veterinaria (MNCV) numerose pratiche mediche che sono conosciute ed utilizzate da moltissimi anni in medicina umana solo una parte ha trovato applicazione in veterinaria per la cura ed il benessere degli animali. Rientrano nel contesto della filosofia medica di base, anche veterinaria: l'Omeopatia, l'Omotossicologia, l'Agopuntura, la Medicina Tradizionale Cinese, la Fitoaromaterapia e la Floriterapia, mentre possiamo inserire nel capitolo delle cosiddette "tecniche complementari" l'Oligoterapia e le Tecniche manuali come la Kiropratica, l'Osteopatia e lo Shiatsu. La MNCV ha recentemente trovato un ulteriore campo "ufficiale" d'applicazione nella zootecnia biologica. Infatti, il Regolamento (CE) 889/2008 che riporta le modalità di applicazione del Reg. (CE) 834/2007, relativamente alla profilassi e cure veterinarie, prevede che i prodotti fitoterapici, i prodotti omeopatici, gli oligoelementi e i prodotti elencati all'allegato V, parte 3 (materie prime di origine minerale), e all'allegato VI, parte 1.1 (vitamine e oligoelementi), sono preferiti ai medicinali veterinari allopatrici ottenuti per sintesi chimica o agli antibiotici, purché abbiano efficacia terapeutica per la specie animale e tenuto conto delle circostanze che hanno richiesto la cura. In buona sostanza si chiede di preferire la medicina non convenzionale (MNCV) a quella convenzionale (MC). Uno sguardo alla letteratura ci conferma come in questi ultimi anni siano aumentate le ricerche sull'applicazione della MNCV sia negli allevamenti convenzionali sia in quelli alternativi, biologico compreso. La maggioranza delle pubblicazioni riguarda l'omeopatia ed i comparti maggiormente esplorati sono quello bovino, soprattutto vacche da latte e quello ovino, mentre sono in aumento quelle sugli avicunicoli, mentre sulle api ci sono pochissime pubblicazioni. In tutte le applicazioni di campo della MNCV in cui è stato usato l'intervento di "massa", il gruppo d'animali è stato trattato come un "unico grande individuo".

I vantaggi della MNCV, a parità di risultati con la MC, sono riconducibili alla minor o assente tossicità delle cure impiegate, all'assenza di residui negli alimenti prodotti, all'assenza dell'impatto ambientale derivato da l'inquinamento zootecnico attraverso i secreti e gli escreti dei soggetti trattati con farmaci tradizionali e infine a costi generalmente più contenuti della MC, dovuti anche al miglioramento delle condizioni sanitarie (omeostasi) degli animali. Come nella MC, anche nella MNCV il ruolo del Veterinario risulta importante ed insostituibile quale unico professionista in grado di poter formulare una corretta diagnosi, prescrivere un'adeguata terapia e valutare i risultati anche in relazione agli aspetti che coinvolgono direttamente ed indirettamente la salute umana. Se tutto questo è basilare nell'allevamento convenzionale, lo diventa ancora di più nell'allevamento zootecnico condotto con metodo biologico. Purtroppo in veterinaria, a tutto oggi, mancano ancora: l'approvazione di una Farmacopea ufficiale omeopatica, il riconoscimento ufficiale delle numerose e valide Scuole della MNCV e l'insegnamento ufficiale della MNCV nelle Università italiane. Fortunatamente sono in aumento i corsi ed il numero dei veterinari che li frequentano e si diplomano nelle varie branche della stessa.

In assenza di cifre ufficiali di quanti, degli oltre 21.000 veterinari operanti in Italia, usino la MNCV, si può stimare che oltre 1000 siano gli esperti coinvolti a pieno titolo nella MNCV, ma sono tantissimi ( $\pm 5.000$ ) quelli che abbinano le due medicine e questo numero è in crescente aumento, tanto che molti prevedono che supererà l'80% dell'intera forza nei prossimi 10 anni. Attualmente sono oltre 5000 i rimedi e le preparazioni a disposizione del veterinario operante nella MNCV prodotti e distribuiti da circa 20 aziende. (Stima dei veterinari esperti e non esperti al 31/12/2005)

### **1.5.1.1. Le origini e la storia dell'omeopatia**

L'Omeopatia ha origini che si perdono nella notte dei tempi, il concetto di curare con i simili era presente nella più antica medicina conosciuta, la Ayurvedica indiana, ma anche in tante altre medicine primitive e non solo orientali. L'Omeopatia classica, d'altra parte, è molto più vicina anche alla concezione orientale di malattia, che a quella occidentale. Infatti, mentre la medicina occidentale ha una concezione "meccanicista" per cui la malattia è dovuta al malfunzionamento di una delle parti del corpo, per l'omeopatia la salute è dovuta ad un equilibrio dell'energia vitale e la malattia al suo squilibrarsi. La causa quindi della malattia è sempre interna, e sull'interno si deve agire per arrivare alla guarigione e per fare questo, l'omeopatia utilizza i "rimedi energetici". La dottrina omeopatica, come la conosciamo oggi, è il frutto delle ricerche e del lavoro del medico tedesco Christian Samuel Hahnemann (1755-1843), medico classico del suo tempo che utilizzava quello che allora la medicina metteva a disposizione: purganti, salassi e fitopreparati. Si racconta che insoddisfatto da questi sistemi ad un certo punto cominciò a pensare e ricercare nuovi metodi più efficaci di cura. Durante un'epidemia di febbri malariche, verificò che la china (chinino) ad alti dosaggi provocava nell'individuo sano uno stato febbrile simile a quello provocato dalla malaria. Hahnemann iniziò quindi ad elaborare la sua teoria che "i simili potevano curare i simili" e cominciò a sperimentare su se stesso, sui propri familiari ed amici questo metodo. I positivi risultati ottenuti lo spinsero a verificare la sua teoria su altri farmaci utilizzati dalla medicina dell'epoca quali belladonna, arsenico ed altri, produssero gli stessi risultati: i farmaci usati curavano gli stessi sintomi che producevano. Chiamò "omeopatici" questi farmaci o, più esattamente, rimedi, in contrapposizione agli "allopatrici" (cioè non omeopatici) che determinano effetti diversi dalla malattia. Il medico tedesco descrisse nell'Organon, il grande libro della Scuola Omeopatica, pubblicato nel 1810, i principi della sua filosofia sulla salute, la malattia e la cura, nonché le direttive per la sua applicazione pratica, queste ultime furono ampliate e raccolte nella Materia Medica Omeopatica registrando i sintomi provocati dai rimedi sull'organismo del soggetto sano ed elencati in ordine di importanza e nel Repertorio Omeopatico dove vengono riportati i sintomi ordinati per importanza, ed accanto a loro i rimedi corrispondenti. Repertorio di Kent J.T. (1877). In ogni caso e nonostante gli attacchi e l'esplicita condanna della classe medica imperante, il "metodo omeopatico" di Hahnemann si diffuse ben presto in Europa; prima in Germania, poi in Austria e subito dopo in Italia, successivamente in Francia, Inghilterra, Asia e nelle Americhe. In Italia fu introdotto dai medici al seguito delle truppe austriache chiamate, nel 1821, dal Re Ferdinando I a seguito delle sommosse avvenute nel suo regno partenopeo. Fu il dott. Necker di Melnik che più degli altri contribuì alla diffusione dell'omeopatia in Italia. Egli aprì a Napoli un dispensario che

richiamò altri medici e servì a formare un importante nucleo di riferimento per la formazione degli artefici della storia dell'omeopatia napoletana. Fra questi primeggiarono: Cosmo de Horatis, Giuseppe Mauro e Francesco Romani, noto quest'ultimo per essere stato anche il medico di Maria Amalia di Borbone, figlia di Re Ferdinando IV. Il notevole sostegno dei Borboni non fu, comunque, sufficiente a rendere gli esordi (1822-1830) meno difficili. Tuttavia, nonostante le difficoltà iniziali, l'omeopatia si diffuse attraverso la penisola e gli anni, dal 1830 al 1860, segnarono la sua massima diffusione e splendore. Nel suo libro "Storia dell'omeopatia in Italia" (XCX), il dott. Lodispoto riferisce che, nel 1834, in Italia operavano almeno cinquecento medici omeopati, un numero ragguardevole per quei tempi. L'omeopatia ebbe, nello stesso periodo, notevole successo nello Stato Vaticano, dove molti Papi, meno condizionati dalle teorie mediche ufficiali, la preferirono per la cura delle loro persone. In oltre 200 anni di storia dell'omeopatia si sono prodotte diverse scuole della stessa, distinte soprattutto da diverse concezioni sulla somministrazione dei rimedi. Le principali sono: l'unicista, la pluralista e la complessista. L'unicista è basata sull'affermazione di Hahnemann: "nel corso di qualsiasi trattamento mirante alla guarigione non è in alcun caso necessario, anzi è addirittura inammissibile, servirsi per un malato di più di una sostanza semplice medicinale alla volta". L'unicismo è quindi il metodo classico, che fu sviluppato da molti famosi suoi seguaci, in particolare da J. T. Kent (JJY).

#### 1.5.1.2. Principi

I principi dell'omeopatia si possono riassumere in sette:

1. La legge della similitudine (*Similia similibus curentur*)
2. Il principio dell'energia vitale o dinamismo vitale (*dynamis*)
3. Il principio della dose minima
4. Il principio della "*Vis medicatrix naturae*" o "*Natura morborum medicatrix*"
5. Il principio della sperimentazione pura
6. Il principio dei miasmi
7. Il principio di individualizzazione, che prescrive l'uso del rimedio 'il più simile', per la terapia e la vera guarigione del paziente.

Il termine rimedio in omeopatia è strettamente legato all'applicazione della "legge della similitudine", enunciato fondamentale di tutto il lavoro di Hahnemann. Infatti, l'omeopatia consiste nel curare le malattie somministrando la sostanza o le sostanze che provocano, su soggetti sani, sintomi, segni e lesioni simili a quelli osservati nella malattia, quindi "*similia similibus curentur*": "i simili possono essere curati dai simili". Questi rimedi possono risultare tossici se somministrati a dosi ponderali, ma diventano sempre più potenti ed agiscono sempre più in profondità quando somministrati a piccole dosi. La legge dei simili è del tutto opposta a quella dei contrari "*contraria contrariis curentur*": "I contrari possono curare i contrari", su cui si fonda la medicina allopatica. Infatti, questa usa l'antipiretico contro la febbre, l'antidolorifico per il dolore, ecc. Il medicinale allopatico si pone contro la malattia, al contrario, il rimedio omeopatico si allea con la "forza o energia vitale" del malato e lo guida nella guarigione, in altre parole ne stimola la reazione e la risposta fino al

ripristino dell'equilibrio. Un altro principio fondamentale è quello che riguarda appunto l'equilibrio dell'energia vitale. L'energia vitale o "dinamismo vitale" è l'energia che possiede ogni essere vivente e che assicura la sua permanenza e la sua conservazione. Questa si basa su un continuo flusso attraverso modificazioni che si instaurano in risposta a particolari stimoli. Qualsiasi reazione umana provoca in realtà una modificazione dell'energia vitale che si estende al "territorio" e si manifesta attraverso dei sintomi. Così ogni malattia non è altro che uno squilibrio dell'energia vitale su piani diversi coinvolgente tutto il "territorio umano" della persona, non malattie comuni a tutti gli uomini, ma malati con sintomi comuni". Se l'"energia vitale" tende a "squilibrarsi" occorre intervenire con gli opportuni rimedi. E sempre a proposito di energia, Hahnemann ebbe un'altra geniale intuizione, quella di "caricare" d'energia il rimedio attraverso processi di "potenziazione", che comprendono la "diluizione" del rimedio e la sua "dinamizzazione". Questi sistemi vengono in genere indicati con delle sigle, alcune risalenti ad Hahnemann stesso (DH, CH, LM), altre introdotte successivamente (K, flusso continuo). La lettera C sta per centesimale e H per Hahnemann. Il medico tedesco, per realizzare le CH, da noi normalmente più utilizzate, partendo da "tinture madri" (TM: diluizioni 1:10) di piante, minerali finemente tritati, prodotti chimici, materiale organico umano ed animale, preparò una serie di "diluizioni" progressive di una parte di soluto, in cento parti in volume di solvente (in genere acqua ed alcool). Hahnemann ripeté progressivamente le diluizioni, sempre 1 a 100, che chiamò 2 CH, 3 CH, 4 CH, ecc. Per esempio, 5 CH (quinta centesimale) sta a significare che la diluizione 1 a 100 del solvente nel soluto, è stata ripetuta 5 volte. Ad ogni diluizione il contenitore, obbligatoriamente di vetro e nuovo, veniva sottoposto ad agitazione manuale, mediante 100 forti scosse ("dinamizzazione") battendo il recipiente su una superficie dura ed elastica. La sostanza viene dunque attivata attraverso lo scuotimento della sua diluizione ad ogni passaggio. L'insieme di diluizione e dinamizzazione producono la "potenziazione del rimedio", il rimedio diventa cioè un rimedio energetico, capace di agire sull'energia vitale e di guarire. Il medico tedesco dettò anche le norme della somministrazione dei rimedi, norme che sono valide ancor oggi. Molti scienziati, ricercatori, medici e tanti altri ritengono che le numerose diluizioni, decimali (DH) o centesimali (CH), dei principi attivi contenuti nel rimedio finiscano per trasformarlo in acqua fresca. Naturalmente le critiche mosse al principio dell'infinitesimalità si basano sulla legge di Avogadro (1776-1856) per cui oltre la 12 CH ( $10^{-24}$ ), in teoria, della sostanza originaria non dovrebbe rimanere alcuna traccia. I sostenitori dell'Omeopatia asseriscono invece che l'acqua, l'alcol o il lattosio in cui è stato sciolto e diluito il principio attivo grazie al processo di "potenziazione", ne mantengono il ricordo o meglio l'impronta. Proprio questa ultima sarebbe la vera responsabile del riequilibrio della "energia vitale" e della successiva guarigione. Secondo la "teoria dell'acqua", divenuta famosa per un articolo pubblicato nel 1988 su Nature (XeX) dall'immunologo francese Bienveniste, questa si comporterebbe come un polimero ed assumerebbe la forma della sostanza in essa disciolta, conservandone la memoria. Essendo l'acqua, l'unica molecola in grado di passare attraverso tutte le membrane cellulari in quanto l'acqua "modificata" porterebbe all'interno della cellula dei segnali biochimici di cui ha bisogno. La "teoria dell'acqua" suscita ancora oggi opposte reazioni con molti sostenitori, ma anche oppositori.



E' basilare ricordare inoltre che Hahnemann definì l'Uomo un "tutto unico" dove le sue variabili ereditarie, anatomiche, fisiologiche e psichiche concorrono in egual misura alla formazione del suo "terreno umano". Il terreno può essere "sano" o "ammalato". Fanno parte del "terreno sano" la sua eredità morfologica e costituzionale (Costituzione), il suo metabolismo fisiologico (Temperamento) e la facilità di sviluppare un tipo di malattia piuttosto che un altro (Tipo sensibile). Fanno parte del "terreno ammalato" cioè dell'uomo ammalato, soprattutto come espressione delle patologie croniche e talvolta anche delle malattie acute, le "diatesi" o "miasmi" o "malattie croniche" come le chiamava Hahnemann. Le diatesi, distinte in *Psora*, *Sicosi* e *Sifilide* o *Sifilis*, non sono altro che l'espressione di un disordine della "forza o energia vitale" che ogni essere vivente possiede. E' importante ricordare che le malattie vanno viste in funzione delle "diatesi" o "miasmi" e che questo concetto, assieme al principio di similitudine, al principio dell'infinitesimalità e della potentizzazione dei rimedi, rappresentano la base della terapia omeopatica e punti di netta divergenza dalla medicina occidentale.

## **1.5.2. Omeopatia in veterinaria**

### **1.5.2.1. Le applicazioni in medicina veterinaria**

L'idea era che come il simile poteva curare il simile (Omeopatia), così avrebbe potuto fare l'uguale e quindi applicare le stesse leggi e regole di Hahnemann, perché ritenute universali, agli animali. Da allora sia in Europa, sia in America, i seguaci dell'Omeopatia veterinaria continuarono a moltiplicarsi estendendo la sua applicazione a tutte le specie animali d'interesse zootecnico e non. Dopo circa un secolo (dal 1830-1840 al 1932-1938) di grand'espansione l'omeopatia veterinaria ebbe un rapido decremento con l'immissione sul mercato dei sulfamidici prima (1932) e degli antibiotici dopo (1943). Ma, a partire dal 1970, l'Omeopatia veterinaria registra nuovamente una notevole ripresa in tutta Europa, soprattutto nel campo degli animali da compagnia, ma anche in quelli da reddito in concomitanza dello svilupparsi, a partire dagli anni '90, dell'allevamento con metodo biologico. Sono molti gli allevamenti, non solo "biologici", che utilizzano unicamente l'omeopatia nella cura degli animali, dal momento che i rimedi non prevedono tempi di sospensione ed il costo globale della terapia è generalmente inferiore a quello della MC, soprattutto se sono usati rimedi omeopatici unitari con costi che non risultano superiori a quelli del veterinario aziendale che persegue la MVC.

La variabile più importante resta sempre il "terreno animale" (sia come singolo animale sia come gruppo unico e uniforme d'animali allevati allo stesso modo e nello stesso ambiente) va sempre vista "unita" al proprietario/allevatore/conduuttore, capace d'influenzare, se non addirittura condizionare, la diagnosi e l'applicazione del rimedio. Anche la variabile "ambiente" diviene è importante per le sue implicazioni nel condizionare le modalità d'allevamento e tenuta degli animali (inquinamento del terreno, dell'aria, dell'acqua, contaminazione dei pascoli e delle colture, ecc.). Ultima, fra le più importanti, è la scelta del rimedio e della potenza a cui somministrarlo, la certezza della sua giusta somministrazione e la verifica dei risultati.

### 1.5.2.2. I miasmi: Psora, Sicosi e Sifilide

Il termine “diatesi” o “miasmi” è uno dei principi su cui si fonda l’omeopatia. Affrontare questo argomento in chiave veterinaria non è semplice. Il medico tedesco, osservando i favorevoli risultati dell’alte diluizioni nella terapia di forme morbose croniche notò che quasi sempre alla guarigione della prima patologia ne affiorava un’altra, curata questa ne affiorava un’altra ancora e quindi doveva intervenire con nuovi rimedi. Dopo ripetuti studi e sperimentazioni Hahnemann, venne alla conclusione che l’eliminazione di patologie evidenti mettevano in luce altre nascoste nel profondo, da qui la teoria dei citati miasmi: Psora, Sicosi e Sifilis. I tre termini stanno a classificare tre differenti stati morbosi del terreno, cioè 3 differenti stadi di squilibrio dell’energia vitale, che affioreranno nel corso della vita del paziente sotto la spinta di fattori diversi.

- La Psora, considerata la diatesi primaria, lo squilibrio primario dell’energia, con cui tutti i viventi nascono, è una reazione ipotonica o secondo altri una diatesi linfatica in cui si evidenzia uno stato di riduzione o annullamento delle difese di fronte ad aggressioni esterne ed interne. L’animale psorico, non essendo in grado di eliminare le scorie del processo di autointossicazione cui è andato incontro per squilibri alimentari, dismetaboliche, riduzione delle difese immunitarie, parassitosi interne ed esterne, ecc., mostra forme di lesioni soprattutto epiteliali quali: stomatiti, podoflemmatiti, dermatiti, ma anche a carico degli organi escretori: gastrite, enteriti, nefriti, ecc.
- La Sifilis, squilibrio dell’energia in senso autodistruttivo, viene definita una reazione distruttiva o miasma distruttivo che accompagna la caduta delle difese. In genere dallo stato di Psora, si passa alla Sifilis. Possono rientrare in questo contesto alcune infezioni in cui è ammessa la trasmissione congenita con lesioni fetali, le malattie caratterizzate da ulcerazioni della cute e delle mucose, intossicazioni e avvelenamenti da metalli pesanti, pesticidi, ecc.
- La Sicosi che è uno squilibrio delle Psora in senso iperergico, è definita una reazione iperergica o secondo altri una diatesi litiemica. In pratica trattasi di un sovraccarico dell’organismo che risponde esageratamente a pulsioni interne ed esterne di varia natura che lo hanno intossicato (trattamenti prolungati con antibiotici, cortisone, diuretici, ormoni, antiparassitari, vaccinazioni ripetute, ecc.). La risposta più frequente dell’organismo animale è la tendenza ad immagazzinarli in neoformazioni della cute (verruche, polipi, conditomi, cisti e tumori). Molte di queste espressioni psicotiche sono legate all’età e si manifestano maggiormente negli animali vecchi che non nei giovani specie se di interesse zootecnico e destinati al macello.

### 1.5.2.3. Costituzioni

Le costituzioni rappresentano il “terreno animale” assieme al temperamento, al tipo sensibile ed ai miasmi, di cui abbiamo già parlato. Il temperamento dell’animale (sanguigno, linfatico, nervoso, ecc.), legato ai fattori ambiente, salute, tipo d’allevamento, età, ecc. “appartiene” soprattutto all’allevatore, proprietario o conduttore del o degli animali, ma la sua conoscenza può aiutare l’omeopata. Il tipo

sensibile e le costituzioni “appartengono” al veterinario omeopata e la loro conoscenza può aiutarlo a decifrare la predisposizione alle diverse malattie.

Alcuni veterinari omeopati si chiedono quale valore pratico possa avere oggi il riferimento all’aspetto costituzionale del “terreno animale” e se le quattro costituzioni di base (normolinea o sulfurea, brevilinea o carbonica, longilinea o fosforica e distrofica o fluorica) rivestano lo stesso significato dato da Hahnemann per il “terreno umano” dove l’aspetto psico somatico ed il comportamento neuro psicologico rappresentano una valenza di enorme importanza.

#### 1.5.2.4. Preparazioni e modalità di somministrazione del rimedio

Innanzitutto occorre distinguere i principi o le sostanze di partenza in due categorie: sostanze solubili in alcol o acqua e quelle insolubili, poiché la preparazione della sostanza base da diluire e dinamizzare è differente.

- nel caso di vegetali e prodotti animali si procede alla preparazione di “tinture madri” propriamente dette, facendoli macerare, in contenitori di vetro o d’acciaio inossidabile, in alcol puro a 70° per almeno tre settimane. Importante è la loro concentrazione, 1 a 10 per le tinture madri d’origine vegetale e 1 a 20 (sempre in peso) per quelle d’origine animale.

- nel caso di sostanze insolubili (anche metalli) si procede alla loro triturazione in mortaio, in forma finissima, mescolandole con lattosio nel rapporto 1/100. Effettuate altre due successive diluizioni 1/100, sempre in lattosio, la “sostanza base” (3 CH) è pronta per essere diluita in alcol o acqua distillata.

Le successive diluizioni, vuoi delle “tinture madri” vuoi delle “sostanze base” (3 CH) saranno effettuate, sempre utilizzando contenitori di vetro o d’acciaio inossidabile, in acqua distillata o alcol puro a 70°. Ogni diluizione è accompagnata dal processo di dinamizzazione che, ricordiamo, consiste nel sottoporre la sostanza a 100 energetiche scosse.

L’etichetta dei rimedi indicherà, col nome latino, la sostanza di partenza (base) e il numero delle diluizioni decimali (DH) o centesimali (CH). Per esempio, 5 DH sta a significare la “potenza”, cioè che la sostanza è stata diluita e dinamizzata cinque volte nel rapporto 1/10 e quindi trattasi di una diluizione a  $10^{-5}$ , come pure, 6 CH significa che la sostanza base è stata diluita e dinamizzata sei volte nel rapporto 1/100, parliamo di  $10^{-12}$ :

- da 1 CH fino alla 5 CH sono considerate basse,
- da 7 CH fino alla 30 CH sono considerate medie,
- dalla 200 CH in poi sono considerate elevate.

Le diluizioni che trovano maggior impiego in terapia veterinaria sono le basse e medie potenze che hanno un’azione più esterna, e superficiale: 3 DH, 6 DH, 4 CH, 5 CH, 7 CH, 9 CH, 12 CH, 15 CH, 30 CH. Molti veterinari però, più legati all’Omeopatia Classica, usano normalmente anche alte o altissime potenze 200 CH.

Preparazioni possono essere in piccole sfere (globuli) di lattosio impregnati del rimedio, normalmente contenute in un tubetto-dosatore in cui circa 200 sfere rappresentano grammo di rimedio, oppure in granuli o grani, sempre di lattosio, dieci

volte più grosse dei globuli, contenuti in tubi in ragione di circa 80 granuli ciascuno, sono le più comuni e utilizzate per l'omeopatia umana. Esistono anche presentazioni in gocce il cui eccipiente è generalmente alcol a 30°, sempre da versare direttamente in bocca oppure previa diluizione in poca acqua minerale "naturale" (non gassata), come pure presentazioni in polvere, soprattutto per le preparazioni base non solubili ed impiegate a bassissime e basse diluizioni ed infine presentazioni in fiale per uso orale, supposte, ecc. Nel trattamento di gruppi omogenei di animali da reddito il rimedio prescelto si somministra, generalmente, per via idrica, aerosol o sparso sopra il mangime.

La frequenza delle somministrazioni dipende dal tipo di malattia, dalla sensibilità individuale e dalla potenza utilizzata. Le basse potenze in genere agiscono rapidamente, ma per breve periodo. Le alte potenze agiscono più profondamente e più a lungo, quindi devono essere ripetute anche dopo diversi giorni. Certamente, mentre per una persona od un pet ci si può pensare a somministrazioni ripetute anche più volte al giorno, per gli animali da reddito, soprattutto se allevati in grossi gruppi, bisogna cercare di limitare le somministrazioni. La difficoltà sta nel fatto che le alte potenze, che possono essere somministrate anche a distanza di diversi giorni, perché funzionino, presuppongono una scelta molto accurata del rimedio, mentre le basse potenze hanno un'azione spesso più "generica". Sul numero dei rimedi influisce invece la cultura e la propensione dell'omeopata, il professionista infatti, può essere "unicista" o "pluralista".

#### **1.5.2.5. Profilassi**

"Con la somministrazione di opportuni rimedi omeopatici, scelti caso per caso, il terreno organico dei singoli individui deve essere posto in grado di raggiungere 'condizioni ottimali di massimo equilibrio vitale' e, pertanto, in condizione di essere poco o per niente recettivo all'azione patogena di virus, batteri, parassiti, ecc. In una parola, gli individui così trattati, pervenendo ad un "optimum di energia vitale" e, a parità di condizioni ereditarie-ambientali (clima, alimentazione, ecc.) con altri non sottoposti a trattamenti omeopatici, dimostrano una notevole resistenza ed una scarsa recettività alle malattie". Chiaramente, questo tipo di "scelte" di sostanze omeopatiche farmacologicamente attive, debbono essere fatte da un veterinario omeopata ben preparato ed esperto.

Sono in corso studi e prove per verificare l'efficacia degli Isoterapici e dei Nosodi. L'Isoterapico è fornito dallo stesso paziente sia questo muco, saliva, sangue, orina, feci ecc., risulta quindi un "uguale" e non un "simile" come nell'omeopatia classica. Il suo impiego si potrebbe accomunare con l'azione del siero e dell'autovaccino, mentre il Nosode è un rimedio preparato con ceppi microbici o virali standard responsabili della malattia che si vuol prevenire, in questo caso la sua azione potrebbe essere assimilabile a quella di un vaccino, ma in realtà il principio non è basato sull'immunità, ma sul fatto che si presuppone che i sintomi di questo rimedio "coprano" e prevengano nel soggetto trattato l'eventuale infezione.

### 1.5.3. I rimedi omeopatici utilizzati in apicoltura

In apicoltura non sono molti i rimedi utilizzati. Tra i rimedi che sono stati utilizzati si riscontra Sulphur, il Nosode di *Varroa destructor* e Calcarea Sulphurica.

#### 1.5.3.1. Sulphur

È stato utilizzato contro la *Varroa destructor* nella sperimentazione dell'Università Autónoma di Chapingo del Messico (Ruiz *et al.*, 2003 e 2004). Sulphur che è uno dei principali policresti (rimedio omeopatico ad ampia azione). La sua diatesi è psorica ed è un rimedio adatto a tutte le costituzioni, ma soprattutto a quella sulfurica. Il temperamento è sanguigno. Il rimedio omeopatico si ottiene dalla triturazione con alcool puro di cristalli di zolfo ridotti in polvere, successivamente portati ad ebollizione, filtrati e sottoposti a diluizioni/dinamizzazioni in soluzione idroalcolica. Il soggetto Sulphur è un auto-intossicato, in quanto, risultando alterato il metabolismo dello zolfo, non riesce ad espellere naturalmente le tossine prodotte nell'organismo, che in condizioni normali vengono espulse tramite gli organi emuntori quali reni, fegato, polmoni e pelle. In presenza di tale anomalia risulta compromessa la normale attività fisiologica ed i sintomi sono quelli tipici dell'intossicazione generale in cui l'organismo si trova. Tutti i sintomi tendono alla cronicità e questa è una delle caratteristiche chiave del rimedio. Pertanto il soggetto Sulphur può presentare tipicamente problemi di insufficienza renale, infezioni delle vie urinarie, epatomegalia (fegato ingrossato), stasi a livello della vena porta (è la grossa vena che convoglia nel fegato il sangue proveniente dalla milza e dalla porzione sottodiaframmatica del tubo digerente) con congestione epatica ed emorroidi, stasi della vena cava inferiore (è la grossa vena che drena verso il cuore il sangue che ritorna dalla metà inferiore del corpo) con varici alle gambe, adeniti acute e croniche (infiammazione dei linfonodi), suppurazione dei tessuti, eretismo cardio-circolatorio, ipertensione, problemi digestivi, patologie respiratorie. Ma il vero punto debole di Sulphur è la pelle, che com'è noto è una delle principali vie di eliminazione delle tossine ed alla quale arrivano, nello stato di intossicazione generale in cui si trova il soggetto, tutti i rifiuti e le sostanze tossiche non eliminate altrove. La pelle pertanto si presenta malsana, secca, rugosa, raggrinzita e dominata da varie affezioni con eruzioni ed eczemi, oltre che da una sudorazione abbondante e fetida. L'odore sgradevole delle escrezioni è una delle caratteristiche di Sulphur, riconducibile a tutti i composti solforati, quali il solfuro d'idrogeno (H<sub>2</sub>S). Proprio perché l'intossicazione è lenta anche la sintomatologia è a decorso lento e graduale, per cui ogni patologia compare lentamente ed altrettanto lentamente scompare. Considerato inoltre che lo zolfo brucia, anche Sulphur brucia, per cui il soggetto ha sensazioni di bruciore sulla pelle e sulle mucose (bocca, intestino, ecc.), il sudore è bruciante (e maleodorante), le secrezioni sono brucianti, ha vampate di calore, le piante dei piedi a letto bruciano e questo è un altro sintomo caratteristico e peculiare del rimedio. Di giorno il soggetto diventa termicamente instabile, per cui una parte del corpo (testa) si fa calda ed un'altra si fa fredda (mani e piedi). In Sulphur sono frequenti le cosiddette alternanze morbose tra varie patologie, come tra quelle cutanee, respiratorie, venose, muscolo-scheletriche o gastrointestinali, per cui ad esempio eczema, asma, emorroidi, cefalea, reumatismo o diarrea si alternano tra di loro, nel senso che scompare l'una e compare l'altra, in genere con una periodicità di 7 o 8 giorni. Il Sulphur omeopatico agisce

aumentando i processi di eliminazione delle tossine prodotte dall'organismo, accumulatesi eccessivamente, come abbiamo visto, per un'alterazione del metabolismo dello zolfo, al punto tale da determinare progressivamente uno stato di intossicazione generale. In questo modo Sulphur elimina, depura, purifica. E' questa in sintesi la semplice chiave di lettura del rimedio. Sulphur è il "netturbino", l'operatore ecologico dell'organismo che spazza via i rifiuti tossici mantenendo pulite tutte le strutture cellulari. Sulphur quindi «fa uscire» le tossine, per cui il rimedio agisce secondo una "tendenza centrifuga", cioè dall'interno all'esterno dell'organismo. Tutti i sintomi peggiorano al caldo umido, in un letto troppo caldo ma anche al clima troppo freddo. Migliorano al caldo secco, all'aria aperta, con il sudore. Il rimedio omeopatico Sulphur si usa nei seguenti principali casi, quando i sintomi corrispondono e si associano alle caratteristiche del rimedio descritte in precedenza.

Pelle: Pelle secca, raggrinzita, screpolata, squamosa. Sudorazione maleodorante. Eruzioni cutanee di ogni tipo, fenomeni suppurativi e prurito intenso. Foruncoli. Acne. Esantema e malattie esantematiche. Eczema. Orticaria. Herpes. Erisipela. Verruche callose. Pitiriasi. Ulcere pruriginose e fistolose. Piaghe. Ecchimosi. Apparato digerente: Afte. Alito fetido e lingua con patina biancastra. Dispepsia di ogni genere. Congestione epatica per stasi della circolazione portale. Fegato ingrossato. Gonfiore addominale. Alterazione dei processi assimilativi e di disintossicazione. Diarrea, specie mattutina, alternata a stipsi. Infiammazione all'ano con prurito, bruciore e dolore. Apparato cardiovascolare: Congestioni localizzate venose e arteriose. Stasi venose. Vampate di calore. Eretismo cardio-circolatorio. Aterosclerosi. Ipertensione arteriosa. Varici. Emorroidi. Sistema linfatico. Ipertrofia e infiammazione dei linfonodi. Apparato urinario. Infezioni delle vie urinarie. Pollachiuria. Tenesmo vescicale. Ritenzione urinaria. Apparato respiratorio: Rinofaringite acuta o cronica. Rinite allergica. Rinorrea acquosa e irritante. Tosse spasmodica. Asma con attacchi soprattutto notturni. Sistema nervoso: Apatia mentale. Lieve depressione ciclica. Tendenza a svegliarsi tardi al mattino. Sonnolenza diurna spesso associata a insonnia notturna. Vertigini. Cefalea nevralgica di tipo congestivo. Apparato genitale femminile: possibile dismenorrea, con ciclo mestruale irregolare ed intermittente. Disturbi della menopausa. Apparato genitale maschile: possibile prostatite. Ipertrofia prostatica in età adulta. Orecchio: otite con otorrea purulenta. Parotite. Prurito all'orecchio esterno. Escoriazione dietro le orecchie. Occhio: oftalmie brucianti. Congiuntiviti e lacrimazione, legate anche allo stato allergico. Prurito, solletico e bruciore alle palpebre. Orzaiolo. Apparato Mucoloso-scheletrico: lombalgie e sacralgie. Reumatismi. Crampi muscolari. Bruciore alle piante dei piedi. (www.rimediomeopatici.com).

### 1.5.3.2. Nosode di *Varroa destructor*

Riguardo il nosode di *varroa destructor* ci sono studi dell'Università Autónoma di Chapingo del Messico. La nosodoterapia, creata da C. Hering, si basa sull'utilizzo di sostanze trattate omeopaticamente e ricavate da parti del corpo o da prodotti metabolici dell'uomo e degli animali, o da microrganismi, o da virus, o dalle loro secrezioni, inattivate per non renderle infette o virulente. Essa si compone di una

autonosoterapia basata sul principio dell'isopatia (sostanze provenienti dal malato stesso) e di una eteronosoterapia che si avvale di sostanze fornite dalla stessa malattia del malato ma non dallo stesso malato. Anche per la terapia con nosodi vale, nella scelta del nosode da prescrivere, il principio del simile piuttosto che quello dell'uguale ("simillima non aequalia", Hering). I nosodi sono indicati nella terapia della costituzione e della diatesi, oltre che negli stati di autosommazione e nei casi di disposizione integrate. Nella terapia antiomotossica essi trovano il loro utilizzo nelle malattie delle fasi cellulari, nelle fasi inibite, retossiche, nelle malattie autoimmuni, nelle "malattie psoriche" di Hahnemann, nelle malattie allergiche (Julian), in tutti i casi di processi settici cronicizzati ed in tutte quelle affezioni in cui i rischi di eventuali complicazioni siano particolarmente accentuati. Un loro ulteriore utilizzo è al termine della malattia, in quanto sono in grado di facilitare la completa eliminazione tossinica ed anche "i residui di agenti patogeni con focolai di infezioni latenti e colonie di agenti non più patogeni (Merger). I nosodi sono anche definiti farmaci della costituzione, in quanto il loro campo di azione interessa l'organismo in toto, rappresentano il quid mancante allo svolgersi delle catene di reazione che permettono il regolare funzionamento delle funzioni fisiologiche dell'organismo per cui, in alcuni casi, la risoluzione di un quadro morboso può avvenire soltanto se si instaura una terapia nosodica appropriata. La scelta di un nosode può basarsi (secondo Allendy/Fortier Bornoville/Martiny) su una: Somiglianza sintomatica che segue il principio della legge fondamentale del simile; Somiglianza anamnesticca eziologica pregressa: anche questa basata sul principio di somiglianza; Somiglianza eziologica attuale: si basa sul principio di somiglianza eziologica del momento; Somiglianza eziologica secondo l'anamnesi recente: Merger afferma «Dopo che la malattia è stata superata, i nosodi sono farmaci eccellenti per eliminare definitivamente le tossine depositate nel mesenchima»; in base a questo principio è opportuno somministrare nosodi degli agenti eziologici dell'affezione clinicamente guarita. Riguardo alle potenze, dosaggio e forma, i nosodi OTI (Omeo Tossicologici Italia) possono essere preparati in scalare progressivo normale con diluizioni alla 4CH - 9CH - 30CH, in scalare progressivo forte con diluizioni alla 30CH 200CH MCH e inoltre a potenze singole basse o a potenze singole alte nelle classiche forme di gocce, granuli e fiale orali.

(<http://medicinaturale.pro/prodottioti/medicinaturale/omeopatia/CLASSIFICAZIONEdeicomponenti/NOSODOTERAPIA.htm>).

### **1.5.3.3. Calcarea Sulphurica**

Calcarea Sulphurica rappresenta uno dei rimedi omeopatici maggiormente diffusi ed utilizzati nella cura di diverse patologie sia in medicina che in veterinaria. Calcarea Sulphurica appartiene ai cosiddetti Sali di Schuessler. I sali di Schuessler sono 12 sali minerali identificati da W. H. Schuessler e definiti "preparati funzionali", in quanto ognuno di essi eserciterebbe un' influenza specifica sulle diverse funzioni. La teoria di Schuessler si basa sul fatto che la struttura e la vitalità degli organi del corpo umano dipendono da una quantità necessaria e da una composizione appropriata dei costituenti organici. Se si analizzano gli elementi che restano dopo combustione dei tessuti, si trovano dei costituenti inorganici che costituiscono il vero materiale di base



dei tessuti e che sono essenziali all'integrità di strutture e di funzione dei tessuti stessi. Secondo Schuessler le malattie si determinano quando si crea una deficienza nella quantità indispensabile di questi costituenti inorganici e si può riottenere l'equilibrio con la somministrazione adeguata dei sali minerali carenti. Calcarea Sulphurica è stata utilizzata in apicoltura sia come rimedio omeopatico a se stante (la nostra sperimentazione) e come prodotto omeodinamico della Ditta Omeonatus, Apeas plus, (soluzione idro-alcolica contenente Calcarea Sulphurica) dall'Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria, Sezione di Apicoltura, Roma (Persano Oddo and Marinelli, 2002).

La Calcarea Sulphurica secondo il manuale "Homeopathic Materia Medica" by Boericke presenta i seguenti sintomi: (Sulphate of Lime-Plaster of Paris) Eczema and torpid glandular swellings. Cystic tumors. Fibroids. Suppurative processes come within the range of this remedy, after pus has found a vent. Mucous discharges are yellow, thick and lumpy. Lupus vulgaris. Head: Scald-head of children, if there be purulent discharge, or yellow, purulent crusts. Eyes: Inflammation of the eyes, with discharge of thick, yellow matter. Sees only one-half an object. Cornea smoky. Ophthalmia neonatorum. Ears: Deafness, with discharge of matter from the middle ear, sometimes mixed with blood. Pimples around ear. Nose: Cold in the head, with thick, yellowish, purulent secretion, frequently tinged with blood. One-sided discharge from nose. Yellowish discharge from posterior nares. Edges of nostrils sore. Face: Pimples and pustules on the face. Herpes. Mouth: Inside of lips sore. Tongue flabby, resembling a layer of dried clay. Sour, soapy, acrid taste. Yellow coating at base. Throat. Last stage of ulcerated sore throat, with discharge of yellow matter. Suppurating stage of tonsillitis, when abscess is discharging. Abdomen: Pain in region of liver, in right side of pelvis, followed by weakness, nausea, and pain in stomach. Stool: Purulent diarrhoea mixed with blood. Diarrhoea after maple sugar and from change of weather. Pus-like, slimy discharge from the bowels. Painful abscesses about the anus in cases of fistula. Female: Menses late, long-lasting, with headache, twitching great weakness. Respiratory: Cough, with purulent and sanious sputa and hectic fever. Empyema, pus forming in the lungs or pleural cavities. Purulent, sanious expectoration. Catarrh, with thick, lumpy, white-yellow or pus-like secretion. Extremities: Burning-itching of soles of feet. Fever: Hectic fever, caused by formation of pus. With cough and burning in soles. Skin: Cuts, wounds, bruises, etc., unhealthy, discharging pus; they do not heal readily. Yellow, purulent crusts or discharge. Purulent exudations in or upon the skin. Skin affections with yellowish scabs. Many little matterless pimples under the hair, bleeding when scratched. Dry eczema in children. Relationship: Compare: Hepar; Silica. Dose: Second and third trituration. The twelfth potency has been found effective in Lupus. ([www.vithoukas.com/books\\_study/onlinemateriamedica/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2315](http://www.vithoukas.com/books_study/onlinemateriamedica/index.php?option=com_content&view=article&id=2315)).

#### 1.5.3.4. Scelta ed efficacia del rimedio omeopatico: sintomi e letteratura

Per quanto riguarda i sintomi non è stato semplice decidere quale rimedio omeopatico fosse il più adeguato per rafforzare la forza della famiglia. In base ai

sintomi che la *Calcarea Sulphurica* presentava rispetto la pelle sopra citati e considerando che la varroa è un parassita che in qualche modo affetta il tegumento dell'ape si è ritenuto il rimedio più adatto fosse la *Calcarea Sulphurica*.

Riguardo la letteratura, non sono stati trovati molti lavori sull'omeopatia e in particolare con il rimedio scelto e le api. Il ricorso alla medicina non convenzionale è relativamente diffuso in veterinaria per animali di grossa taglia quali bovini, suini e ovicaprini (Bellavite e Signorini 1993, Canello 1995), mentre in apicoltura il settore delle terapie omeopatiche è stato oggetto unicamente di prove sporadiche (Prigli 2000) o scarsamente documentate. Gli unici studi sono un lavoro svolto dall'Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria, Sezione di Apicoltura, Roma (Persano Oddo e Marinelli, Impiego di prodotti omeopatici nella lotta contro *Varroa destructor* Anderson & Trueman, 2002) e dei lavori dell'Università Autónoma di Chapingo del Messico (Ruiz Espinoza and Guerrero Salinas 2003, 2004. Control homeopático del ácaro (*varroa destructor oud.*) en abejas, Fase I e fase II). Di seguito riportiamo in breve i lavori trovati in letteratura.

Nel lavoro svolto dai ricercatori dell'Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria hanno verificato l'efficacia, per il controllo dell'infestazione da *Varroa destructor* Anderson & Treuman, di alcuni prodotti della medicina alternativa reperibili in Italia. Le sperimentazioni sono state condotte su 3 formulati:

1. Eureka, prodotto omeodinamico ad effetto pro-ape e antivarroa fornito da "L'albero della vita", Associazione per le discipline eco-compatibili (composizione non comunicata);
2. Apeas plus, prodotto omeodinamico della Ditta Omeonatus (soluzione idro-alcolica contenente *Calcarea sulphurica*);
3. Apedin Vapor, prodotto dall'Istituto Fitofarmaceutico Euganeo (soluzione idro-alcolica contenente lattosio, *Echinacea*, *Spiraea*, *Thuja*, *Acetosella*).

Per ciascun prodotto le prove hanno avuto la durata di circa due anni e hanno interessato da 10 a 25 famiglie, omogenee per consistenza e livello di infestazione iniziali, dotate di regine giovani e poste in arnie con fondo antivarroa. Controlli periodici venivano effettuati per accertare la caduta naturale delle varroe, la consistenza delle famiglie e la produttività. Anche se per un giudizio definitivo sarebbe stato necessario replicare le sperimentazioni, sulla base dei risultati raggiunti è stato concluso che i prodotti testati, da soli, oltre a richiedere talora un notevole impegno per l'apicoltore, a causa dei numerosi trattamenti da effettuare nel corso dell'anno, non sono in grado di controllare la parassitosi: le famiglie hanno mostrato per i primi mesi un andamento normale, ma l'infestazione, non contenuta a sufficienza dai trattamenti effettuati è progressivamente aumentata, impedendo alle colonie di riprendere un regolare sviluppo nella stagione successiva. I risultati hanno evidenziato che i tre prodotti testati hanno un'efficacia del tutto insoddisfacente e non sono in grado di controllare la parassitosi.

Il lavoro svolto nell'Università del Messico ha come obiettivo generale quello di incidere in maniera preventiva e curativa il controllo dell'acaro delle api (*Varroa destructor Oud*) e dei danni generati su di esse, approfittando dell'innocuità dell'effetto del rimedio per produrre miele senza contaminazioni tossiche. Il lavoro si

è sviluppato in tre anni e nella prima fase il primo anno (2003) si sono applicati i trattamenti:

1. Sulphur 202 CH. Per la preparazione omeopatica si usa lo zolfo chimicamente puro triturandolo con zucchero del latte (lattosio). Alcuni sintomi sono relazionati ai problemi della pelle, per la soppressione delle eruzioni locali, per stimolare la reazione dell'organismo, per alleviare il bruciore e il prurito degli orifizi del corpo, per emicranie con febbre e piedi freddi, per diarrea che si aggravava la mattina, etc.
2. Nosode dell'acaro varroa 202 CH. I nosodi si utilizzano tanto che per gli umani che per gli animali. Il loro uso è cominciato in agricoltura con i fitonosodi che si elaborano a partire dalla secrezione di quello che genera il problema di salute, siano essi patogeni come virus, batteri o funghi compresi quindi anche gli acari.
3. Controllo arnie senza trattamento.

Questi tre trattamenti sono stati applicati a 4 alveari e ripetuti. Sono state utilizzate dinamizzazioni commerciali di Sulphur 202 CH e nel caso nel Nosode della Varroa è stata preparata la tintura madre fino a 202 CH e per le dinamizzazioni si sono utilizzati i globuli di lattosio interi di numero 40 usati per la terapia umana. I globuli impregnati con la dinamizzazione sono stati lasciati dentro l'alveare nel nutritoire nel numero di 25 globuli per ogni ripetizione. Nel controllo non sono stati messi i globuli. Si è anche asperso l'alveare con il solito rimedio trattando con il solito preparato però nella misura di 10 gocce della dinamizzazione liquida in 400 ml di acqua. La valutazione è stata fatta in ogni apiario dopo 24 ore di ogni trattamento con il rimedio si è contata la varroa caduta sul fondo cosparso di vasellina. I risultati preliminari ottenuti indicano che esiste un'incidenza nel controllo dell'acaro (*Varroa destructor* Oud.) dove si una caduta maggiore negli alveari trattati con Nosode e per quanto riguarda Sulphur inferiore rispetto al controllo. Una spiegazione dell'incremento degli acari negli alveari trattati con Nosode si deve a una maggior espulsione dell'acaro dovuta a una maggiore di pulizia dell'ape dove il trattamento con il Nosode dello stesso acaro disturba di più rispetto al controllo. Invece, la caduta delle varroa è risultata minore nel trattamento con Sulphur, potrebbe essere un preventivo, che potrebbe inibire il trasporto dell'acaro all'arnia visto che l'acaro da solo senza il vettore ape non può arrivare alle covate dove si sviluppa. Nel primo anno di prova in base ai risultati incoraggianti dove con il Nosode di varroa ha avuto un incremento di caduta del 187% rispetto al controllo, cosa che non è stata riscontrata nel trattamento con Sulphur che non ha contribuito nell'eliminazione della varroa, sembra che il Nosode che potrebbe essere una possibile alternativa per il controllo della varroa così che nell'anno successivo, nel 2004 si è continuato con la sperimentazione applicando settimanalmente l'agronosode di *Varroa destructor*, per sei mesi, elaborato con il metodo della triturazione con valutazione finale ogni mese: il trattamento è stato Agronosode dell'acaro Varroa 202 CH e controllo. Ripetuto 5 volte. Negli alveari con i trattamenti con il rimedio contro la varroa si è avuto un decremento di caduta e nel controllo si è avuto un aumento della caduta. La comparazione delle cadute tra nosode e controllo mostra che nel primo diminuisce mentre aumenta nelle arnie di controllo. Quindi l'agronosode di *varroa destructor* influisce nell'alveare tendendo a far diminuire caduta degli acari. Uno dei vantaggi

più importanti è che l'applicazione dell'agronosode non è tossico ne contaminante per qualsiasi organismo vivente. In Italia la produzione dei Nosodi deve essere effettuata in Officine farmaceutiche che si avvalgono di adeguate procedure operative convalidate, nonché di locali ed attrezzature autorizzati e controllati dalle Autorità Sanitarie. E una volta preparato il rimedio questo deve essere autorizzato dal Ministero della Salute per la sperimentazione su animali che producono alimenti per l'uomo quindi questo potrebbe essere uno problema per poterlo utilizzare legalmente.

Un altro lavoro riguarda una tesi sull'applicazione delle dinamizzazioni omeopatiche dell'agronosode e di prodotto chimici utilizzati per il controllo della varroa nelle api, riscontrando che l'applicazione del prodotto omeopatico per il controllo della varroa può essere benefico, dovuto alla riduzione della popolazione dell'acaro nelle colonie trattate. Queste presentano un diminuzione del 23,11% quanto riguarda le arnie trattate con il Nosode della varroa. Il numero di telaini di covata si è ridotto dopo l'applicazione (aspersione) del prodotto omeopatico (Calderón, 2008).

## 2. OBIETTIVO DELLA TESI SPERIMENTALE

L'apicoltura occupa un ruolo importante nel settore agricolo e negli ultimi anni sta avendo un notevole incremento, sia a livello nazionale che internazionale. Come è ben noto a tutti le api sono insetti molto importanti, sia per i loro molteplici prodotti che per la loro attività di impollinazione e di indicatore ambientale straordinariamente sensibile.

La sua abbondante presenza sta a indicare una condizione ambientale non contaminata, mentre, la sua scomparsa ci deve far pensare ad una situazione di possibile rischio. "Se l'ape scomparisse dalla faccia della terra, all'uomo non resterebbero che quattro anni di vita", qualcuno attribuisce la frase ad Albert Einstein, altri dicono che non sia mai stata pronunciata da Einstein, ogni volta che si parla di api viene riportata la famosa frase. Purtroppo da anni questo settore è colpito da diversi problemi sanitari. Le patologie insieme a una mala gestione dell'apiario, una quantità sempre maggiore di fitofarmaci utilizzati in agricoltura e le fonti di alimentazione sempre minori e inquinate fanno sì che l'ape sia sempre più in pericolo. Questo ovviamente porta a spopolamenti dell'alveare e morie delle api, con un'inevitabile perdita economica da parte di tutti gli apicoltori, biologici e non. Una delle possibili strategie per ovviare a questi problemi è mantenere le famiglie forti e con un basso livello di patologie, in modo che api possono rispondere meglio agli attacchi esterni e ammalarsi di meno.

Questo è possibile tramite l'utilizzo di un adeguato sistema di allevamento e gestione dell'alveare, che rispetti il benessere dell'animale e che aumenti la forza della famiglia. Questo si può attuare, e sempre più adottato dagli apicoltori, anche tramite l'allevamento biologico delle api. Infatti, rispettando le normative che il Regolamento detta si può ottenere un miglioramento del benessere dell'animale e limitando l'uso di sostanze di origine sintetica per il trattamento delle principali malattie dell'alveare si privilegia l'utilizzo di medicine alternative come la fitoterapia e l'omeopatia. Da qui nasce la possibilità di integrare l'omeopatia con altri tipi di trattamento per risolvere i problemi di salute delle api per ottenere un alimento sano. L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di testare l'efficacia del rimedio omeopatico *Calcarea Sulphurica* 200 CH per il rafforzamento della resistenza di famiglie di api nei confronti delle più comuni patologie. Tali famiglie sono state anche sottoposte a blocco di covata e trattamento con Api-bioxal per il controllo della varroasi, metodi consentiti dal regolamento del biologico.

### 3. MATERIALI E METODI

La sperimentazione ha una durata di due anni da Aprile 2011 ad Aprile 2013. È stata divisa in due anni di prove. Il primo anno è stato testato il rimedio omeopatico su un apiario e il secondo anno per comprovare i risultati ottenuti e l'effetto del rimedio la prova è stata ripetuta su un altro apiario situato nella stessa aerea (Figura 37).



Figura 37. Foto aerea google map apiari

#### 3.1. Ubicazione e protocollo

La prima sperimentazione è stata effettuata su 20 arnie appartenenti a un apiario, sito nelle colline fiorentine, nel comune di Bagno a Ripoli vicino a Grassina (Figura 38). Le famiglie scelte sono state suddivise in modo completamente casuale (*at random*) in due gruppi sperimentali (Figura 39). Nella suddivisione si è cercato di mantenere l'omogeneità della consistenza e del livello di infestazione iniziale per tutti e due i gruppi. In entrambi le regine erano marcate e avevano un anno di età. Al primo gruppo, composto da 10 famiglie, è stato somministrato il rimedio omeopatico Calcarea Sulphurica 200 CH, mentre alle restanti 10 (di controllo) solo acqua. Le arnie sono state numerate e contrassegnate in base al trattamento eseguito C (Calcarea Sulphurica 200 CH) e A (Acqua).





Figura 38. Apiario Grassina

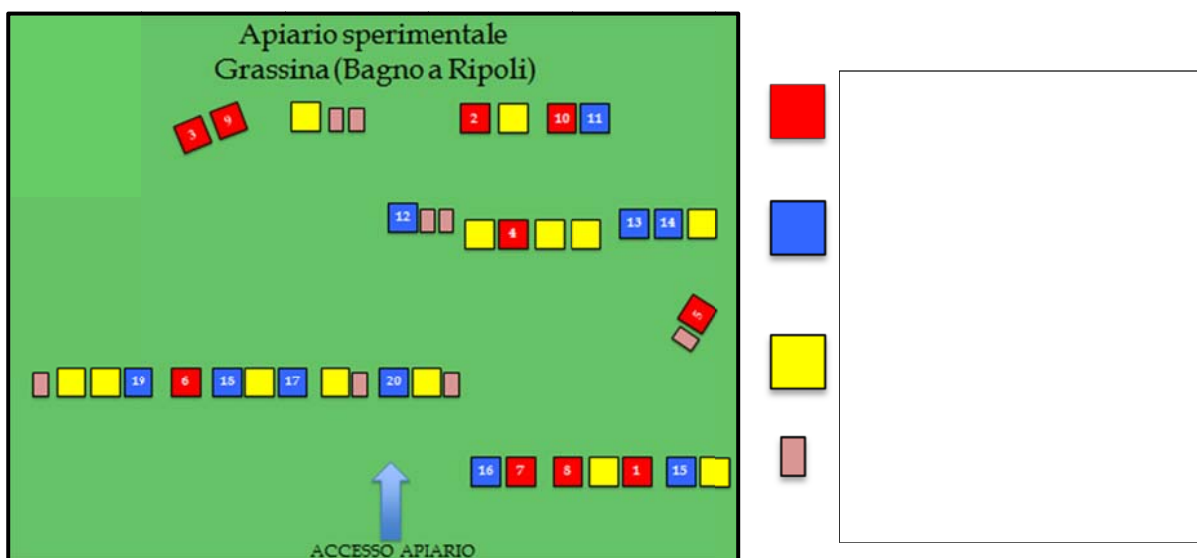


Figura 39. Disposizione arnie prima prova

Nella seconda prova abbiamo cambiato ubicazione all'apiario, è stato situato nella stessa zona, ma in un appezzamento diverso, sito sempre nel comune di Bagno a Ripoli in località Capannuccia (Figura 40).



Figura 40. Apiario Capannuccia



Per evitare il più possibile la variabilità tra le arnie, questa volta siamo partiti da pacchi di api, provenienti dallo stesso apiario e con regine sorelle e marcate (Figura 41). Abbiamo effettuato un punto zero prima di dividere i due gruppi sperimentali, valutando la forza dell'alveare (api e covata) e la presenza della varroa sugli adulti. Inoltre di ogni arnia abbiamo fotografato la regina per avere un dato iniziale ancora più preciso.



Figura 41. Regine

In base ai dati così ottenuti (Tabella 12) abbiamo diviso i due gruppi sperimentali in modo che fossero più omogenei ed equilibrati possibili (Figura 42).

Tabella 12. Dati punto zero seconda prova

N° campione	N° varroa adulti	Api totali	Covata totale	N° telaini	Gruppo
11	0	1750	750	4	A
18	3,07692308	6750	3250	7	A
13	0	2750	3500	6	A
19	1,52671756	9000	5500	7	A
10	0	7000	6000	7	A
7	1,44927536	11250	6250	7	A
2	0	9000	6500	7	A
17	0	11000	8000	7	A
1	1,11731844	10500	8500	7	A
12	0	12750	9500	7	A
<b>TOTALE</b>	<b>0,71702344</b>	<b>8175</b>	<b>5775</b>		
14	0	8000	2250	6	C
5	0	3750	3000	7	C
20	4,1025641	5750	3500	9	C
4	0	6000	5500	7	C
16	0	10500	5750	7	C
3	1,2345679	7000	6250	7	C
9	3,14136126	10000	6500	7	C
15	0	10500	7500	7	C
6	0	11500	8500	7	C
8	0	13000	9750	7	C
<b>TOTALE</b>	<b>0,84784933</b>	<b>8600</b>	<b>5850</b>		

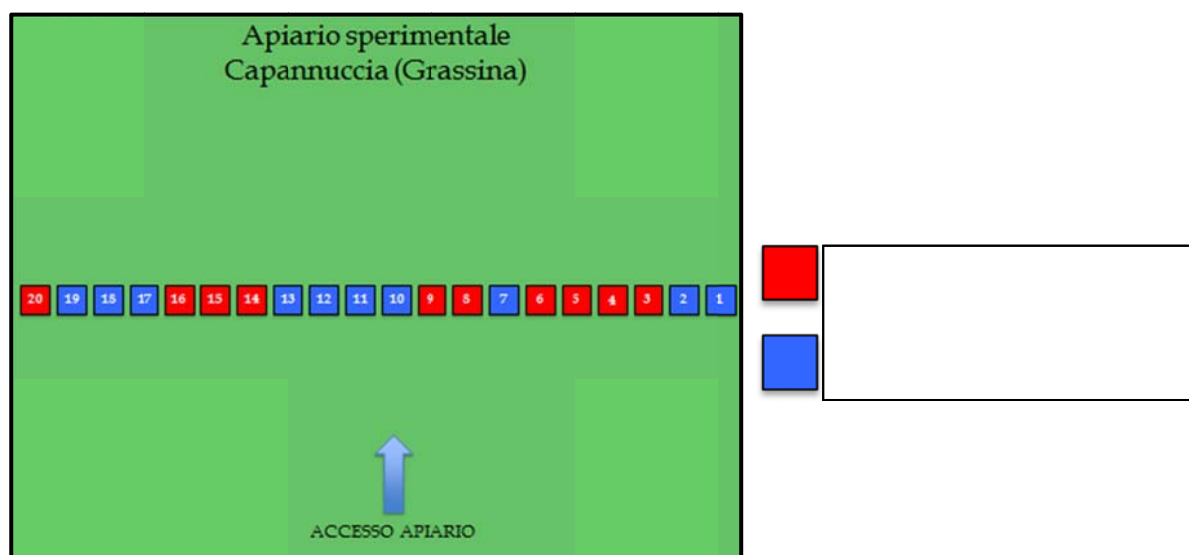


Figura 42. Disposizione arnie seconda prova

È stato redatto un protocollo da seguire per tutte e due le prove. Questo indica il tipo di campionamento e quale trattamento è stato effettuato. Sono stati campionati la *Varroa destructor* per caduta naturale e tramite la conta su api adulte, *Nosema spp.*,

virus, peso dell'alveare, forza dell'alveare e produzione di miele. I trattamenti eseguiti sono stati il rimedio omeopatico Calcarea Sulphurica 200 CH sulle 10 selezionate e su tutte le 20 arnie in sperimentazione il blocco di covata e l'Api-bioxal. Ogni operazione svolta sulle arnie è stata registrata e successivamente trascritta su un foglio Excel. Per fare questo sono state redatte tre diverse tipologie di schede portate in apiario. La prima (Allegato 1) è servita per descrivere la colonia ogniqualvolta eseguivamo le diverse operazioni. La scheda riporta: la data della visita, la presenza o meno di regina e fuchi, di celle reali, di api malate, di covata, la docilità della famiglia, insomma tutte le informazioni utili per esprimere un giudizio complessivo sullo stato di salute della famiglia. La seconda scheda (Allegato 2), invece, riporta i vari trattamenti che sono stati eseguiti (con Calcarea Sulphurica 200 CH, Api-bioxal e blocco di covata), il numero di varroe cadute dopo tali interventi e quelle trovate sugli adulti. Infine, i dati relativi alla valutazione della forza dell'alveare, sono stati registrati nella scheda 3 (Allegato 3).

Di seguito (Tabella 13) sono riportati i protocolli redatti all'inizio di ogni prova che riassumano le operazioni da eseguire. Purtroppo non tutti i campionamenti previsti sono stati effettuati, per causa del particolare andamento climatico che ha portato a volte all'impossibilità di poter arrivare in apiario o aprire le arnie per prelevare i campioni senza compromettere l'incolumità delle api.

**Tabella 13. Protocollo prima prova**

	CAMPIONAMENTO					TRATTAMENTI			
	Varroa		Nosema	Virus	Forza Alveare	Calcarea S.	Api-bioxal	Blocco Covata	Peso nido
	Caduta naturale	Conta adulti							
APR 11	x	x	x	x	x	x			x
MAG 11						x			
GIU 11	x	x	x	x		x			
LUG 11	x	x	x	x	x	x		x	x
AGO 11	x					x	x		
SET 11	x	x				x			
OTT 11									
NOV11	x	x	x	x	x	x			x
DIC 11									
GEN 12						x			
FEB 12									
MAR 12						x			
APR 12	x	x	x	x	x	x			

In aprile 2011 (20 aprile) è stato fatto il primo campionamento completo, prendendo i campioni di api per la conta della varroa sugli adulti, per il Nosema e i virus; è stata effettuata la conta della varroa per caduta naturale; è stata valutata la forza

dell'alveare e pesate le arnie. In aggiunta è stato fatto il trattamento con il rimedio omeopatico. In maggio 2011 (27 maggio), è stato ripetuto il trattamento con il rimedio omeopatico. In giugno 2011 (24 giugno), è stata ripetuta la Calcarea Sulphurica 200 CH, sono stati campionati la varroa con i due metodi, prelevate le api per le analisi di Nosema e virus e valutata la forza dell'alveare. In luglio 2011 (15 luglio), sono stati campionati di nuovo tutti i parametri, come all'inizio della prova e in aggiunta si è effettuato il blocco di covata. In agosto 2011 (05 agosto) è stato effettuato lo sblocco della regina e fatto il trattamento con Api-bioxal e valutata la caduta naturale della varroa dopo il trattamento. In settembre 2011 (21 settembre), abbiamo fatto il trattamento con il rimedio omeopatico e contato la caduta naturale della varroa. In novembre 2011 (17 novembre), è stato effettuato il trattamento invernale contro la varroa e inoltre sono stati campionati Nosema, virus e caduta della varroa naturale e pesate le arnie. Infine in aprile 2012 (19 aprile) è stato ripetuto il campionamento completo per concludere un anno intero di osservazione e ricerca sull'apiario.

**Tabella 14. Protocollo seconda prova.**

	TRATTAMENTI			VARROA		CAMPIONAMENTI			PESO	
	C. S.	Api-bioxal	Blocco Covata	Caduta naturale	Su adulti	Virus	Nosema	Forza	Nido	Melari
APR 12	X			X	X	X	X	X	X	
MAG 12										
GIU 12	X			X	X					
LUG 12			X	X	X					
AGO 12		X		X	X					
SET 12										
OTT 12	X			X	X	X	X	X	X	
NOV 12		X		X						
DIC 12	X			X	X					
GEN 13										
FEB 13	X			X						
MAR 13										
APR 13	X			X	X	X	X	X	X	

Il secondo anno i campionamenti sono iniziati un po' in ritardo a giugno 2012 (14 giugno) con il campionamento completo. A luglio 2012 (27 luglio) è stato effettuato il blocco di covata e in agosto 2012 (20 agosto) il trattamento con l'Api-bioxal. I primi giorni di novembre 2012 (02 novembre), per difficoltà legate al meteo, non è stato possibile effettuare il campionamento in ottobre, è stato di nuovo effettuato il campionamento completo e di seguito nei giorni successivi (08 novembre) è stato fatto il trattamento invernale con Api-bioxal perché le arnie erano già in blocco naturale. I trattamenti con il rimedio omeopatico sono stati somministrati nei mesi di

giugno 2012 (14 giugno), all'inizio della prova, poi a luglio 2012 (16 luglio) prima del blocco di covata, in settembre 2012 (22 settembre) e poi a novembre 2012 (02 novembre) prima di fare il trattamento invernale con l'acido ossalico.

Per problemi dovuti all'estremo caldo e assenza di pioggia avuta nei mesi primaverili-estivi del 2012, abbiamo dovuto cambiare metodo per la conta della varroa per caduta naturale. L'eccessiva siccità portava le api a cercare una fonte di cibo o acqua che poteva essere a loro di sostegno e per curiosità andavano a visitare i fondi cosparsi di grasso di vasellina disciolto e ritornavano nell'arnia. Visitando gli alveari, abbiamo rinvenuto diverse api "nere" (Figura 43), che erano interamente cosparse di vasellina e che avevano difficoltà nel volare e nel compiere le proprie attività, quindi abbiamo deciso di porre nei cassettoni sotto i fondi antivarroa dei fogli adesivi plastificati.



Figura 43. Api nere

## 3.2. Trattamenti

### 3.2.1. Calcarea Sulphurica 200 CH

Per quanto riguarda la sperimentazione in questione la scelta del rimedio omeopatico Calcarea Sulphurica 200 CH si è basata sui sintomi e sulla letteratura. Parlare di sintomi per le api risulta alquanto difficile, sia perché si tratta di un unico sistema-famiglia composto da migliaia di individui, sia perché trasporre i sintomi studiati sull'uomo, ad un insetto è davvero un lavoro difficile. Per quanto riguarda la scelta della potenza, cioè 200 CH, questa è stata una decisione presa dal Prof. Andrea Martini veterinario omeopata, che da anni, si occupa della salvaguardia del benessere degli animali e l'utilizzo di medicina non convenzionale nella loro cura siano questi da allevamento o da compagnia, ritenendolo più un rimedio di fondo piuttosto che organico. In particolare tale rimedio è indicato in caso di presenza di sintomi legati alla pelle precedentemente descritti. Per questo, la varroa essendo un acaro che sta attaccato al corpo dell'ape per la quasi totalità della sua vita, la scelta di tale rimedio è stata presa anche con lo scopo di rafforzare il tegumento stesso del



corpo dell'ape. Riguardo alla letteratura, gli unici sono un lavoro svolto dall'Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria, Sezione di Apicoltura, Roma (Persano Oddo e Marinelli, 2002) e dei lavori dell'Università Autónoma di Chapingo del Messico (Ruiz Espinoza and Guerrero Salinas 2003, 2004).

I trattamenti eseguiti con Calcearea Sulphurica 200 CH e con acqua, nella prima prova sono stati effettuati da aprile 2011 a settembre, tutti i mesi, una volta al mese e successivamente ad intervalli di tempo regolari e in base alla possibilità di aprire e bagnare le api; mentre per la seconda prova sono stati effettuati a giugno 2012, all'inizio della prova, luglio, settembre e novembre.

La Calcearea Sulphurica 200 CH sotto forma di globuli monodose era della ditta farmaceutica Boiron. Una monodose è stata disciolta interamente in mezzo litro di acqua minerale, trasferita in uno spruzzino e spruzzata nel numero di 20 volte sul lato superiore dei telaini del nido di ciascuna arnia. Lo stesso è stato fatto per il gruppo di controllo però solo con l'acqua minerale (Figura 44).



Figura 44. Calcearea Sulphurica, acqua minerale e aspersioni per il trattamento con il rimedio

### 3.2.2. Blocco di covata e Api-bioxal

#### 3.2.2.1. Blocco di covata

Nel mese di luglio in tutte e due le prove (15 luglio 2011; 27 luglio 2012) è stato eseguito il blocco di covata a tutte le arnie. Questo consiste nel racchiudere temporaneamente la regina in una gabbietta di legno dove vi rimane per 21 giorni, posizionata all'interno del nido (Figura 45). Questo permette di interrompere la deposizione delle uova da parte della regina. In questo modo tutta la covata deposta sfarfalla, le celle sono tutte aperte e si riesce così a colpire tutte le varroe della colonia che inevitabilmente si trovano solo sulle api adulte. Il blocco di covata provoca anche da solo una consistente caduta di varroe.



Figura 45. Blocco di covata

### 3.2.2.2. Api-bioxal

Al termine del periodo del blocco di covata (5 agosto 2011; 20 agosto 2012) a tutte le arnie è stato somministrato l'Api-bioxal in forma gocciolata. Tale trattamento viene associato al blocco di covata perché insieme hanno un'efficienza molto elevata (Figura 46).



Figura 46. Trattamento Api-bioxal



### 3.2.2.2.1. Registrazione acido ossalico (Api-bioxal)

Riguardo all'acido ossalico, che si può utilizzare come tale solo in apicoltura biologica (dato che era citato specificatamente nel Regolamento), il nuovo formulato Api-Bioxal (Figura 47) ad azione acaricida ha finalmente ottenuto la cosiddetta "AIC", ovvero l'autorizzazione all'immissione in commercio come medicinale per uso veterinario. E' quanto stabilito dal Decreto n. 60, dell'8 giugno 2011, entrato in vigore il 25 giugno 2011, data della sua pubblicazione sulla Gazzetta Ufficiale n. 145 della Repubblica Italiana. Titolare dell'autorizzazione è la ditta Chemicals Laif s.r.l. con sede in Vigonza (Padova). Il decreto in questione stabilisce che il prodotto sarà disponibile in diverse confezioni: buste termosaldate da 35, 175 e 350 grammi di prodotto contenente acido ossalico biidrato ed eccipienti per il trattamento della varroasi (*Varroa destructor*, parassita di *Apis mellifera*). Il prodotto non presenta alcuna tossicità per il miele, tanto che il decreto ne fissa un tempo di attesa a "zero giorni". Il medicinale ha un periodo di validità di due anni, che si riduce a tre mesi dopo la prima apertura della confezione. Il regime di dispensazione, infine, prevede che l'Api-Bioxal dovrà essere venduto soltanto dietro prescrizione di ricetta medica veterinaria, non ripetibile, in copia unica. Tale procedura è stata in vigore fino al 4 gennaio 2012, data in cui il farmaco può essere liberamente dispensato fuori dal circuito farmaceutico e senza l'obbligo di ricetta medico-veterinaria. Lo stabilisce il Provvedimento n. 298 del 2 dicembre 2011 del Ministero della Salute, pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale n. 2 del 3 gennaio 2012. Ogni qual volta debbano essere somministrati medicinali veterinari, occorre annotare in modo chiaro e dichiarare all'autorità o all'organismo di controllo, prima che i prodotti siano commercializzati con la denominazione biologica, il tipo di prodotto somministrato (indicando anche i principi attivi in esso contenuti), i particolari della diagnosi, la posologia, le modalità di somministrazione, la durata del trattamento e il periodo di sospensione previsto per legge.



Figura 47. Api-bioxal

L'Api-bioxal è ben tollerato dalle api, è ammesso in apicoltura biologica ed è di semplice preparazione somministrazione. Le varroe sono uccise da soluzioni acide e quella prodotta dall'acido ossalico è la più acida rispetto agli altri acidi organici che si possono utilizzare per il controllo della varroa. La soluzione di acido ossalico al 4,2%

ha un pH di 0,9 ma può disidratarsi velocemente dentro l'alveare dando origine a cristalli, che possono essere velocemente rimossi dalle api e quindi perdere il potere acaricida (Nanetti e Stradi, 1999). Il pH più alto prodotto dall'acido ossalico in soluzione acquosa è il motivo che lo rende maggiormente efficace rispetto ad acidi più deboli (ac. Lattico, ac. Citrico) (Nanetti e Stradi, 1999). L'acido ossalico utilizzato è il prodotto Api-bioxal registrato dalla ditta Chemicals Laif che ha come principio attivo l'acido ossalico biidrato (100 g di prodotto contengono 88,60 g di acido ossalico e q.b. a 100 g di eccipiente). La soluzione deve essere preparata con il contenuto di una busta da 35g di Api-Bioxal sciolto completamente il contenuto nel quantitativo di 500 ml di sciroppo (acqua e saccarosio in rapporto 1:1). Il trattamento deve essere eseguito in unica somministrazione, gocciolando con una siringa la soluzione sui favi, trasversalmente alla loro direzione, alla dose di 5 ml per favo occupato dalle api (Nanetti e Stradi, 1997). In novembre (11 novembre 2011; 08 novembre 2012) è stato fatto di nuovo il trattamento invernale con acido ossalico, per abbassare l'infestazione prima del riposo invernale naturale delle api, anche questo è stato somministrato per gocciolamento e preparato e somministrato nel solito modo di quello estivo. L'unica attenzione da tenere nel caso del trattamento invernale è quella della temperatura, la quale non deve essere troppo bassa (sotto i 10-12 °C), sotto la quale è altamente sconsigliato di aprire le arnie e quindi avere l'accortezza di fare il trattamento nelle ore più calde della giornata stando attenti all'andamento climatico.

### **3.3. Campionamenti e monitoraggio**

#### **3.3.1. Varroa**

Il monitoraggio per avere una stima dell'infestazione della varroa è stato effettuato attraverso due diversi metodi: la conta della caduta naturale e la conta degli acari su api adulte. I due metodi sono stati scelti in base alla letteratura (Progetto Stranova 2007-2009; Amsler T., Schmid L, 2011), a lavori effettuati in collaborazione con il dott. Nanetti del CRA Api ( Tesi Paolo Piazza e Angela Rovida 2004) e anche per poter comprovare l'efficacia dei due diversi sistemi di conta. Normalmente nei lavori sui diversi trattamenti da utilizzare contro la varroa, si compara la caduta naturale con l'infestazione reale misurata trattando le famiglie con acaricidi che facciano cadere tutte le varroe (es. Cumaphos, Fluvalinate).

Nel nostro caso, non è stato possibile trattare gli animali con questi prodotti, dato che sono proibiti in apicoltura biologica, e comunque potevano influenzare negativamente l'azione del rimedio omeopatico e l'andamento della prova.

Per quanto riguarda la caduta naturale della varroa, dopo ciascun trattamento abbiamo provveduto a contare le varroe cadute sul fondo per 21 giorni ad intervalli di 3 giorni, in modo da avere un dato sull'andamento della caduta, utilizzando un raschiatore metallico (Figura 48). Il fondo di ciascuna arnia è stato cosparso con del grasso di vasellina, in modo che via via che le varroe cadevano vi rimanessero attaccate e per evitare anche che formiche, pioggia o altri fattori esterni, portandole via, falsassero il dato. La conta è stata fatta procedendo da un'estremità del fondo

molto lentamente verso l'altra, visto la presenza di sporcizia che poteva alterarne il risultato.

Il monitoraggio della varroa per ogni rilievo è stato di 21 giorni. Alla fine di ogni rilievo è stata calcolata la caduta naturale media giornaliera che è data dalla somma della varroa caduta ogni tre giorni per tutto il periodo diviso i giorni (21 gg) per il quale è stato fatto il rilievo.



Figura 48. Conta varroa caduta naturale

Il secondo metodo di monitoraggio della varroa è stato la conta su api adulte. Per fare questo abbiamo preso un campione di api da un telaino che presenta covata nei vari stadi, le abbiamo raccolte in dei barattoli di vetro e portati in laboratorio. Qui, le abbiamo lavate con del detergente liquido concentrato (sapone per piatti), e tramite colino rivestito da un tessuto, abbiamo contato le varroe residue (Figura 49).



Figura 49. Conta varroa su api adulte

Data l'impossibilità di prendere in campo, un campione uniforme per numero di api, una volta lavate, abbiamo contato il numero d'individui per campione e riportato a 200, mediante un semplice calcolo, in modo da avere un dato medio per tutte le arnie (Figura 50). Infatti, un numero di 10 varroe su 200 api (5%) corrisponde a circa 1000 acari all'interno dell'alveare (Fonte: ARPAT 2007).



Figura 50. Conta varroe su api adulte

### 3.3.2. Forza dell'alveare

Un altro parametro considerato è la forza dell'alveare. Per forza dell'alveare si intende l'insieme della popolazione adulta, delle covate e delle scorte di miele e polline. Un metodo per la valutazione in campo dell'entità della popolazione della covata e delle scorte è quello dei sestini: (Accorti 1985; Marchetti 1985). l'area di un telaino da nido viene suddivisa, idealmente, in sei rettangoli uguali (Figura 51). L'apicoltore, in base alla sua esperienza, valuta quanti sono i sestini occupati dalle api e dalla covata per ciascun telaino. Il punto difficile della valutazione si identifica con l'abilità dell'apicoltore di stimare, in campo, il numero di api presenti in ogni sestino, considerando che le api si muovono di continuo e che la loro distribuzione sul favo è del tutto casuale. Tale valutazione risulta, per questo alquanto difficile e altamente soggettiva. Nel nostro caso la stima è stata eseguita sempre dalla stessa persona, l'apicoltore stesso. Il numero di api è stato calcolato considerando innanzitutto il numero di sestini occupati dalle api di tutti i telaini appartenenti alla stessa arnia, sia del melario che della cassa in modo da calcolare il numero totale di api presenti nella colonia, poi tale valore è stato moltiplicato per 250 (numero di api che in media sta in un sestino), in modo da avere un'idea sul numero di api che compone la famiglia in esame. Per la covata si esegue lo stesso calcolo, solo che il valore trovato viene moltiplicato nuovamente per un fattore di riduzione di 0.53 (Accorti 1985; Marchetti 1985).

$N^{\circ} \text{ api} = n^{\circ} \text{ sestini totali occupati dalle api} \times 250$

$N^{\circ} \text{ covata} = n^{\circ} \text{ sestini occupati dalla covata} \times 250 \times 0.53$





Figura 51. Metodo dei sest

### 3.3.3. Peso delle arnie e produzione di miele

Un altro parametro che abbiamo misurato per una valutazione della famiglia è stata la produttività. Questa è stata misurata attraverso la pesatura del nido, e quella del melario, che abbiamo effettuato nella prima prova ad aprile, a luglio e novembre del 2011. Purtroppo non è stato possibile effettuare la pesatura finale di aprile 2012 (Figura 52). Mentre per la seconda prova è stata effettuata in giugno e novembre. La pesatura dei nidi è stata alquanto complicata. Ci siamo dovuti recare in apiario nel tardo pomeriggio o nelle prime ore della mattina, in modo che le api fossero tutte all'interno in modo da poter chiudere temporaneamente le porticine delle casse, per lavorare senza essere infastiditi. Ovviamente ciascuna operazione è stata compiuta con la massima delicatezza, onde evitare problemi alle famiglie. Inoltre, data l'inesistenza di un sistema di facile utilizzo, che fosse trasportabile in campo, leggero e che consentisse una lettura del peso in decimali, ci siamo creati un sistema ad hoc. Il peso è stato misurato per mezzo di un dinamometro attaccato, mediante moschettone, ad un palo di ferro e a delle cinghie da sollevamento all'interno delle quali abbiamo inserito l'arnia. Quindi, sollevando il palo, e quindi l'arnia da terra, è stato possibile fare la lettura del peso. Questo procedimento è stato ripetuto per le 20 arnie. Per la pesatura dei melari abbiamo utilizzato lo stesso strumento, quando è stato possibile pesarli in campo e pesati prima che fossero portati via per essere smielati (Figura 53), mentre quando non è stato possibile farlo in campo sono stati pesati in magazzino prima della smielatura. Il valore di produttività è stato quindi calcolato a partire dal peso del melario pieno, al quale, una volta smielato, abbiamo sottratto la media del peso di 7 melari vuoti, in modo da avere solo il valore del quantitativo di miele prodotto.



Figura 52. Pesatura arnie



Figura 53. Pesatura melari

### 3.3.4. Virus

Per quanto riguarda l'analisi sulla presenza dei virus, sono stati raccolti i campioni di api nello stesso momento e con lo stesso metodo del Nosema, per la prima prova in aprile 2011, giugno 2011, luglio, novembre 2011 e aprile 2012; per la seconda prova in giugno 2012 e novembre 2012. Abbiamo scelto un telaino del nido che presenta covata nei diversi stadi di sviluppo e le abbiamo messe in un barattolo di vetro per poterle portare in laboratorio. Qui una volta arrivate, sono state messe nel congelatore - 20°C per conservare il campione. Quindi essendo lo stesso campione una volta estratto le api per le analisi del Nosema, le restanti sono state poste in un sacchetto ermetico sono state conservate per fare le analisi dei virus.

I virus che abbiamo analizzato sono il Virus della paralisi acuta (ABPV), Virus della paralisi cronica (CBPV), Virus delle ali deformi (DWV), Virus della cella reale nera (BQCV), Virus della covata a sacco (SBV), Virus del Kashmir (KBV), Virus israeliano paralisi acuta (IAPV).

Le analisi sono state effettuate presso il laboratorio dell'Istituto Zooprofilattico della Toscana e del Lazio, nella sezione di Roma, specializzata nell'analisi dei virus.

Il protocollo seguito prevede una Microscopia elettronica a trasmissione (TEM). Gli estratti sono stati preparati e trattati secondo il protocollo descritto da Baeley e Ball (Baeley L., Ball B. 1991): ogni individuo viene omogeneizzato in 1 ml di PBS (Phosphate Buffered Saline) 0,01 M, pH 6,7, contenente il 2% di sodio dietilditiocarbamato (DIECA), aggiungendo successivamente 0,5 ml di dietiletere. Il tutto è stato quindi emulsionato con 0,5 ml di tetracloruro di carbonio (CCl<sub>4</sub>) e centrifugato, una prima volta a 3000 g per 30 minuti e poi a 9000 g per 30 minuti. Il sovratanante, è stato infine ultracentrifugato con Beckman Airfuge a 21 psi (103.00 g) per 20 minuti direttamente su griglie in rame rivestite con formvar e carbonate. Le griglie sono colorate negativamente con una soluzione al 2% di sale sodico dell'acido fosfotungstico (NaPT), pH 6,8 ed esaminate al microscopio elettronico ad ingrandimenti compresi tra 28.000 e 36.000x.

Segue la preparazione dei campioni e l'estrazione dell'RNA totale. Ogni campione consiste di 6 soggetti (adulti privati di zampe e ali), omogenati in 6 ml di PBS 1X. L'omogenato viene poi centrifugato a 200 × g per un minuto. Il sovratanante raccolto viene diluito 1:2 in H<sub>2</sub>O-DEPC. 140µl sono quindi utilizzati per estrarre l'RNA totale utilizzando il QIAamp viral RNA Mini Kit (Qiagen).

Sintesi del cDNA. L'RNA virale è stato retro-trascritto mediante l'impiego dell'High Capacity cDNA Archive Kit (A: Biosystems) utilizzato come stampo 30µl di RNA totale. La sintesi del cDNA è stata eseguita mediante amplificatore GeneAmp® PCR System 9700 (A. Biosystems) e consiste in un primo ciclo a 25°C per 10', seguito da un secondo a 37°C per 45'.

I primers selezionati per ABPV,CBPV, DWV, SBV, BQCV,KVB e la bee β-actin sono stati selezionati dalla letteratura. Le dimensioni dei prodotti di PCR sono 397 bp (Bakonyi T. *et al.* 2002), 570 bp per CBPV (Blanchard P. *et al.*, 2008), 434 bp per DWV (Berényi O. *et al.*, 2006), 487 bp per SBV (Berényi O. *et al.*, 2006), 472 bp per BQCV (Berényi O. *et al.*, 2006), 395 bp per KBV (Berényi O. *et al.*, 2006), e 514 bp per bee β-actin (Shen M. *et al.*, 2005). Per IAPV sono state utilizzate due coppie di primers. La prima coppia gentilmente fornita dalla Beeologics, permette l'amplificazione di una porzione di 137 bp della Viral Coat Protein. La seconda coppia, riportata in letteratura (Blanchard P., Schurr F. *et al.*, 2008) è specifica per una porzione di 767 bp altamente conservate e localizzata all'interno della sequenza genomica IGR (Viral RNA Intergenic Region).

Successivamente è stata eseguita la verifica dell'estrazione e il controllo di qualità per l'RNA estratto. Sia la verifica dell'estrazione che la qualità dell'RNA ottenuto, sono state valutate mediante amplificazione della bee β-actin (Lavazza A. *et al.*, 1996). Le condizioni di amplificazione sono le seguenti: 0,2 mM di dNTP, 0,6 µM di entrambi i primers, 5µl di 10X Buffer (Invitrogen), 1,5 mM di MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 5µl di stampo a cDNA, 0,5 µl di 5U/µl Platinum®TaqDNA Polymerase (Invitrogen), e H<sub>2</sub>O-DEPC fino ad un volume finale di 50 µl. L'amplificazione è stata eseguita con l'apparecchio GeneAmp®PCR System 9700 (A. Biosystems) ed i cicli consistono in: 7' a 95°C, 40 cicli costituiti ciascuno da 1' a 94°C, 1' a 54°C, 1' a 72°C e seguiti da 7' a 72°C.

Le condizioni di amplificazione per i differenti virus esaminati sono state così elaborate: 0,2 mM di dNTP, 1µM di ciascun primer, 5µl di 10X Buffer (Invitrogen), 1,5 mM di MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 5µl di stampo a cDNA, 0,5 µl di 5U/µl Platinum®TaqDNA Polymerase (Invitrogen), e H<sub>2</sub>O-DEPC fino ad un volume finale di 50 µl. L'amplificazione è stata eseguita con l'apparecchio GeneAmp®PCR System



9700 (A. Biosystems) ed impiegando i seguenti profili di amplificazione: 7' a 95°C, seguiti da 40 cicli costituiti ciascuno da 1' a 95°C, 1' a 55°C per ABPV,CBPV,DWV,SBV, KBV, IAPV ed 1' a 60°C per BQCV, 1' a 72°C ed infine 7' a 72°C.

Segue la costruzione dei controlli positivi per ABPV, CBPV, DWV, SBV, KBV, BQCV e bee  $\beta$ -actin. Per verificare sia l'amplificazione che la specificità dei prodotti di PCR, i controlli positivi relativi ai virus considerati, sono stati ottenuti dai cDNA gentilmente forniti da P. Blanchard (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments-Afssa) e sintetizzati da RNA estratto da api adulte affette dalle virosi in esame. Gli amplificati specifici per la bee  $\beta$ -actin sono stati ottenuti dal cDNA di api adulte sane. Tali amplificati, successivamente, sono stati purificati impiegando QIAquick®PCR Purification Kit (Qiagen) e clonati in PCRII-TOPO vector (TOPO TA Cloning® Dual Promoter Kit Invitrogen). I plasmidi ricombinati sono stati utilizzati per trasformare le cellule componenti ONE SHOT TOP 10 (Invitrogen). I cloni selezionati sono stati controllati mediante analisi con gli appropriati enzimi di restrizione, con opportune PCR di screening e con il sequenziamento in modo tale da verificare la presenza degli specifici prodotti di PCR clonati.

Infine si effettua la verifica della rilevabilità (LOD) dei protocolli di PCR per la diagnosi dei vari virus. Il LOD delle singole PCR messe a punto per la diagnosi di ABPV, CBPV, DWV, IAPV, SBV, BQCV,KVB è stato verificato esaminando una serie di diluizioni scalari in base 10 delle regioni genomiche ad RNA che rappresentano i target virali considerati e che sono state sintetizzate *in vitro* partendo dagli specifici plasmidi ricombinati. Le reazioni di trascrizione in vitro sono state effettuate con kit Mega script T7/Sp6 (Ambion) seguite dalla purificazione dei trascritti con colonne Centri-Sep (Princeton Separation, INC). La sintesi del cDNA a partire dalle diluizioni scalari e la successiva amplificazione con i primers specifici sono state effettuare in un unico step con il kit SuperScript One-Step RT-PRC (Invitrogen).

### 3.3.5. Nosema

Le analisi delle api per comprovare la presenza di *Nosema spp.* sono state effettuate presso l'Istituto Zooprofilattico di Toscana e Lazio , sezione di Firenze. Il prelievo delle api per l'analisi dei campioni per *Nosema spp.* per valutare il livello di infestazione, sono stati fatti nello stesso periodo che per i virus. Le analisi sono state effettuate seguendo un protocollo ben definito da Higes M. *et al.*, 2006.

Preparazione del campione. Dal campione sono state estratte 20 api per ciascun alveare, che sono state sottoposte a separazione e apertura dell'addome con un bisturi, questo per facilitare l'uscita del contenuto del mesointestino e successiva estrazione degli intestini. Agli addomi sono state aggiunte alcune gocce di acqua DNA/RNA Free o PBS. Il tutto è stato trasferito con una pipetta Pasteur sterile monouso all'interno di una provetta Falcon da 50 ml, nella quale è stata poi versata acqua DNA/RNA Free o PBS fino a raggiungere il volume di 20 ml (1 ml per ogni ape pestata). Con un'ansa sterile sono state prelevate alcune gocce di liquido di pestaggio e sono state trasferite su un vetrino portaoggetti, ricoperte con altro vetrino e osservate al microscopio ottico ad ingrandimento 40x per vedere l'eventuale presenza/assenza di spore di *Nosema spp.* (Figura 54).

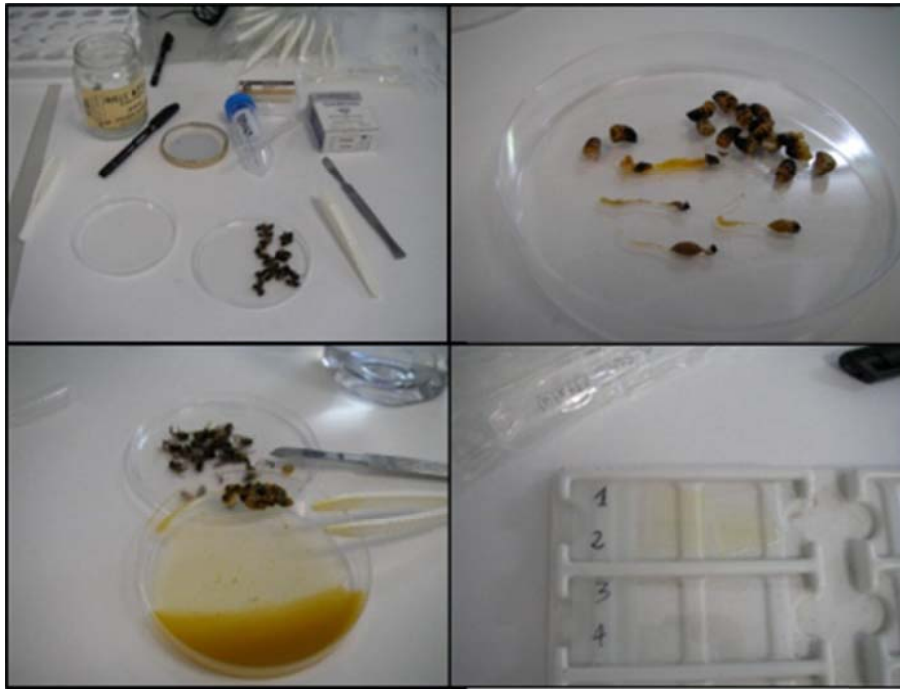


Figura 54. Preparazione del campione

Conta delle spore. Per la conta delle spore è stata prelevata mediante pipetta Pasteur sterile la soluzione di pestaggio e trasferite due gocce di liquido su un vetrino conta spore (camera di Bunker) (Figura 55). Segue l'osservazione al microscopio con ingrandimento 20x e conta delle spore presenti in quattro quadrati in modo da poterne calcolare la media. Si rapporta quindi il numero di spore per quadrato al numero di spore per ape: essendo l'area del quadrato pari a  $0,04 \text{ mm}^2$  e lo spessore del volume di acqua tra il vetrino e il coprioggetto uguale a  $0,1 \text{ mm}$ , il volume risulterà di  $0,004 \text{ mm}^3$ ; questo valore deve essere moltiplicato per 250 per ottenere  $1 \text{ mm}^3$ , che moltiplicato per 1000 diventa  $1 \text{ cm}^3$ , ossia il quantitativo ( $1 \text{ ml}$ ) di acqua aggiunto all'inizio per ogni addome di ape pestato.

Quindi, il calcolo da fare è:

- $n^\circ \text{ di spore medio} \times 250000 = n^\circ \text{ di spore/ape}$

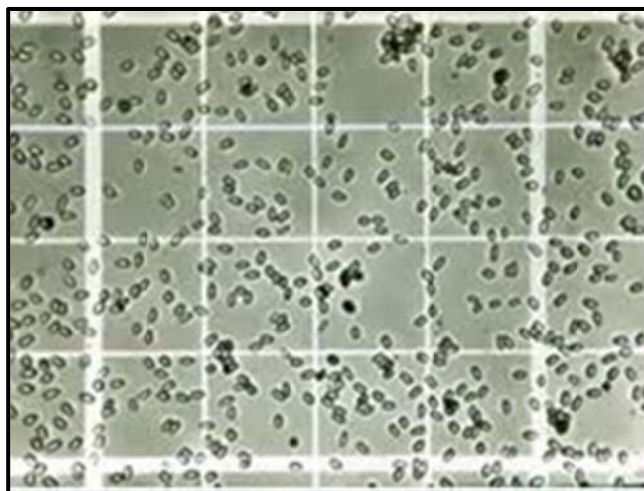


Figura 55. Conta delle spore

Estrazione DNA. Per quanto riguarda l'estrazione del DNA, questa è stata fatta con QIAamp® DNA Mini and Blood Kit (QIAGEN® GmbH, Hilden, Germania).

La sospensione prodotta con il pestellamento è stata trasferita in una eppendorf da 2 ml con l'aiuto di una pipetta P1000, è stata agitata mediante vortex per alcuni secondi ed è stato eliminato, con delle pinzette sterili, l'esoscheletro. La eppendorf è stata centrifugata alla massima velocità per 10 minuti per permettere la formazione del pellet, è stato eliminato il surnatante e pesato il pellet su una bilancia di precisione facendo la tara con una eppendorf da 2 ml vuota. Pesare il pellet è necessario per poi adeguare la quantità di reagenti del kit da utilizzare per procedere con l'estrazione. Il peso ideale si aggira tra i 35 e i 50 mg, per i quali viene aggiunta una quantità pari circa a 40 µl di PBS o acqua DNA/RNA Free (se il peso raddoppia, raddoppia anche la quantità di PBS, in alternativa è necessario aggiustare le quantità mediante proporzione) che serve per risospendere il pellet. Si aggiungono 180 µl di soluzione enzimatica (Lysozyme 10mg/ml) per 35-50 mg di pellet e si incuba a 37°C per 30 minuti. Seguono poi una serie di aggiunte:

- 20 µl di Proteinase K e 200 µl di Buffer AL (lysis buffer). Si agita mediante vortex alcuni secondi per poi mettere in incubazione a 56°C per 30 minuti e successivamente a 95°C per 15 minuti e centrifugare brevemente per raccogliere il liquido presente sul tappo e nelle pareti.
- 200 µl di Etanolo assoluto (96-100%). Si agita mediante vortex per 15 secondi e si centrifuga brevemente per raccogliere il liquido presente sulle pareti e sul tappo.

Il liquido viene poi trasferito dalla eppendorf da 2 ml alla colonnina QIAamp Mini Spin column adagiata nel tubo di raccolta. Viene poi centrifugato a 6000 xg (8000 rpm) per 1 minuto, eliminato il tubo di raccolta e posizionata la colonnina in uno nuovo.

- Si aggiungono 500 µl di Buffer AW1 e centrifugano a 6000 xg (8000 rpm) per 1 minuto. Si elimina il tubo di raccolta e si posiziona la colonnina in un tubo di raccolta nuovo.
- Si aggiungono 500 µl di Buffer AW2 e centrifugano alla massima velocità (20.000 xg; 14.000 rpm) per 3 minuti e si posiziona la colonnina in una eppendorf da 1.5 ml e si centrifuga nuovamente alla massima velocità per essere sicuri di eliminare tutto il residuo del tampone, per 1 minuto. Infine si posiziona la colonnina in una eppendorf pulita e si aggiungono 200 µl di Buffer AE (elution buffer) o Acqua DNA/RNA Free. S'incuba per 1 minuto a temperatura ambiente e si centrifuga a 6000 xg (8000 rpm) sempre per 1 minuto. L'operazione va poi ripetuta (Figura 56).

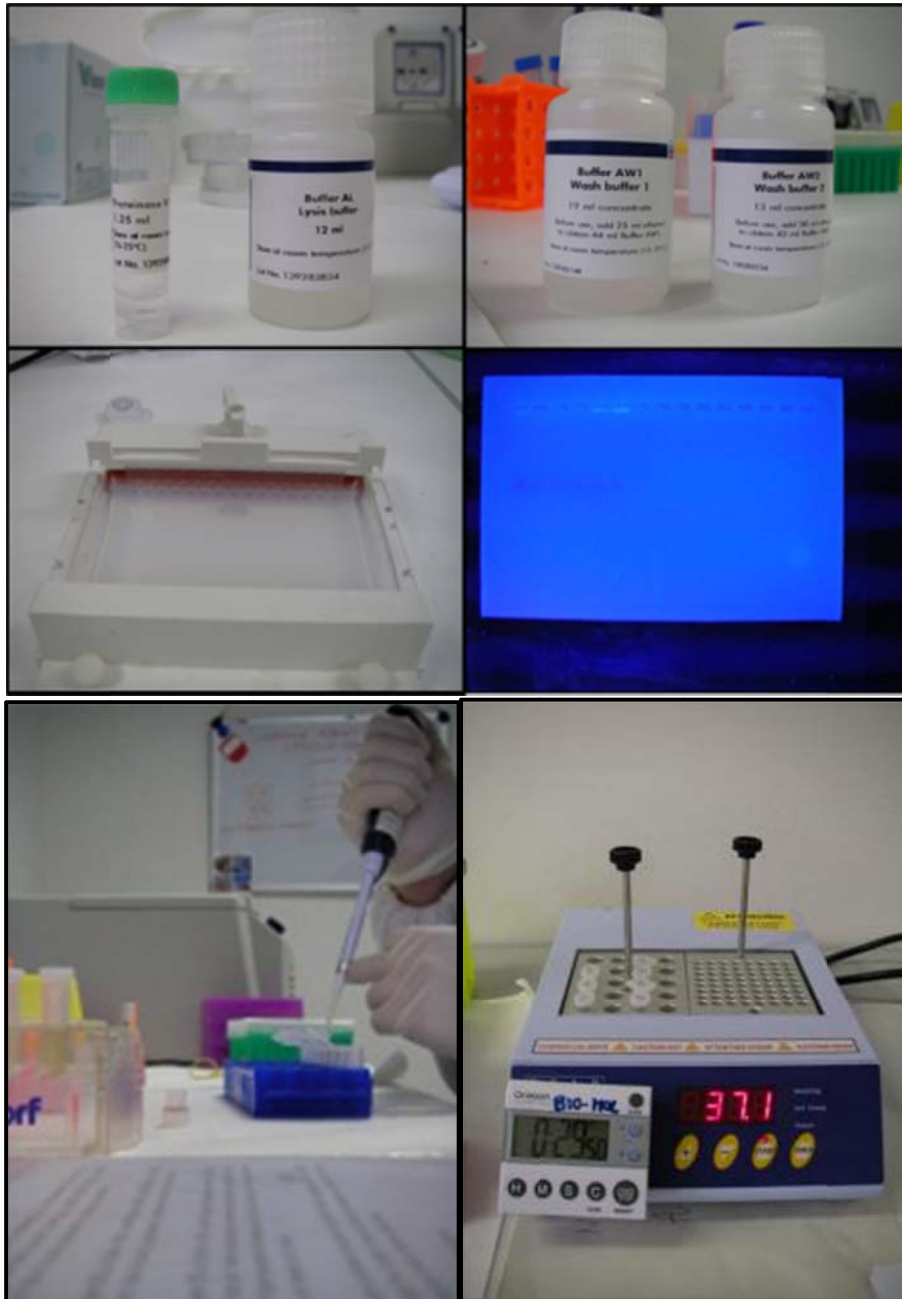


Figura 56. Estrazione DNA

Per la corretta identificazione della specie di *Nosema*, occorre fare una prima amplificazione che permette di confermare la presenza/assenza di *Nosema spp.* con una coppia di primers (NOS-FOR e NOS-REV) in grado di amplificare una regione conservata del gene che codifica per la subunità ribosomiale 16S comune a *N. apis* e a *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2006).

Le sequenze degli oligonucleotidi utilizzati sono riportate in tabella 15.

Tabella 15. Sequenza nucleotidica dei primers utilizzati per la PCR

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'

La PCR è stata eseguita mediante termociclatore Opticon 2, utilizzando una miscela di reazione costituita da: 5 µl di Taq Master Mix (Larova), 1 µl del primer NOS-FOR, 1 µl del primer NOS-REV, 1 µl di estratto da amplificare e 17 µl di H<sub>2</sub>O DNA/RNA free. Il termociclatore è programmato secondo questo protocollo:

- denaturazione iniziale a 95°C per 10 min.
- 40 cicli di amplificazione caratterizzati ciascuno da una fase di denaturazione a 94°C per 30 sec, una di appaiamento a 55,5°C per 30 sec. ed una di estensione a 72°C per 30 sec.
- fase di estensione finale a 72°C per 10 min.
- fase di raffreddamento finale a 4°C.

Una quantità pari a 7 µl del prodotto di amplificazione è stata poi sottoposta a corsa elettroforetica su gel di agarosio all' 1.5% a 100 Volt per 45 minuti e visualizzato mediante luce ultravioletta. La positività si determina in base alla presenza di una banda di circa 240-250 bp (240 bp per *N. apis* e 252 bp per *N. ceranae*). In ogni reazione viene incluso un controllo negativo (H<sub>2</sub>O DNA/RNA free) e un controllo positivo fornito dal Centro di Referenza Nazionale per l'Apicoltura dell'IZSVE. Come marcatore di riferimento viene utilizzato un DNA ladder pari a 100 bp. Una volta confermata la presenza di *Nosema spp.*, si procede con l'identificazione di specie mediante una digestione enzimatica con tecnica RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), che consente, in base ai profili di restrizione ottenuti, di determinare se si tratta di *N. apis* o *N. ceranae*. Prima del processo di digestione enzimatica, è necessario sottoporre i campioni ad una amplificazione mediante PCR, utilizzando due primers (Tabella 16) in grado di amplificare una regione del gene che codifica per la subunità 16S dell'rRNA, pari a 412 bp in *N. ceranae* e a 417 bp in *N. apis* (Klee *et al.*, 2007).

**Tabella 16. Sequenze nucleotidiche utilizzate per la RFLP-PCR**

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

La miscela di reazione è costituita da: 5 µl di Buffer 10x, 1,50 µl di MgCl<sub>2</sub>, 1 µl di dNTPs, 1 µl di primer SSU-res-f1, 1 µl di primer SSU-res-r1, 0,20 µl di Taq Platinum DNA Polymerase (Invitrogen), 39,30 µl di H<sub>2</sub>O e 1 µl di DNA da amplificare, per un totale di 50 µl.

Il termociclatore è programmato secondo questo protocollo:

- denaturazione iniziale a 94°C per 30 sec.
- 35 cicli di amplificazione caratterizzati ciascuno da una fase di denaturazione a 94°C per 30 sec, una di appaiamento a 53°C per 30 sec. ed una di estensione a 72°C per 1 min.
- fase di estensione finale a 72°C per 30 sec.
- fase di raffreddamento finale a 4°C.

Il prodotto di amplificazione ottenuto viene successivamente sottoposto a restrizione enzimatica. La digestione viene effettuata mediante l'utilizzo contemporaneo di due coppie di enzimi di restrizione che, tagliando l'amplificato in siti specifici,

determinano la formazione di profili di restrizione caratteristici per l'una o l'altra specie (Klee *et al.*, 2007) (Tabella 17).

L'enzima MspI è in grado di digerire sia *N. ceranae* che *N. apis* e quindi è utilizzato come controllo della corretta digestione, mentre gli enzimi NdeI e PacI sono in grado di tagliare in maniera esclusiva rispettivamente *N. apis* e *N. ceranae* (Figura 57).

Tabella 17. Profili di Restrizione (bp = paia di basi)

Specie di Nosema	Coppie di Enzimi di Restrizione	Profilo di Restrizione
<b>N. apis</b>	NdeI / MspI	91-136-175 bp
<b>N. ceranae</b>	PacI / MspI	104-116-177 bp

La miscela di reazione è costituita dall'enzima con i rispettivi buffer. Per ultimo, si aggiunge l'amplificato e l'H<sub>2</sub>O, le cui quantità dipendono dall'intensità della banda dell'amplificato visualizzata con l'elettroforesi a termine della PCR (volume finale della mix pari a 25µl).

Il processo di digestione enzimatica viene eseguito sottoponendo i campioni a 37°C per 3 ore.

Il prodotto della digestione viene infine sottoposto a corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1.5% a 100 Volt per 45 minuti e visualizzato mediante luce ultravioletta.

Come marcatore di riferimento viene utilizzato un DNA ladder pari a 50 bp.

La positività si determina in base al confronto delle bande ottenute con il marcatore e i campioni sottoposti all'analisi, facendo riferimento alle dimensioni dei profili descritti in tabella 17.

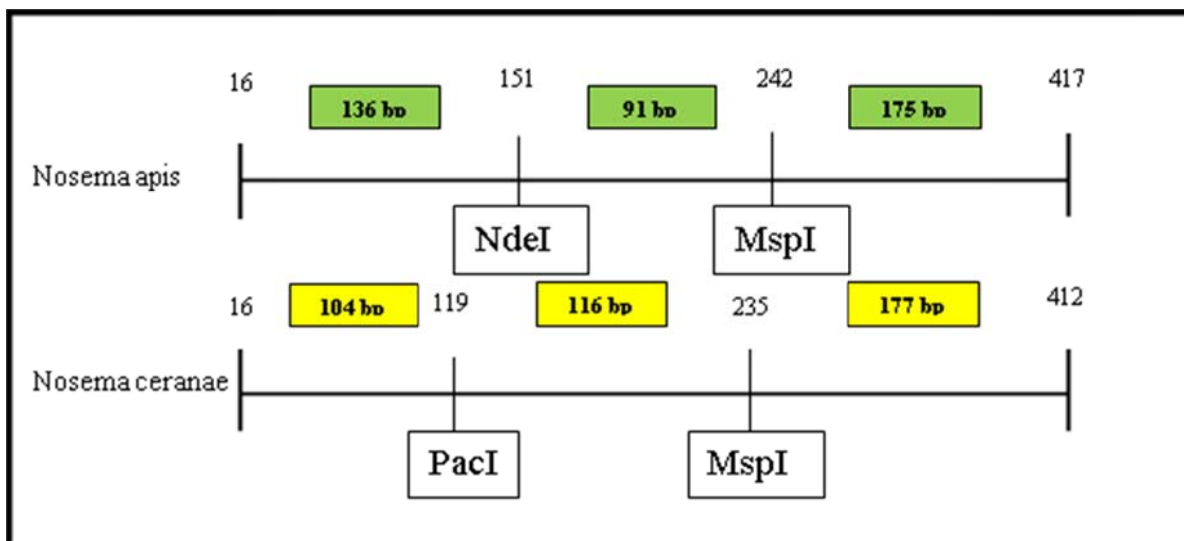


Figura 57. Rappresentazione della grandezza (in paia di basi = bp) dei frammenti di restrizione di *N.apis* e *N.ceranae*.



### 3.3. Metodologie d'individuazione del *Nosema spp.* a confronto

Durante il secondo anno da settembre 2012 a dicembre 2012 è stato possibile ampliare la conoscenza sul *Nosema spp.*, grazie a la collaborazione con il centro di ricerca della Consejeria de Agricultura de la Castilla-la Mancha in Guadalajara, presso il "Centro Apicola de Marchamalo" dove il gruppo di ricerca di Mariano Higes da anni svolge sulle api e in particolare su *Nosema ceranae* (Figura 58).



Figura 58. Gruppo di ricerca del CRA (Centro Apicola Regional ) di Marchamalo

Dalla collaborazione è nata la possibilità di affinare il protocollo usato per analizzare le api e inoltre è stato possibile analizzare un campione delle api della nostra sperimentazione nel centro per poter confrontare i due diversi metodi di analisi del *Nosema* e i risultati delle analisi.

Abbiamo analizzato le api del campionamento di giugno e di novembre 2012 che appartengono alla seconda prova. Il protocollo usato è il seguente:

Preparazione campione: dai campioni di ogni alveare vengono estratte 20 api e macerate in 5 ml di acqua distillata attraverso la macchina Stomacher 80 (Seward) usando borse con filtro (BA6040/STR, Seward) alla velocità Normal per 120'' (Figura 59).



Figura 59. Preparazione del campione



La sospensione ottenuta è stata centrifugata a 3000 r.p.m. per 10 minuti a 4°C (necessari per l'estrazione dei virus e opzionali il Nosema). Dal campione centrifugato il sovrantante si utilizza per l'estrazione dei virus, si pone in una piastra gialla (piastra di incubazione) 11 gocce di una pipetta Pasteur o 400 µl del campione e il resto si conserva in una provetta. Il pellet ottenuto si diluisce in 3 ml di acqua distillata e da questo si estraggono 11 gocce di una pipetta Pasteur o 400 µl del campione e vengono messe in una piastra azzurra (piastra PCR twintec) per l'estrazione del DNA del *Nosema spp.* e il rimanente si conserva (Figura 60).

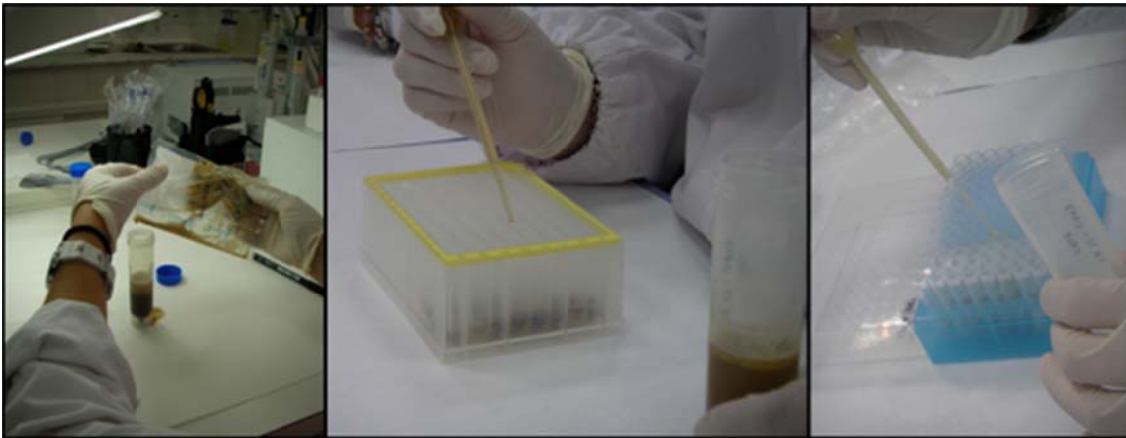


Figura 60. Preparazione del campione

Estrazione DNA: prima di tutto si incuba, di ogni campione processato 150 µl con 20 µl di proteinasi K e 30 µl di Buffer ATL (Qiagen), nel Thermomixer comfort a 56°C a 300 r.p.m. per una notte intera. Dopo l'incubazione si realizza l'estrazione del DNA utilizzando BioSprint™ 96 DNA Blood Kit (384) (Qiagen, Cat. No. 940057) in un robot Biosprint 96 (Qiagen) mediante il programma BS96\_DNA\_Tissue. Una volta incubato si centrifuga la piastra per eliminare le gocce che si sono formate sul tappo. Si prepara una miscela (Master Mix): 20 ml buffer AL, 20 ml Isopropanol, 3 ml Magthect Susp. G (vortex 3 min).

Si aggiunge 430 µl di MASTER MIX per pozzetto nella piastra dei campioni incubati. Si ripiena gli S-block con le soluzioni per l'estrazione: 2 S-Block con AW1 (500 µl per pozzetto), 2 S-Block con AW2 (500 µl per pozzetto), 1 S-Block con RNA free water (500 µl + 0,02% di Tween20 per pozzetto) e 1 piastra di estrazione con buffer AE (100 µl per pozzetto). Una volta pronte le piastre si mettono nel robot, il programma di protocollo è il BS96 DNA Tissue e si mettono le piastre in posizione come il robot richiede cominciando dalla posizione 8 (ultima posizione) (Figura 61).



Figura 61. Estrazione DNA

Una volta ottenuto l'estratto si procede ad analizzare la presenza di *Nosema ceranae* e *Nosema apis* mediante la tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR).

La tecnica di diagnostico utilizzata è stata una PCR multiplex, dove si rileva la presenza di *Nosema ceranae* e *Nosema apis* in una sola reazione e inoltre si amplifica anche frammento della subunità I del gene della citocromo C ossidasi I (COI) di *Apis mellifera*, il quale serve come controllo interno della reazione.

La reazione della PCR è stata effettuata attraverso un termociclatore Mastercycler Ep Gradient S (Eppendorf) in un volume totale di reazione de 25 µl:

- 2,5 µl di estratto di DNA
- 22,5 µl di preparato Biotools in piastra, che contiene:
  - 1U/rxn di HotSplit DNA Polymerase di Biotools
  - 0,2mg/ml di albumina di siero bovino,
  - 0,1% de Tritón X-100,
  - 0,4 µM dei primers di 218MITOC e 321APIS (Martín-Hernández R. *et al.*, 2007)
  - 0,03 µM dei primers COI (Tabella 18) (Martín-Hernández R. *et al.*, 2012)

**Tabella 18. Primers selezionati per rilevare la presenza di *N. ceranae*, *N. apis* e *Apis mellifera*.**

PRIMER	SEQUENZA <sup>a</sup>	DIMENSIONE PRODOTTO DELLA PCR (pb)	SPECIFICITA'
218MITOC-FOR 218MITOC-REV	5'- <u>CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTA</u> -3' 5'- <u>CCCGTCATTCTCAAACAAAAAACCG</u> -3'	218-219 <sup>b</sup>	<i>N. ceranae</i>
321APIS-FOR 321APIS-REV	5'- <u>GGGGGCATGTCTTTGACGTA</u> CTACTATGTA-3' 5'- <u>GGGGGCGCGTTTAAAAATGTGAAACA</u> ACTATG-3'	321	<i>N. apis</i>
COI-F COI-R	5'- <u>GGG</u> TCCAAGACCAGGA <sup>a</sup> ACTGGAT-3' 5'- <u>GCGCGG</u> AAATTCCTGATATATGAAGAGAAAA-3'	118	<i>Apis mellifera</i>

<sup>a</sup> Le code GC aggiunte ai primers sono sottolineate

<sup>b</sup> C'è 1 pb di differenza nella dimensione degli amplificati ottenuti da *N. ceranae* dovuti alle distinte sequenze della specie disponibile in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Il termociclatore per fare la PCR tripla per il *Nosema* si pone al programma e sono :

- 6 min. a 94°C (attivazione)
- 35 cicli di:
  - 30 sec. a 94°C (denaturazione)
  - 45 sec a 61,8°C (anellamento)
  - 1 min. a 72°C (estensione)
- 10 min. a 72°C (estrazione finale) (Figura 62)



Figura 62. PCR-multiplex

Una volta finito il processo del termociclatore si procede alla lettura della PCR tramite robot QIAxcel. Nella macchina si mette la piastra che è stata processata per PCR, il marcatore di peso molecolare e di allineamento. Il robot procede automaticamente alla lettura tramite elettroforesi, e viene letta tramite un programma di Biocalculator di QIAxcel (Figura 63).



Figura 63. Lettura PCR-multiplex

Riguardo la conta delle spore di *Nosema ceranae*, non è stato possibile effettuarla presso il laboratorio del Centro Apicola Regional di Marchamalo.

### 3.4. Elaborazione dati

Tutti i dati raccolti sono stati sottoposti ad analisi statistica tramite ANOVA (SPSS). È stata eseguita un'analisi della varianza tramite programma di statistica PASW utilizzando un modello generale lineare (univariata), modello misto. È stato considerato come fattore fisso il gruppo (A e C) e come fattori casuali la prova (1 e 2), il rilievo (numeri di campionamenti eseguiti) e solo riguardo alla caduta naturale della varroa ogni 3 giorni anche coddata (numero di conte effettuate per ogni rilievo). Le variabili dipendenti valutate sono state la caduta naturale della varroa (media giornaliera dei 21 giorni e la caduta ogni 3 giorni), la conta su api adulte della varroa, il peso del nido, la produzione di miele, il numero di api totali e la covata opercolata totale, il numero di spore presenti di Nosema ( in questo caso di *Nosema ceranae*). Il programma calcola nel modello il valore del test F di Fisher, che quando ci sono più interazioni significative calcola le varianze in base all'approssimazione dell'errore di Satterthwaite. Nel nostro caso quindi abbiamo corretto le varianze in modo da saggiarle sull'errore più appropriato in base alle interazioni. Inoltre è stata fatta un'analisi della contingenza per quanto riguarda l'incidenza del Nosema (in questo caso solo *Nosema ceranae*) e dei vari Virus presenti; le differenze sono state saggiate col metodo del chi quadrato.

#### 4. RISULTATI E DISCUSSIONI

La sperimentazione si svolge in due anni di prova e il termine è previsto per aprile del 2013. Quindi verranno riportati per quanto riguarda la seconda prova i risultati fino ad ora ottenuti. In allegato (allegati 4, 5, 6, 7, 8 ) sono riportate le note riassuntive delle operazioni effettuate nelle date dei campionamenti in tutte e due le prove. Qui sono state annotate le operazioni eseguite e nelle note sono state riportate le anomalie o le particolarità che abbiamo incontrato durante il campionamento o il trattamento. Per tutte e due le prove, i trattamenti effettuati, il rimedio omeopatico Calcarea Sulphurica 200 CH, il blocco di covata e l'Api-bioxal, sono stati gli stessi. Anche i campionamenti delle altre variabili e il monitoraggio della varroa sono stati eseguiti con le stesse metodologie. Le due prove nei due anni sono molto simili, la seconda prova è servita anche per affinare la metodologia eseguita nella prima, e per questo siamo partiti da pacchi di api (trattati precedentemente con Api-Bioxal), con regine coetanee e sorelle, e le famiglie sono state divise in gruppi sperimentali in base alla forza e alla presenza di varroa sugli adulti.

Mettendo insieme tutti i dati raccolti durante i vari campionamenti riguardo a tutte le due prove possiamo trarre alcune considerazioni riguardo la sopravvivenza degli alveari in sperimentazione e l'andamento delle regine nell'arco dell'anno di prova (Tabella 19 e Tabella 20).







Nella prima prova alla fine del primo anno sono morte 6 arnie 3 di ogni gruppo sperimentale, mentre per la seconda prova a novembre del 2012 le arnie morte risultano 5, 2 del gruppo trattato con Calcarea Sulphurica 200 CH e 3 del gruppo trattato con Acqua. Per quanto riguarda le regine, nella prima prova, 4 arnie del gruppo A (1,4,8,9) hanno sostituito la regina (trovata la regina vergine o famiglia orfana). Di queste quattro, successivamente al cambio di regina, tre arnie (1,8,9) sono state eliminate definitivamente dalla sperimentazione a causa della morte della famiglia.

Nel gruppo C sono state trovate due regine non marcate (11,17), cioè è avvenuta una sostituzione/sciamatura e in un caso si è trovata la regina vergine (13). Di queste tre, in seguito solo una è morta e la famiglia è stata eliminata dalla sperimentazione.

Nella seconda prova invece nel gruppo A due alveari hanno sostituito la regina e una famiglia è rimasta orfana. Nel gruppo C invece solo un'arnia ha sostituito la regina.

**Tabella 19. Sopravvivenza alveari e regine prima prova**

SOPRAVVIVENZA E REGINA PRIMA PROVA										
Arnia	Gruppo	Punto 0 Apr-11	Mag-11	Giu-11	Lug-11	Ago-11	Set-11	Nov-11	Feb-12	Apr-12
1	A			Regina Vergine	Inserita regina fecondata		Alveare morto	Alveare morto	Alveare morto	Alveare morto
2	A									Regina non trovata
3	A									Sciamata
4	A				Regina non trovata	Regina Vergine				
5	A									
6	A									Regina non marcata
7	A									
8	A						Senza regina (orfana)		Alveare morto	Alveare morto
9	A				Regina Vergine	Regina Vergine	Alveare morto	Alveare morto	Alveare morto	Alveare morto
10	A									
11	C					Regina non marcata	Alveare morto	Alveare morto	Alveare morto	Alveare morto
12	C									
13	C									Regina Vergine
14	C									R. blu
15	C									
16	C							Alveare morto	Alveare morto	Alveare morto
17	C					Regina non marcata				
18	C									
19	C							Alveare morto	Alveare morto	Alveare morto
20	C									R..bianca

	Alveare morto
	Regina Vergine
	Senza regina (orfana)
	Regina non marcata
	Inserita regina fecondata
	Regina non trovata



**Tabella 20. Sopravvivenza alveari e regine seconda prova**

SOPRAVVIVENZA E REGINA SECONDA PROVA				
N°arnia	Gruppo	Punto zero Giu-12	Lug-12	Nov-12
1	A	Regina gialla		
2	A	Regina gialla		
3	C	Regina gialla		
4	C	Regina gialla		
5	C	Regina gialla		
6	C	Regina gialla		
7	A	Regina gialla		
8	C	Regina gialla		
9	C	Regina gialla		
10	A	Regina gialla		
11	A	Regina gialla		
12	A	Regina gialla		
13	A	Regina gialla		
14	C	Regina gialla		
15	C	Regina gialla		
16	C	Regina gialla		
17	A	Regina gialla		da controllare
18	A	Regina gialla		da controllare
19	A	Regina gialla		
20	C	Regina gialla		da controllare



Alveare morto  
 Senza regina (orfana)  
 Regina sostituita non marcata

In base ai dati meteo del periodo della sperimentazione sono stati redatti i grafici che riportano l'andamento della temperatura, delle precipitazioni, del vento e l'umidità relativa. In particolare sono stati considerati solo i dati meteo del giorno in cui sono stati effettuati i rilevamenti e i trattamenti, riportando la temperatura massima e i mm di pioggia caduti nel giorno (Grafico 6) e l'umidità relativa media e la velocità del vento media del giorno in cui è stato fatto il campionamento (Grafico 7). Riguardo alla temperatura è stato scelto di riportare la T° massima, poiché i campionamenti e le operazioni eseguite per il monitoraggio sono state effettuate nelle ore centrali della giornata e nei mesi invernali, dato che con temperature basse non si possono aprire o muovere le cassette, la temperatura è risultata sempre  $\geq 10^{\circ}\text{C}$ . Naturalmente, dato che con la pioggia non si può lavorare con le api, le precipitazioni risultano sempre 0. Anche il vento è risultato moderato a ragione del fatto che non è possibile lavorare con le api con vento forte.

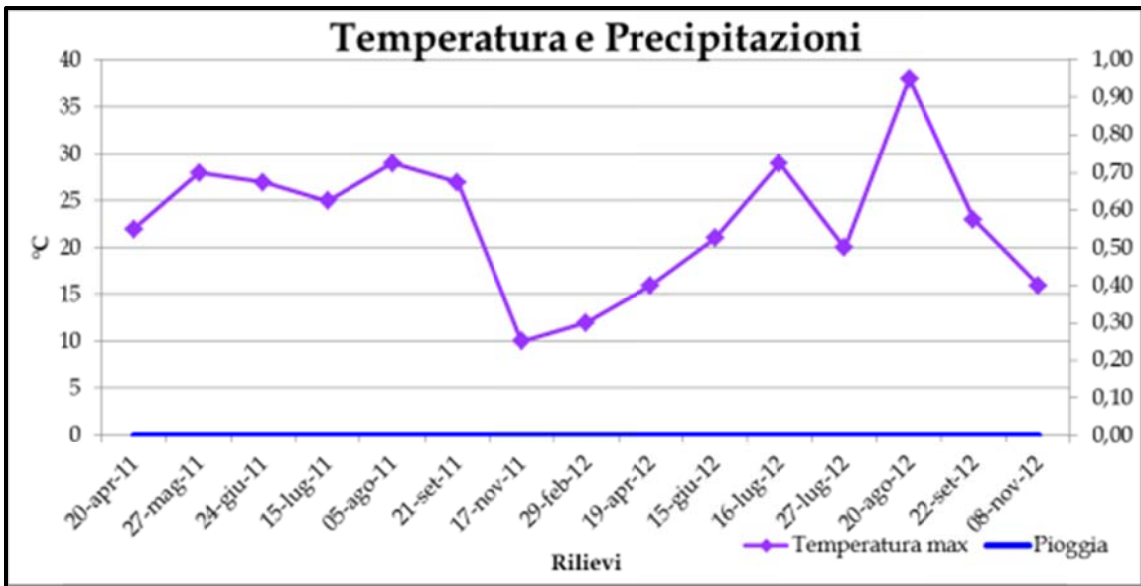


Grafico 6. Temperatura max e precipitazioni

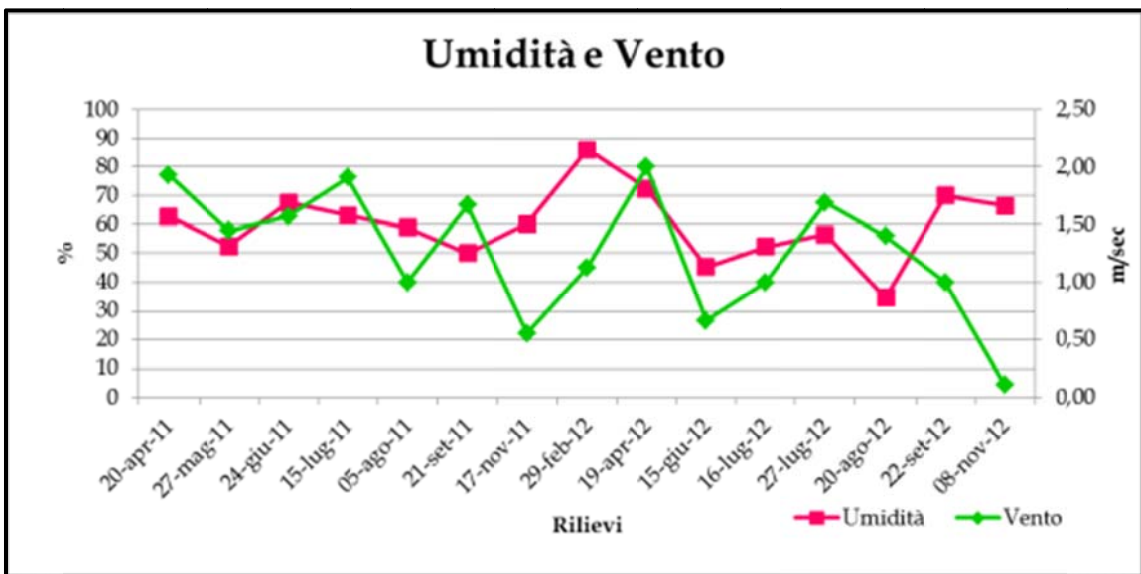


Grafico 7. Vento e umidità relativa medie

## 4.1. Varroa

### 4.1.1. Caduta naturale della varroa ogni 3 giorni

Tabella 21. Medie dei valori delle varroe cadute ogni 3 gg

PRIMA PROVA			SECONDA PROVA		
DATA	GRUPPO		DATA	GRUPPO	
	C	A		C	A
	MEDIA	MEDIA		MEDIA	MEDIA
23/04/2011	7,6	9,7	17/06/2012	3,3	6,8
26/04/2011	17,6	19,9	20/06/2012	5,6	7,7
29/04/2011	21,6	18,8	23/06/2012	8,9	11
02/05/2011	31	29,4	26/06/2012	10,1	12,4
05/05/2011	28,2	16,1	29/06/2012	5,5	7,7
08/05/2011	30,6	17,6	02/07/2012	9,8	8,3
11/05/2011	35,2	27	05/07/2012	9,3	13,2
27/06/2011	89,4	62,7	30/07/2012	23	33,5
30/06/2011	86,7	75,9	02/08/2012	10,8	11,8
03/07/2011	61,2	62,2	05/08/2012	4,7	12,2
06/07/2011	82,8	76,5	08/08/2012	5,77	22,4
09/07/2011	93	91,4	11/08/2012	16,6	14,7
12/07/2011	128,1	126	14/08/2012	35,2	23,6
15/07/2011	120,7	129,6	17/08/2012	25,1	16,8
18/07/2011	175,2	157,5	23/08/2012	290,5	484,2
21/07/2011	104,7	109,9	26/08/2012	18	20,1
24/07/2011	118,2	102,8	29/08/2012	17,3	20
27/07/2011	115,2	205	01/09/2012	2,4	3,3
30/07/2011	90,5	199,7	04/09/2012	3,4	4,4
02/08/2011	136	310	07/09/2012	3,6	6,3
05/08/2011	124,9	319	10/09/2012	6,4	6,8
08/08/2011	822,4	1458,2	11/11/2012	285,2	269,4
11/08/2011	60,4	114	14/11/2012	32,75	33,1
14/08/2011	23,8	68,1	17/11/2012	16,25	14,5
18/08/2011	28,6	106,3	20/11/2012	13,62	14,1
24/09/2011	4,25	3,5	23/11/2012	6	7,1
27/09/2011	2,75	4,88	26/11/2012	4	3,4
30/09/2011	3,62	3,22	29/11/2012	3	3,7
03/10/2011	5,25	6,77			
06/10/2011	2,62	4,55			
09/10/2011	2,37	4,88			
12/10/2011	4,25	4,11			
20/11/2011	212,87	280,71			
23/11/2011	48,1	56,14			
26/11/2011	13,62	8,85			
29/11/2011	7	6,57			
02/12/2011	4,37	3,14			
05/12/2011	2,37	2,14			
08/12/2011	2,25	3,42			
23/04/2012	8	1,66			
26/04/2012	11,71	1,66			
29/04/2012	10,29	1,5			
02/05/2012	8,14	1			
05/05/2012	12,14	3,33			
08/05/2012	11,14	3,33			
11/05/2012	9,43	3,16			

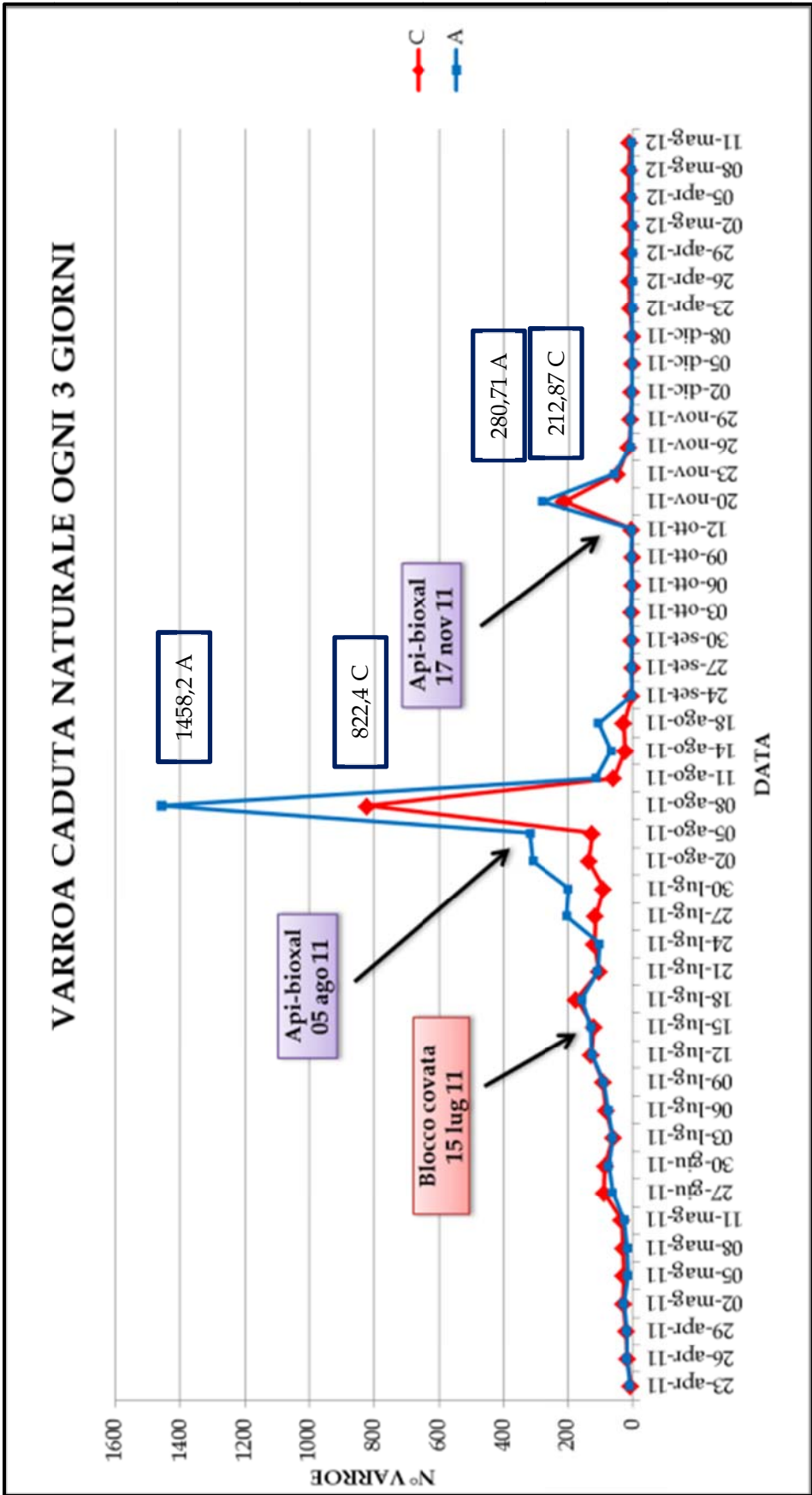


Grafico 8. Varroa caduta naturale ogni 3 gg. Prima prova

# VARROA CADUTA NATURALE OGNI 3 GIORNI

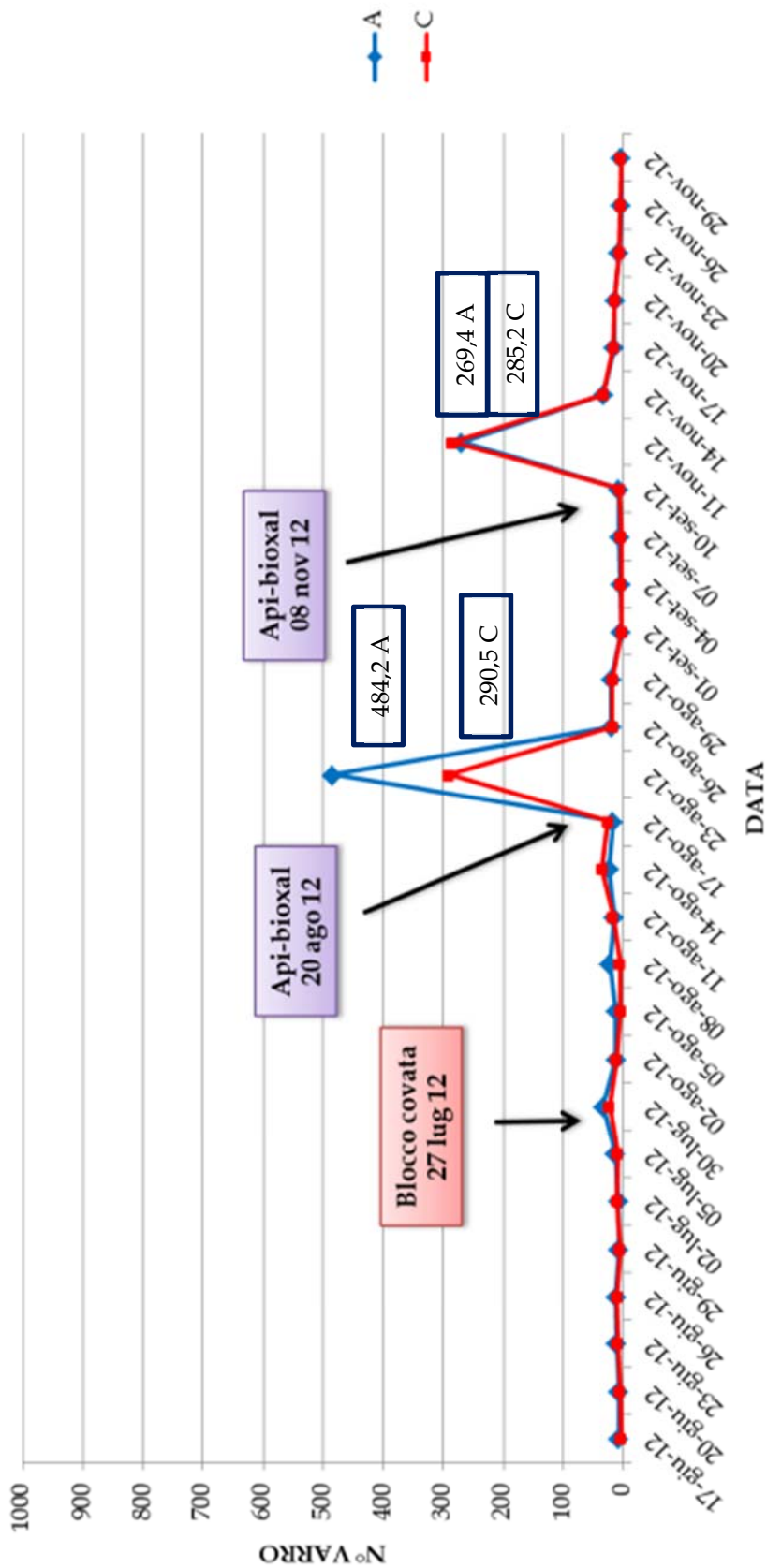


Grafico 9. Varroa caduta naturale ogni 3 gg. Seconda prova

Tabella 22. Numero osservazioni e fonti di variazione

Fattori tra soggetti		
		N
<b>Gruppo</b>	A	649
	C	663
<b>Rilievo</b>	1	280
	2	266
	3	266
	4	185
	5	140
	6	84
	7	91
<b>Coddata</b>	1	196
	2	196
	3	196
	4	196
	5	176
	6	176
	7	176
<b>Prova</b>	1	815
	2	497

Tabella 23. Analisi statistica e significatività

Fonti di variazione	Dev. Stand.	Gl	Varianza	F	P	
Prova	935428,84	1	935428,84	1,07	0,33	n.s.
Gruppo	166979,94	1	166979,94	1,75	0,22	n.s.
Gruppo * Prova	67654,71	1	67654,71	0,71	0,42	n.s.
Rilievo(Prova)	8166800,64	9	907422,29	9,53	0,00	**
Gruppo * Rilievo(Prova)	857288,82	9	95254,31	5,97	0,00	**
Coddata(Rilievo(Prova))	21090000,00	62	340211,16	21,31	0,00	**
Errore	19610000,00	1228	15965,37			
<b>Totale</b>		1311				

\*\* P<0,01; \* P<0,0



Tabella 24. Numero osservazioni e fonti di variazione senza le famiglie che hanno cambiato la regina

Fattori tra soggetti		
		N
Gruppo	A	623
	C	593
Rilievo	1	278
	2	237
	3	245
	4	161
	5	132
	6	78
	7	85
Prova	1	754
	2	462
Coddata	1	181
	2	183
	3	181
	4	181
	5	165
	6	163
	7	162

Tabella 25. Analisi statistica e significatività senza le famiglie che hanno cambiato la regina

Fonti di variazione	Dev. Stand.	Gl	Varianza	F	P	
Prova	947475,55	1	947475,55	1,11	0,32	n.s.
Gruppo	107959,18	1	107959,18	1,95	0,20	n.s.
Gruppo * Prova	42790,36	1	42790,36	0,77	0,40	n.s.
Rilievo(Prova)	7891939,02	9	876882,11	2,35	0,02	*
Gruppo * Rilievo(Prova)	498993,61	9	55443,73	4,27	0,00	**
Coddata(Rilievo(Prova))	23160000,00	62	373483,62	28,79	0,00	**
Errore	14680000,00	1132	12971,80			
Totale		1215				

\*\* P<0,01; \* P<0,05

Analizzando i dati ogni tre giorni si può vedere dai grafici (Grafico 8 e Grafico 9) l'andamento della caduta naturale della varroa delle prove. Durante i primi mesi della sperimentazione, per quando riguarda tutte e due gli anni, si ha un livello di caduta naturale bassa, nella norma con l'andamento stagionale e il ciclo dell'acaro. Nei campionamenti successivi questa inizia a crescere ma rimane sempre a un livello basso. Nel mese di luglio, data in cui è stato effettuato il blocco di covata su tutte le arnie si inizia a differenziare l'andamento della caduta dell'acaro (più evidente nella prima prova), infatti le varroe cadute nel gruppo con A sono superiori rispetto al gruppo con C. Nel mese di agosto, data in cui è stato effettuato il trattamento con Api-bioxal (solitamente la maggior quantità di caduta si ha nei primi 3 giorni dopo il trattamento poi questa si stabilizza e dopo 9 giorni torna ai livelli di una caduta naturale) si è avuto una differenza di caduta nei due gruppi, dove nel gruppo di

controllo si ha una caduta quasi doppia rispetto al gruppo sperimentale in tutte e due le prove (1458,2 A vs 822,4 C prima prova vs 484,2 A vs 290,5 C seconda prova). I campionamenti successivi di settembre fanno notare cadute minime della varroa nelle arnie rimaste in sperimentazione. A novembre le cadute aumentano anche a causa del trattamento invernale con Api-bioxal, anche in tal caso, le medie tra i due gruppi si discostano considerevolmente tra loro (280,71 A vs 212,87 C prima prova; 269,429 A vs 285,250 C seconda prova). In seguito, dopo i primi 3-6 giorni, le cadute si stabilizzano su livelli bassi con poche cadute per tutti e due i gruppi. La seconda prova è tutt'ora in corso e mancano i dati della primavera 2013. Comunque nella prima prova, nell'ultimo campionamento primaverile, alla ripresa dell'attività delle api, le cadute erano minime con un lieve incremento durante i 21 giorni di conta.

Dall'analisi statistica (Tabella 23) emerge che esistono delle differenze altamente significative per quanto riguarda la caduta naturale della varroa nei due diversi gruppi sperimentali rispetto ai rilievi all'interno di ogni prova: cioè nelle diverse date in cui sono stati effettuati i monitoraggi della varroa si riscontrano cadute significativamente diverse nei due gruppi. Anche all'interno di ogni rilievo, dove è stata contata la varroa ogni tre giorni per sette volte per un complessivo di 21 gg, ci sono differenze altamente significative tra i vari monitoraggi delle conte di ogni prova, in altre parole le sette volte che abbiamo contato la varroa in ogni rilievo, le cadute riscontrate ogni 3 giorni sono statisticamente diverse tra loro all'interno di ogni prova.

È stata effettuata anche un'analisi statistica eliminando tutti i dati che in qualche modo potevano influire negativamente sulla quantità della caduta naturale della varroa. Infatti se avviene una sciamatura o se per qualsiasi motivo si verifica la sostituzione della regina, l'alveare entra in blocco naturale di covata. Il blocco di covata provoca nella varroa un aumento dell'acaro all'esterno della covata. Questo perché, disopercolandosi le celle alla nascita delle nuove api gli acari che erano racchiusi si vengono a trovare all'esterno con conseguente maggior mortalità e quindi caduta. Questo potrebbe in qualche modo influenzare la reale caduta naturale delle varroe e di conseguenza anche l'effettiva caduta nei due gruppi sperimentali. Se si analizzano i dati togliendo i valori delle cadute degli alveari dal momento in cui sono state osservate regine vergini, sostituzioni, sciamature (regine non marcate), come si può vedere dalla tabella 25 comunque le significatività non cambiano di molto. Solo riguardo la variazione delle medie dei rilievi per le due prove Rilievo(prova) si riscontra una differenza un po' meno significativa.

Questo è il risultato più interessante che fino ad oggi abbiamo avuto, perché questo potrebbe dimostrare l'efficacia del rimedio omeopatico nell'aumentare la resistenza delle famiglie nei confronti dell'acaro della varroa, data la minore caduta nel gruppo trattato con Calcarea Sulphurica 200 CH, in tutti e due le prove di sperimentazione.

La caduta dopo il trattamento con Api-Bioxal inferiore, indicherebbe una minore infestazione delle famiglie. Anche se infatti nella nostra prova non possiamo utilizzare il coumaphos o il fluvalinate per far cadere tutte le varroe e misurare l'infestazione totale, perché questi prodotti non si possono utilizzare in apicoltura biologica, abbiamo trattato le famiglie con l'Api-Bioxal, prodotto efficace contro le varroe.

Il fatto che in tutte e due le prove, l'andamento della caduta sia omogeneo e simile, ci fa sperare e pensare al possibile effetto benefico che il rimedio omeopatico ha

apportato alle famiglie. In tutte e due le nostre prove, il gruppo C ha quindi dimostrato un livello di stima dell'infestazione significativamente inferiore rispetto al gruppo A dopo blocco di covata e successivo trattamento con Api-Bioxal, il che dimostra la validità e la ripetibilità del risultato.

#### 4.1.2. Caduta naturale media giornaliera di varroa dei 21 gg di osservazione

Tabella 26 Medie dei valori della varroa caduta giornaliera

PRIMA PROVA			SECONDA PROVA		
DATA	GRUPPO		DATA	GRUPPO	
	C	A		C	A
	MEDIA	MEDIA		MEDIA	MEDIA
11-05-11	8,1	6,5	05-07-12	2,5	3,1
14-07-11	31,5	30,9	17-08-12	5,7	6,4
05-08-11	41,1	66,8	10-09-12	16,2	25,9
18-08-11	71,9	134,3	29-11-12	17,2	16,4
12-10-11	1,5	1,1			
08-12-11	13,8	17,2			
11-05-12	3,3	0,7			

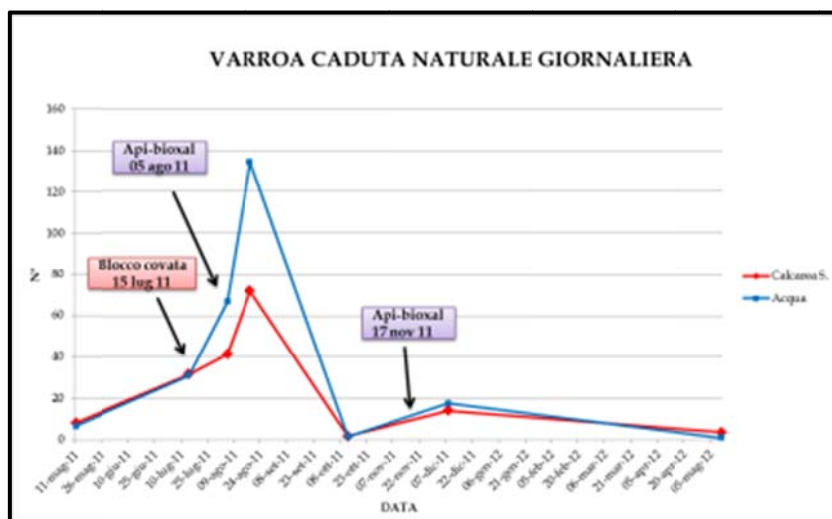


Grafico 10. Caduta varroa naturale giornaliera. Prima prova

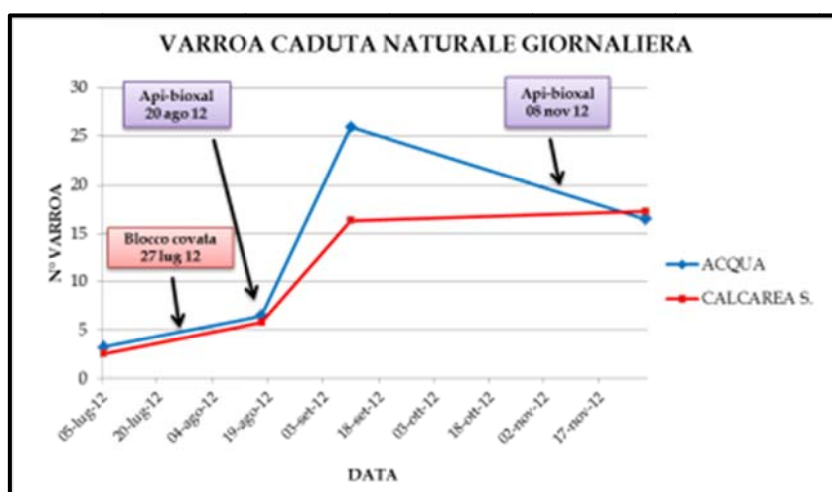


Grafico 11. Caduta varroa naturale giornaliera. Seconda prova

Tabella 27. Numero osservazioni e fonti di variazione

Fattori tra soggetti		
		N
<b>Gruppo</b>	A	96
	C	100
<b>Rilievo</b>	1	40
	2	38
	3	38
	4	35
	5	17
	6	15
	7	13
<b>Prova</b>	1	125
	2	71

Tabella 28. Analisi statistica e significatività

Fonti di variazione	Dev. Stand.	Gl	Varianza	F	P	
<b>Prova</b>	15959,51	1	15959,51	0,97	0,36	n.s.
<b>Gruppo</b>	2676,63	1	2676,63	1,40	0,27	n.s.
<b>Gruppo * Prova</b>	1058,88	1	1058,88	0,56	0,48	n.s.
<b>Rilievo(Prova)</b>	158365,84	9	17596,21	20,28	0,00	**
<b>Gruppo * Rilievo(Prova)</b>	17168,89	9	1907,65	2,20	0,02	*
<b>Errore</b>	150985,54	174	867,73			
<b>Totale</b>		195				

\*\* P<0,01; \* P<0,05

Tabella 29. Numero osservazioni e fonti di variazione senza le famiglie che hanno cambiato la regina

Fattori tra soggetti		
		N
<b>Gruppo</b>	A	89
	C	89
<b>Prova</b>	1	114
	2	64
<b>Rilievo</b>	1	40
	2	34
	3	32
	4	29
	5	16
	6	14
	7	13

Tabella 30. Analisi statistica e significatività senza le famiglie che hanno cambiato la regina

Fonti di variazione	Dev. Stand.	Gl	Varianza	F	P	
Prova	6300,51	1	6300,51	0,96	0,36	n.s.
Gruppo	1384,93	1	1384,93	2,46	0,12	n.s.
Gruppo * Prova	64,72	1	64,72	0,11	0,74	n.s.
Rilievo(Prova)	64755,97	9	7195,11	12,78	0,00	**
Gruppo * Rilievo(Prova)	5263,97	9	584,89	1,04	0,41	n.s.
Errore	87856,39	156	563,18			
Totale		177				

\*\* P<0,01; \* P<0,05

Il monitoraggio della varroa per ogni rilievo è stato di 21 giorni. Alla fine di ogni rilievo è stata calcolata la caduta naturale media giornaliera che è data dalla somma della varroa caduta ogni tre giorni per tutto il periodo diviso i giorni (21 gg) per il quale è stato fatto il rilievo. Questo serve per avere un'idea più generale dell'andamento della caduta rispetto al dato puntuale della caduta ogni tre giorni.

Sono riportati i risultati dell'analisi statistica per quanto riguarda la caduta naturale della varroa media giornaliera per periodo di tutte e due le prove.

Dai grafici (Grafico 10 e Grafico 11) si può vedere l'andamento della caduta della varroa durante le prove in esame. Come si può notare nei due gruppi la caduta non differisce molto. Solo dopo il blocco di covata (luglio) e il dopo trattamento con Api-bioxal (agosto) si riscontrano differenze di caduta nei due gruppi.

La differenza di caduta media tra il gruppo trattato con Calcarea Sulphurica 200 CH e quello non trattato (71,9 C vs 134,3 A prima prova; 16,28 C vs 25,9 A seconda prova) risulta quasi il doppio nel gruppo di controllo (A). Infatti dalla tabella 28 si può vedere che queste differenze sono altamente significative tra i rilievi all'interno di ogni prova tra i due gruppi. Questo significa che la caduta giornaliera di varroa è diversa nelle differenti date in cui è stato effettuato il monitoraggio nelle due prove. Questo dato sembra confermare le precedenti osservazioni fatte sulla caduta ogni tre giorni e ci rafforza nella convinzione dell'efficacia del trattamento.

In questo caso però, se si analizzano i dati senza i valori che potrebbero influire sulla caduta naturale della varroa, togliendo alveari che hanno avuto regine vergini, sostituzioni, sciamature (regine non marcate), si nota (Tabella 30) che si hanno differenze altamente significative tra i diversi rilievi effettuati nelle due prove, ma non tra i due gruppi sperimentali. Questo risultato potrebbe essere dovuto dal fatto che, prendendo in considerazione le medie giornaliere del periodo e non i dati puntuali presi ogni tre giorni, si perde l'effetto dell'Api-bioxal che si vede soprattutto dai 3 ai 9 giorni susseguenti al trattamento.

### 4.1.3. Varroa conta su api adulte

Tabella 31. Medie della conta delle varroe su api adulte

PRIMA PROVA			SECONDA PROVA		
DATA	GRUPPO		DATA	GRUPPO	
	C	A		C	A
	MEDIA	MEDIA		MEDIA	MEDIA
20/04/2011	3,40	1,20	08/06/2012	0,84	0,71
24/06/2011	9,28	8,42	27/07/2012	4,11	4,66
15/07/2011	12	8,69	08/11/2012	6,16	7,32
19/04/2012	2,32	0,5			

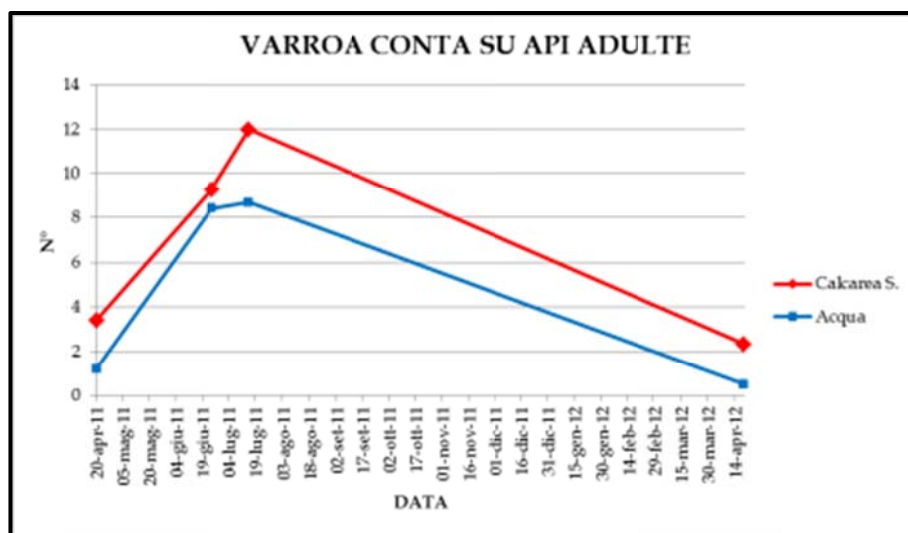


Grafico 12. Varroa conta su api adulte. Prima prova

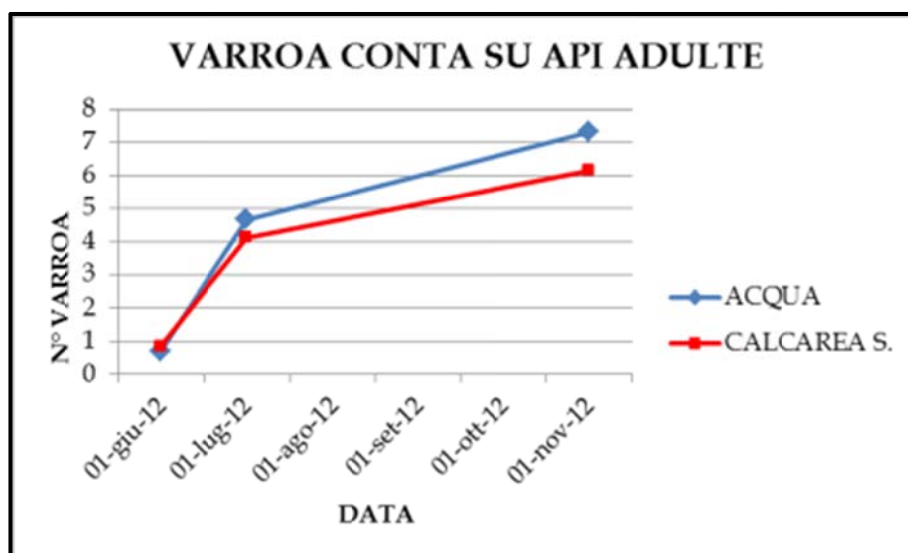


Grafico 13. Varroa conta su api adulte. Seconda prova



**Tabella 32. Numero osservazioni e fonti di variazione**

Fattori tra Soggetti		
		N
<b>Gruppo</b>	A	62
	C	63
<b>Prova</b>	1	72
	2	53
<b>Rilievo</b>	1	40
	2	38
	3	34
	4	13

**Tabella 33. Analisi statistica e significatività**

Fonti di Variazione	Dev.Stand.	Gl	Varianza	F	P	
Prova	92,21	1	92,21	0,29	0,61	n.s.
Gruppo	19,27	1	19,27	0,69	0,41	n.s.
Gruppo * Prova	49,52	1	49,52	1,78	0,19	n.s.
Rilievo(Prova)	1384,17	5	276,83	9,94	0,00	**
Gruppo * Rilievo(Prova)	18,54	5	3,71	0,13	0,98	n.s.
Errore	3090,82	111	27,85			
Totale		124				

\*\* P<0,01; \* P<0,05

**Tabella 34. Numero osservazioni e fonti di variazione senza le famiglie che hanno cambiato la regina**

Fattori tra soggetti		
		N
<b>Gruppo</b>	A	60
	C	58
<b>Prova</b>	1	69
	2	49
<b>Rilievo</b>	1	40
	2	34
	3	31
	4	13

**Tabella 35. Analisi statistica e significatività senza le famiglie che hanno cambiato la regina**

Fonti di Variazione	Dev.Stand.	Gl	Varianza	F	P	
Prova	33,13	1	33,13	0,13	0,73	n.s.
Gruppo	0,72	1	0,72	0,04	0,85	n.s.
Gruppo * Prova	31,60	1	31,60	1,60	0,21	n.s.
Rilievo(Prova)	1162,42	5	232,48	11,78	0,00	**
Gruppo * Rilievo(Prova)	62,41	5	12,48	0,63	0,68	n.s.
Errore	2052,76	104	19,74			
Totale		117				

\*\* P<0,01; \* P<0,05

Dai grafici (Grafico 12 e Grafico 13) si può riscontrare l'andamento della conta che appare omogeneo per quanto riguarda la prima prova, tranne per il campionamento di luglio 2011, dove si ha un numero più elevato di varroa nel gruppo C. Inoltre non è stato evidenziato l'effetto del trattamento (blocco covata e Api-bioxal) perché purtroppo si ha la mancanza dei dati del campionamento del mese di agosto 2011, e del mese di novembre 2011 vista l'impossibilità di visitare l'alveare e disturbare e raccogliere le api che erano in glomere per la stagione invernale. Per la seconda prova nel primo campionamento (giugno) non abbiamo ripetuto la conta delle varroe poiché solo qualche giorno prima avevamo fatto il punto zero della situazione per dividere i gruppi, (0,71 A vs 0,84 C) mentre nella conta successiva si hanno in media più acari nel gruppo A rispetto a C (4,66 A vs 4,11 C). Dall'analisi statistica (Tabella 33) si può vedere che le differenze del numero di varroe incontrate nei diversi rilievi differisce statisticamente nelle prove. Quindi anche se ci sono delle differenze tra i singoli campionamenti, il numero delle varroe contate all'interno dei due gruppi non differisce statisticamente. Se si considerano i dati per effettuare l'analisi statistica senza i valori che potrebbero influire sulla conta della varroa sulle api adulte, togliendo alveari che hanno avuto regine vergini, sostituzioni, sciamature (regine non marcate), si notano (Tabella 35) le stesse differenze statisticamente significative.

## 4.2. Peso del nido

Tabella 36. Medie del peso delle arnie

PRIMA PROVA			SECONDA PROVA		
DATA	GRUPPO		DATA	GRUPPO	
	C	A		C	A
	MEDIA	MEDIA		MEDIA	MEDIA
20/04/2011	29,44	30,18	08/06/2012	33,28	32,64
15/07/2011	35,53	35,04	02/11/2012	40,58	38,27
17/11/2011	36,47	40,32			

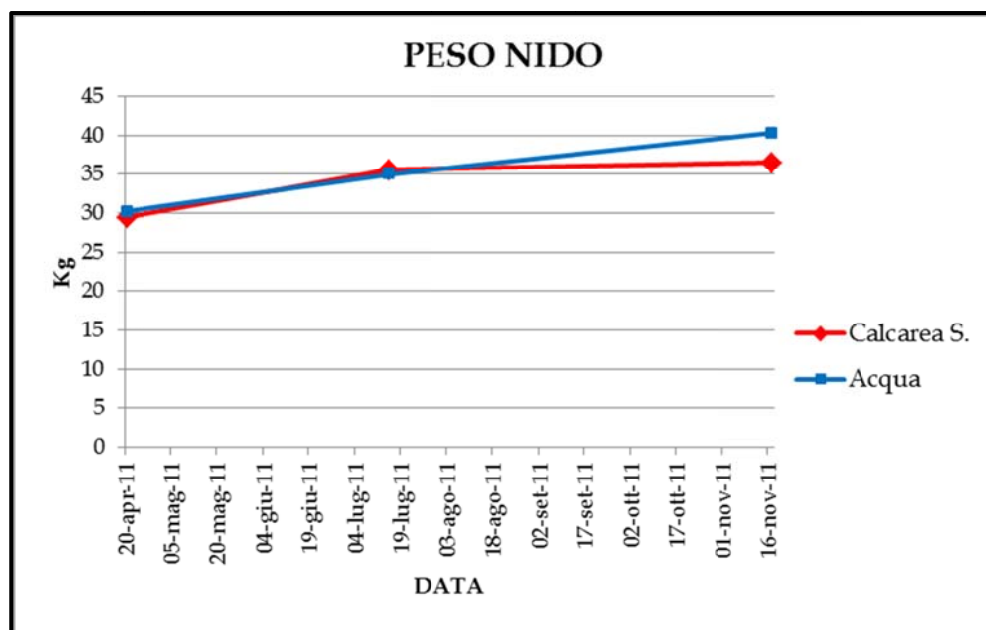


Grafico 14. Peso del nido. Prima prova

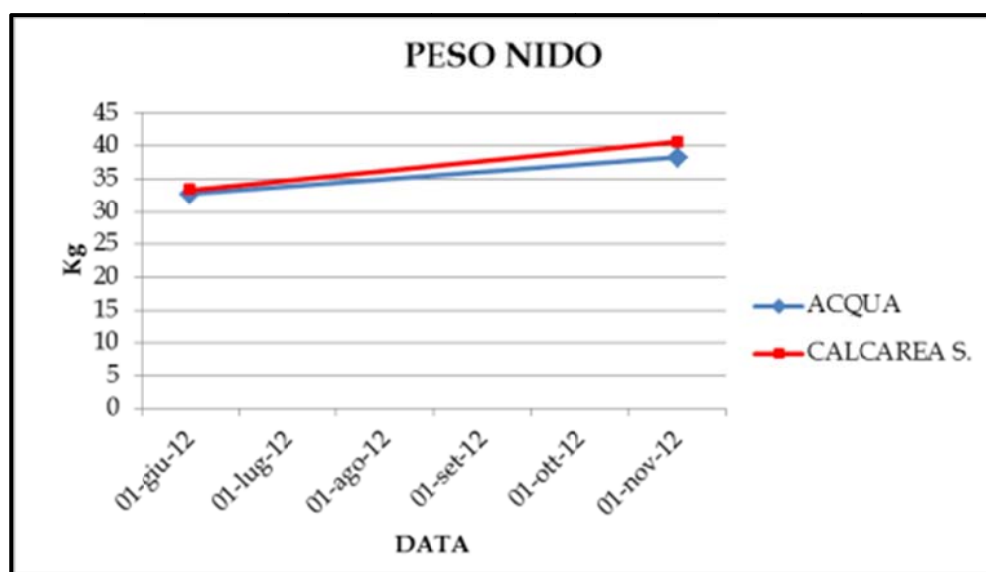


Grafico 15. Peso del nido. Seconda prova

Tabella 37. Numero osservazioni e fonti di variazione

Fattori tra Soggetti		
		N
Gruppo	A	44
	C	46
Rilievo	1	40
	2	35
	3	15
Prova	1	55
	2	35

Tabella 38. Analisi statistica e significatività

Fonti di Variazione	Dev.Stand.	Gl	Varianza	F	P	
Prova	60,32	1	60,32	0,17	0,71	n.s.
Gruppo	0,02	1	0,02	0,00	0,98	n.s.
Gruppo * Prova	42,36	1	42,36	2,08	0,15	n.s.
Rilievo(Prova)	1028,26	3	342,75	16,86	0,00	**
Gruppo * Rilievo(Prova)	47,37	3	15,79	0,78	0,51	n.s.
Errore	1625,94	80	20,32			
Totale		89				

\*\* P<0,01; \* P<0,05

Dai grafici (Grafico 14 e Grafico 15) possiamo vedere che il peso delle arnie è inferiore nel primo rilievo rispetto agli altri. Queste differenze possono essere dovute alla crescita, al normale sviluppo della colonia con l'inizio dell'attività dopo l'inverno (aprile), e lo stoccaggio del miele raccolto nel nido per l'inverno (novembre). I due gruppi all'interno della stessa data sono analoghi e non significativamente diversi, (A vs C Aprile 2011 30 vs 29 kg; Luglio 2011, 35 vs 35,5 Kg; Luglio 2012, 32 Kg vs 33 Kg; Novembre 2012, 38 Kg vs 40 Kg). L'unica differenza riscontrata è di quasi 4 Kg di media nel mese di novembre 2011 (nella prima prova) 40 Kg (A) vs 36 Kg (C). Purtroppo manca il dato di aprile 2012 del peso a fine della prima prova, perché per motivi tecnici non è stato possibile pesare le arnie. Dalla tabella 38 per l'analisi statistica si nota che ci sono differenze significative per quanto riguarda i rilievi nei diversi campionamenti per le due prove. Questo vuol dire che le arnie pesano in maniera statisticamente diversa nei vari campionamenti delle prove.

### 4.3. Produzione miele

Tabella 39. Medie della produzione di miele

PRIMA PROVA			SECONDA PROVA		
DATA	GRUPPO		DATA	GRUPPO	
	C	A		C	A
	MEDIA	MEDIA		MEDIA	MEDIA
20/04/2011	21,35	25,82	01/10/2012	57,80	59
15/07/2011	13,39	16,73	02/11/2012		

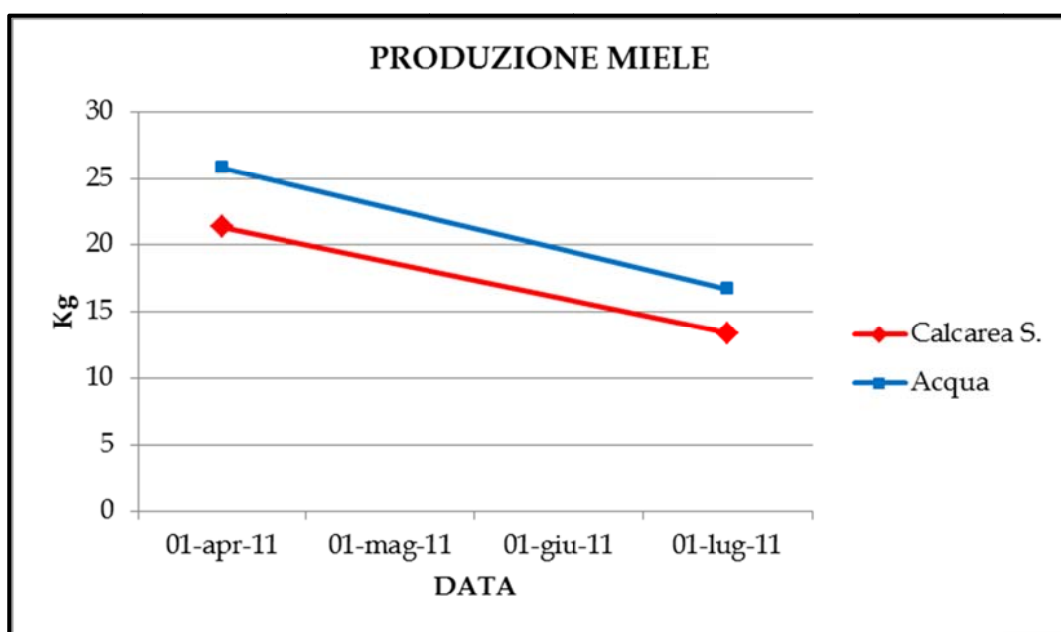


Grafico 16. Produzione di miele. Prima prova

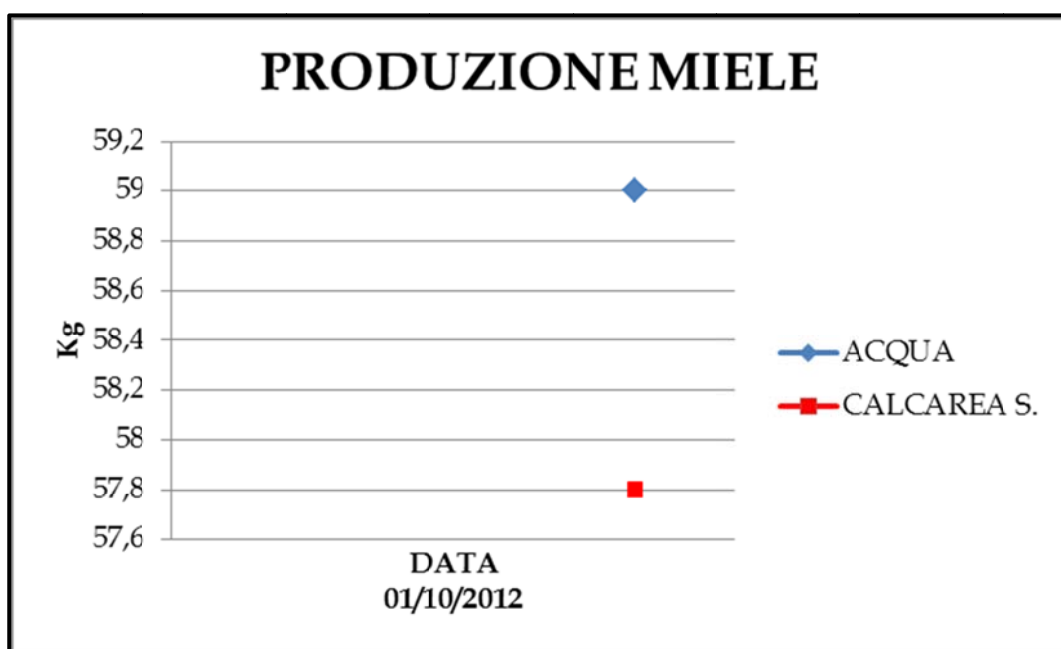


Grafico 17. Produzione di miele. Seconda prova

**Tabella 40. Numero osservazioni e fonti di variazione**

Fattori tra Soggetti		
		N
Gruppo	A	29
	C	29
Rilievo	1	38
	2	20
Prova	1	40
	2	18

**Tabella 41. Analisi statistica e significatività**

Fonti di Variazione	Dev. Stand.	Gl	Varianza	F	P	
Prova	2046,38	1	2046,38	2,85	0,32	n.s.
Gruppo	71,15	1	71,15	0,78	0,38	n.s.
Gruppo * Prova	44,05	1	44,05	0,48	0,49	n.s.
Rilievo(Prova)	726,81	1	726,81	7,99	0,01	**
Gruppo * Rilievo(Prova)	3,23	1	3,23	0,04	0,85	n.s.
Errore	4730,41	52	90,97			
Totale		57				

\*\* P<0,01; \* P<0,05

Come possiamo riscontrare dal Grafico 16 l'andamento della produzione, la quantità di miele prodotta nel mese di maggio/ giugno è superiore rispetto a quella di luglio. All'interno dei gruppi la produzione di miele non differisce, quindi anche se le arnie del gruppo A hanno prodotto mediamente di più rispetto a C queste non sono statisticamente differenti. Riguardo la seconda prova non è stato possibile fare due raccolte come l'anno precedente. Questo perché la stagione 2012 è stata estremamente siccitosa, le famiglie di partenza erano pacchi d'api, quindi poco più che sciami e per produrre miele e fare più smielature servono famiglie più forti. Nonostante ciò le arnie in sperimentazione hanno avuto una certa produzione di miele e come si può vedere dal grafico 17 e dalla tabella 39 il gruppo di controllo ha prodotto in media 1,2 Kg in più rispetto al gruppo C. Dall'analisi statistica risulta che ci sono differenze di produzione del miele tra i diversi rilievi nelle prove (Tabella 41).



#### 4.4. Numero di api totale

Tabella 42. Medie del numero di api nella colonia.

PRIMA PROVA			SECONDA PROVA		
DATA	GRUPPO		DATA	GRUPPO	
	C	A		C	A
	MEDIA	MEDIA		MEDIA	MEDIA
20/04/2011	15725	13450	08/06/2012	8600	8175
24/06/2011	20975	25275	02/11/2012	12218,7	9821,4
15/07/2011	15650	17125			
19/04/2012	14928,5	15041,6			

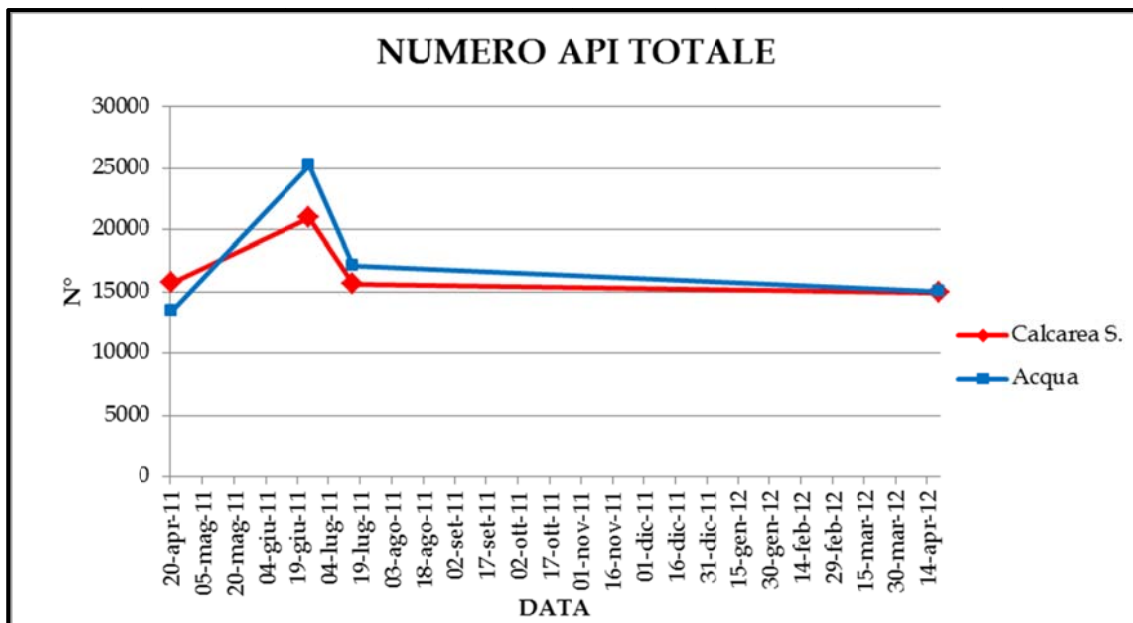


Grafico 18. Numero di api all'interno dell'alveare. Prima prova

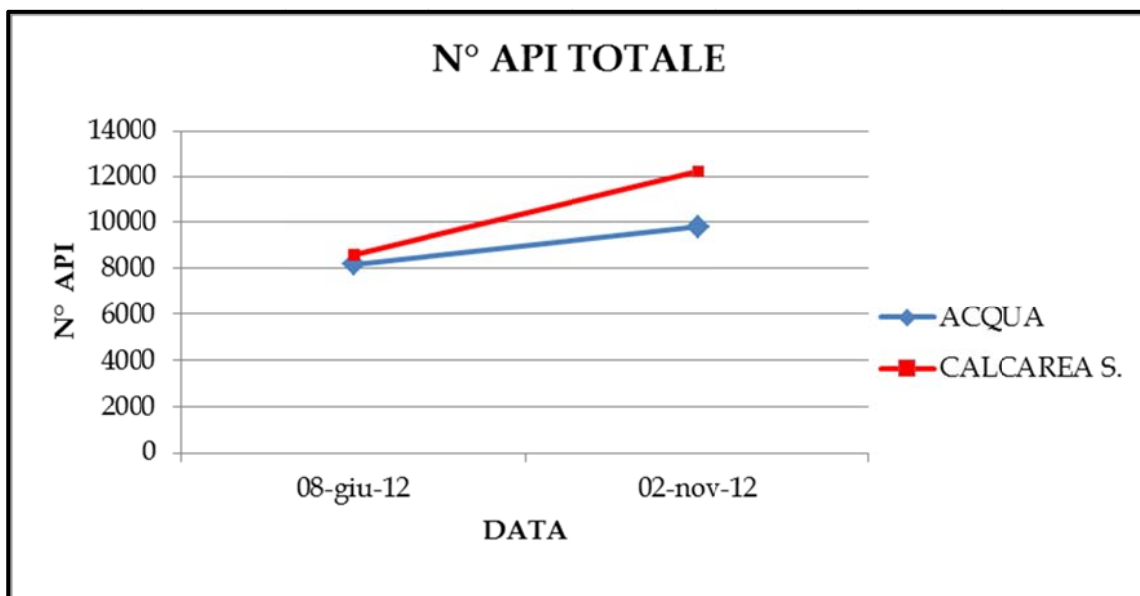


Grafico 19. Numero di api all'interno dell'alveare. Seconda prova

**Tabella 43. Numero osservazioni e fonti di variazione**

Fattori tra Soggetti		
		N
<b>Gruppo</b>	A	53
	C	55
<b>Prova</b>	1	73
	2	35
<b>Rilievo</b>	1	40
	2	35
	3	20
	4	13

**Tabella 44. Analisi statistica e significatività**

Fonti di Variazione	Dev. Stand.	G.L.	Varianza	F	P	
<b>Prova</b>	1318000000,00	1	1318000000,00	5,58	0,08	n.s.
<b>Gruppo</b>	538578,14	1	538578,14	0,02	0,90	n.s.
<b>Gruppo * Prova</b>	30820000,00	1	30820000,00	0,92	0,34	n.s.
<b>Rilievo(Prova)</b>	968200000,00	4	242100000,00	7,22	0,00	**
<b>Gruppo * Rilievo(Prova)</b>	120100000,00	4	30010000,00	0,90	0,47	n.s.
<b>Errore</b>	3219000000,00	96	33530000,00			
<b>Totale</b>		107				

\*\* P<0,01; \* P<0,05

Nella tabella 42 sono riportate le osservazioni del numero medio di api per alveare, calcolate con il metodo dei sestii.

Dai grafici (Grafico 18 e Grafico 19) possiamo vedere l'andamento della crescita dell'alveare, dove nella prima prova si ha il massimo sviluppo (il numero più elevato di api) nel mese di giugno. Qui purtroppo manca il dato del campionamento di novembre, quando non è stato possibile aprire le arnie per poter visionare e stimare il numero di api a causa dell'andamento climatico dato che è sconsigliato aprire gli alveari con una temperatura esterna al di sotto degli 8-10 °C. Nella seconda prova tra i due gruppi nelle stesse date il numero di api è risultato più o meno lo stesso valore, anche se il gruppo C è risultato avere un po' più api rispetto al gruppo di controllo. Normalmente il mese di giugno è il periodo in cui si ha il massimo sviluppo della colonia e in novembre la famiglia inizia già a predisporre per l'invernamento con un numero di api che è più basso rispetto a quello primaverile. Questo può essere spiegabile dal fatto che in autunno del 2012 siamo partiti da pacchi di api.

Analizzando la tabella 44 per quanto riguarda l'analisi statistica si può evincere che il numero di api all'interno delle arnie nei diversi campionamenti risulta statisticamente diverso nelle prove.

## 4.5. Covata totale

Tabella 45. Medie delle celle opercolate di covata nella colonia.

PRIMA PROVA			SECONDA PROVA		
DATA	GRUPPO		DATA	GRUPPO	
	C	A		C	A
	MEDIA	MEDIA		MEDIA	MEDIA
20/04/2011	7658,5	6823,75	08/06/2012	3100,5	3060,75
24/06/2011	5021,75	5286,75	02/11/2012	248,43	511,07
15/07/2011	2252,5	3431,75			
19/04/2012	7535,7	7833,3			

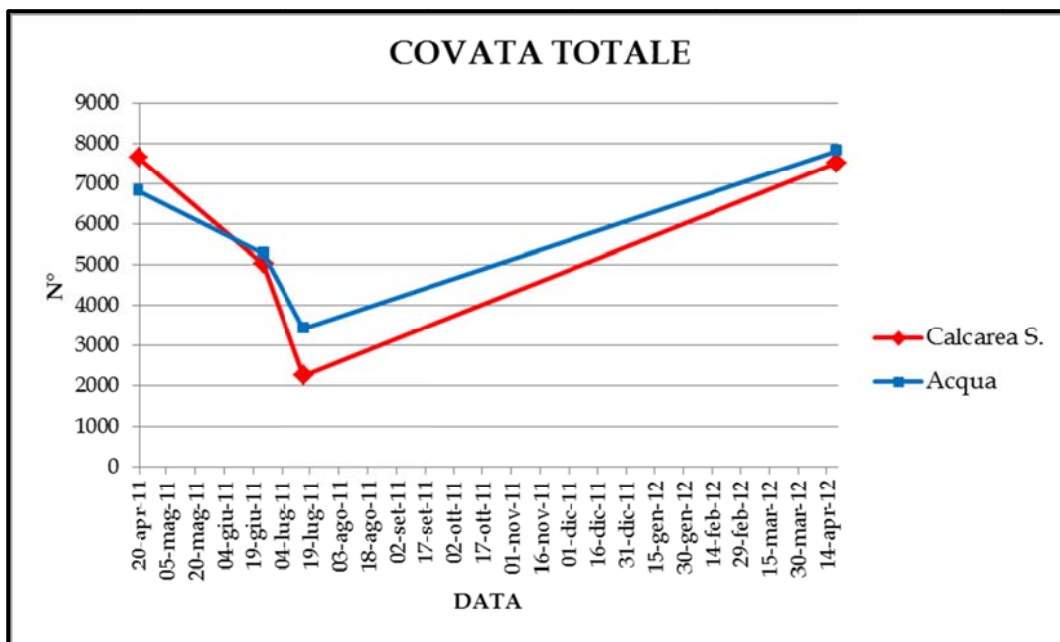


Grafico 20. Covata totale. Prima prova

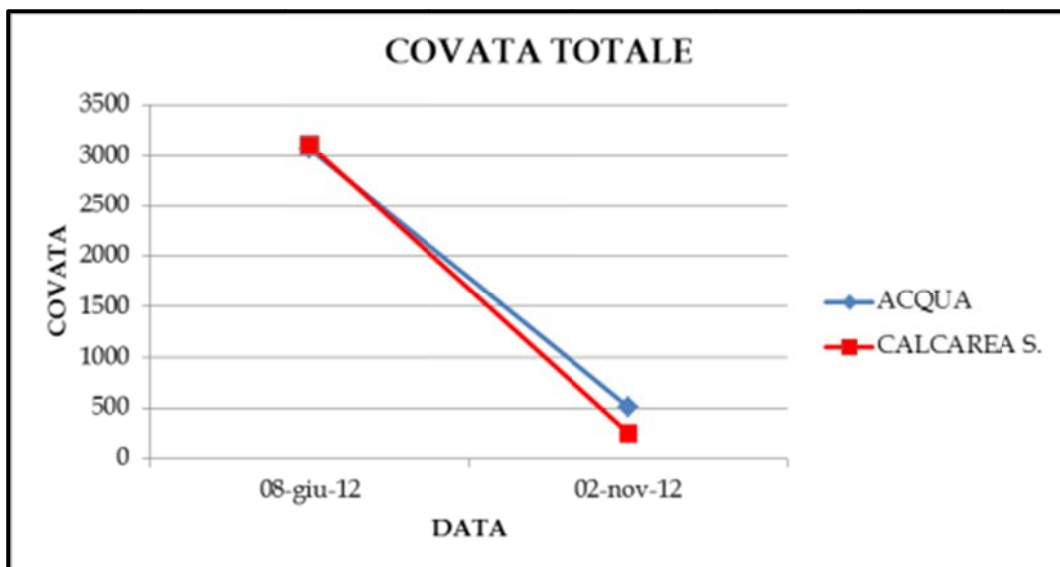


Grafico 21. Covata totale. Seconda prova

**Tabella 46. Numero osservazioni e fonti di variazione**

Fattori tra Soggetti		
		N
<b>Gruppo</b>	A	50
	C	48
<b>Prova</b>	1	68
	2	30
<b>Rilievo</b>	1	40
	2	28
	3	18
	4	12

**Tabella 47. Analisi statistica e significatività**

Fonti di Variazione	Dev. Stand.	G.L.	Varianza	F	P	
<b>Prova</b>	354500000,00	1	354500000,00	5,81	0,08	n.s.
<b>Gruppo</b>	470798,96	1	470798,96	0,22	0,64	n.s.
<b>Gruppo * Prova</b>	2872,59	1	2872,59	0,00	0,97	n.s.
<b>Rilievo(Prova)</b>	292200000,00	4	73060000,00	33,48	0,00	**
<b>Gruppo * Rilievo(Prova)</b>	19870000,00	4	4967973,06	2,28	0,07	n.s.
<b>Errore</b>	187600000,00	86	2182000,00			
<b>Totale</b>		97				

\*\* P<0,01; \* P<0,05

Dai dati ottenuti (Tabella 45) e dagli andamenti dei grafici (Grafico 20 e Grafico 21) si può evincere che nel periodo iniziale si ha una elevata la quantità di covata che poi diminuisce con la fine della stagione produttiva fino a raggiungere un forte calo, quasi un blocco di deposizione, con l'inverno (novembre/dicembre) per poi risalire nel periodo primaverile successivo. Per la prima prova non è stato possibile riportare i dati sulla quantità di covata nel periodo invernale poiché le avverse condizioni meteo non hanno permesso di controllare gli alveari. Il gruppo A ha presentato le stesse quantità di covata del gruppo C tranne che nel periodo iniziale della prima prova (7658,5 C vs 6823,75 A) maggiore nel gruppo C e nel periodo autunnale della seconda prova dove il gruppo di controllo mostra una quantità di covata quasi doppia rispetto al gruppo trattato (511 A vs 248 C). Risulta una differenza statisticamente significativa per quanto riguarda la quantità di covata tra le diverse date dei campionamenti all'interno delle prove (Tabella 47).

## 4.6. Nosema

Per studiare l'andamento di *Nosema* e virus, è stato analizzato all'inizio di ogni prova un campione (punto zero) in cui non c'era l'influenza del trattamento, che è servito da paragone con gli altri rilievi.

Al momento della redazione della presente tesi, i campioni della seconda prova analizzati sono solo quelli del punto zero (giugno 2012). Di seguito vengono riportati i risultati del *Nosema* riguardo la prima prova e al punto zero della seconda prova.

I campioni positivi dopo la caratterizzazione del tipo di *Nosema*, *N. Apis* vs *N. Ceranae* sono risultati tutti appartenenti al *N. Ceranae*.

È stata effettuata l'analisi della contingenza dei risultati della PCR-RFLP dei campioni positivi o negativi al *Nosema* in base al gruppo, nelle diverse date di campionamento.

Inoltre è stata fatta l'analisi della varianza sul numero di spore/ape.

### 4.6.1. Analisi contingenza

Tabella 48. Analisi della contingenza *Nosema ceranae*

DATA	GL	GRUPPO				SIGNIFICATIVITA'				
		A		C		CHI SQUARE				
		NEG %	POS %	NEG %	POS %	Pearson		L. ratio		
20-apr-11	1	80	20	80	20	0	n.s.	0	n.s.	
24-giu-11	1	90	10	60	40	0,1213	n.s.	0,1116	n.s.	
15-lug-11	1	90	10	100	0	0,3049	n.s.	0,2303	n.s.	
17-nov-11	1	100	0	87,5	12,5	0,3329	n.s.	0,2507	n.s.	
19-apr-12	1	100	0	57,14	42,86	0,0342	*	0,0675	n.s.	

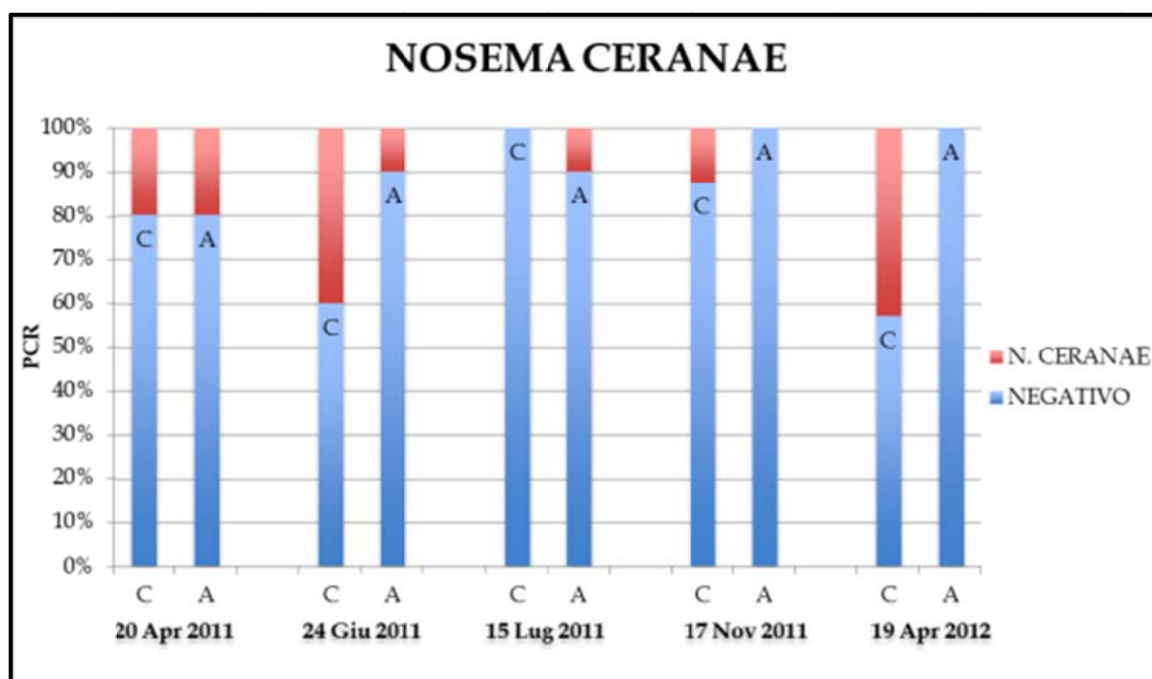


Grafico 22. Andamento del *Nosema ceranae*. Prima prova

Dal Grafico 22 risulta un andamento altalenante per quanto riguarda il gruppo trattato con Calcearea Sulphurica 200 CH per la presenza di *Nosema ceranae*. Nel primo campionamento, che è il punto zero, dove non si ha l'effetto del trattamento, l'incidenza del microsporidio è uguale in tutti e due i gruppi. Nel gruppo C in seguito, il *N. ceranae* aumenta in un primo momento (giugno 2011) poi sparisce (luglio 2011) e ricompare negli ultimi due campionamenti, mentre nel gruppo di controllo rimane quasi costante per tutto il periodo di osservazione. Questo andamento così oscillante può essere dovuto a vari fattori. Prima di tutto analizzando l'andamento del *Nosema* per ogni arnia abbiamo riscontrato che il *Nosema ceranae* non si presenta nelle stesse arnie, anzi risulta molto causale e nel campionamento finale di aprile 2012 la maggior parte delle arnie che sono morte non presentava *Nosema*. Molto probabilmente il fatto che nei vari campionamenti la presenza di *Nosema ceranae* varia e inoltre non sono sempre gli stessi alveari a presentare l'infezione può essere dovuta alla gran quantità di api presenti nell'arnia e quindi la possibile raccolta dei campioni di api non infette. I dati raccolti fino ad ora, a parte il campionamento di luglio, non possono dimostrare se il trattamento con Calcearea Sulphurica 200 CH ha effetto sulla presenza di *Nosema ceranae*. Un altro fattore che ha influito è il periodo in cui sono stati effettuati i campionamenti. In questi mesi si ha un'elevata presenza di covata, questo fa sì che le arnie, che non risultano parassitate o che hanno un andamento non continuo, hanno un numero elevato di api all'interno del nido. Infatti più api si ha meno è probabile campionare api infette, soprattutto se si prelevano api all'interno della alveare dove si ha la maggior presenza di api nutrici che sono quelle con meno infezione; inoltre se di queste api prelevate se ne campionano venti per analizzarle in laboratorio la probabilità di incontrare le spore si riduce ulteriormente. Per quanto riguarda la seconda prova, ancora non sono stati analizzati i campioni prelevati nel mese di novembre 2012 e avendo solo il risultato dell'incidenza per quanto riguarda il punto zero della seconda prova non si possono ancora comparare le due prove.

Una soluzione potrebbe essere quella di campionare le bottinatrici, che sono le api che presentano maggior infezione. Il metodo è un po' laborioso, consiste nell'andare a campionare le api nelle ore centrali della giornata, quando è maggiore il volo e chiudere temporaneamente le arnie. Le bottinatrici che rientrano nell'arnia trovando chiusa l'entrata si soffermeranno sul predellino e questo punto con l'ausilio della spazzola si possono raccogliere il numero necessario, che si aggira intorno ai 30 individui, per l'analisi.

#### 4.6.2. Analisi varianza

Tabella 49. Medie del numero di spore di *Nosema ceranae*.

PRIMA PROVA			SECONDA PROVA		
DATA	GRUPPO		DATA	GRUPPO	
	C	A		C	A
	MEDIA	MEDIA		MEDIA	MEDIA
20/04/2011	337000	815000			
24/06/2011	787000	412000			
15/07/2011	0	34000			
19/04/2012	357142,86	0			

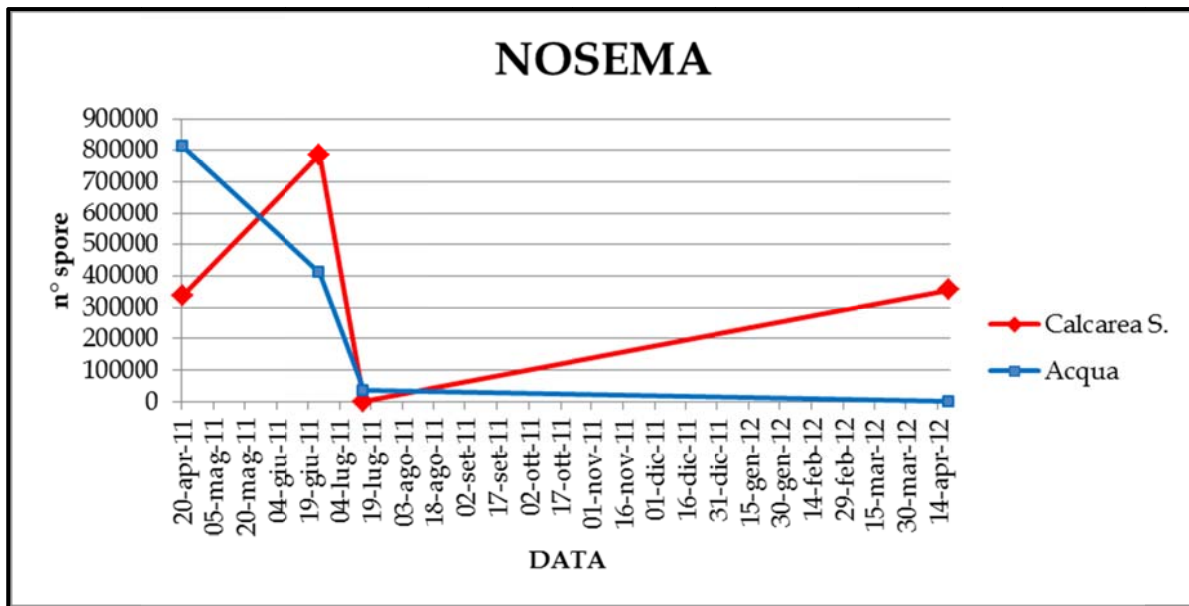


Grafico 23. Andamento delle spore di *Nosema ceranae*

Tabella 50. Numero osservazioni e fonti di variazione

Fattori tra soggetti		
		N
<b>Gruppo</b>	A	4
	C	9
<b>Rilievo</b>	1	4
	2	5
	3	1
	5	3

Tabella 51. Analisi statistica e significatività

Fonti di Variazione	Dev. Stand.	Gl	Varianza	F	P
<b>Gruppo</b>	4771000000000000	2	2386000000000000	5,52	0,03 n.s.
<b>Gruppo * Rilievo</b>	1282000000000000	4	3204000000000000	0,74	0,59 n.s.
<b>Errore</b>	3023000000000000	7	4318000000000000		
<b>Totale</b>		13			

\*\* P<0,01; \* P<0,05

Riguardo l'analisi della varianza del numero di spore ad ape è stata considerata solo la prima prova. Come si riscontra nella tabella 51 non ci sono differenze significative tra i due gruppi nei diversi rilievi della prima prova. Il numero di spore presenti non è molto costante nei vari campionamenti e come si può vedere anche dal grafico 23 l'andamento delle due curve è abbastanza discontinuo. Infatti nel gruppo di controllo si ha un andamento decrescente del numero di spore mentre il gruppo con il trattamento ha un andamento altalenante.



### 4.6.3. Risultati individuazione del *Nosema spp.* a confronto

I risultati dell'analisi dei campioni di api della nostra sperimentazione analizzate presso il laboratorio di Marchamalo, hanno mostrato, come si può vedere dalla foto della lettura della PCR-multiplex (Figura 64), che la presenza di *Nosema* appartiene solo alla specie *Nosema ceranae*.

Il *Nosema ceranae* è un patogeno naturale di *Apis cerana* (Fries, 1996). Tuttavia, dal 2006 si è rilevata la parassitazione in *A. mellifera* e questa specie è stata isolata in quasi tutta Europa, Nord e Centro America, Brasile e Giappone (Higes *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007, Klee *et al.*, 2007). L'importanza di questo salto di ospite è dovuta alla maggior virulenza di *Nosema ceranae* osservata in condizioni tanto naturali che sperimentali e nel ruolo fondamentale che ha nella sindrome da collasso degli alveari (SCC) (Higes *et al.*, 2007, 2008).

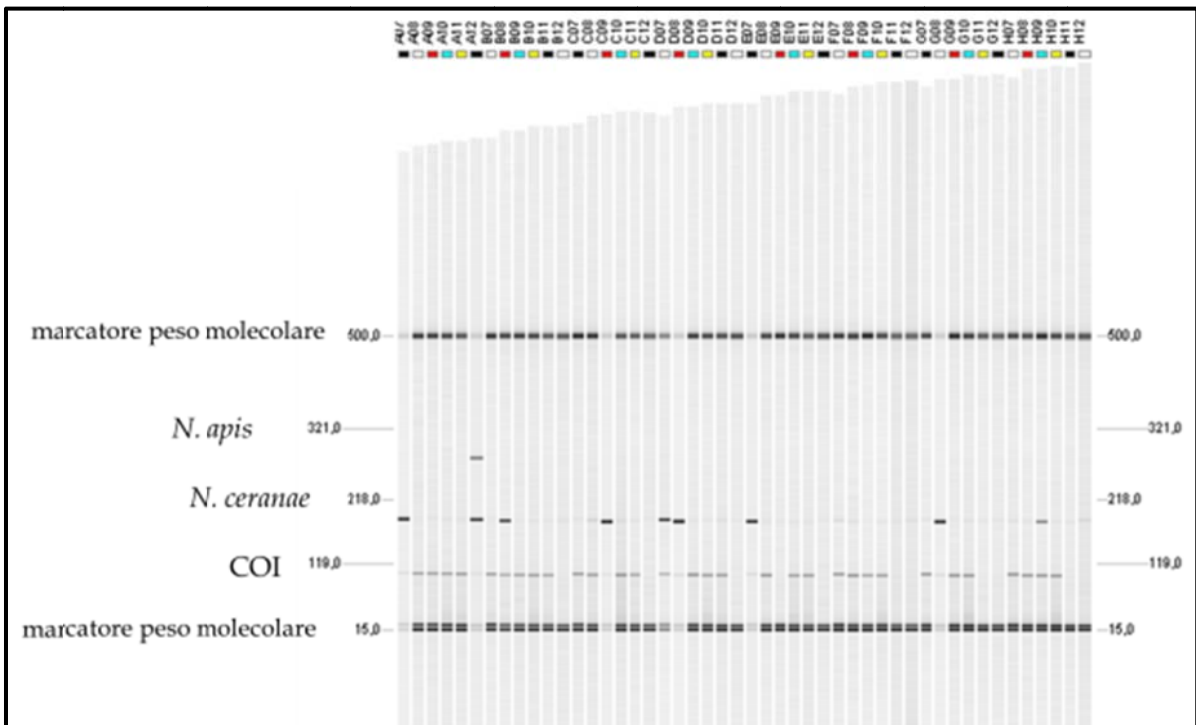


Figura 64. Lettura PCR-multiplex

#### 4.6.4. Confronto fra i laboratori di analisi

Dall'analisi della contingenza dell'incidenza della presenza o assenza di *Nosema ceranae* dei due diversi laboratori di analisi, si può vedere che (Grafico 24, Grafico 25 e Tabella 52), per quanto riguarda il campionamento di giugno del 2012, nel laboratorio dell'IZS nel gruppo C si ha un 10 % di presenza del microsporidio, mentre nella rilevazione fatta nel laboratorio del CRA Marchamalo si riscontra un 50% di presenza. Nel gruppo A invece le percentuali di incidenza sono uguali in tutti e due i laboratori di analisi.

Per quanto riguarda l'analisi del campione del mese di novembre 2012, al momento della redazione della presente tesi ancora non erano stati analizzati i campioni nel laboratorio italiano e per questo non è stato possibile fare una comparazione con i risultati del CRA Marchamalo.

Tabella 52. Analisi contingenza *Nosema ceranae* dei due laboratori di analisi.

CRA Marchamalo								IZS Fi					
DATA	GI	GRUPPO				CHI SQUARE		GRUPPO				CHI SQUARE	
		A		C		Pearson	L. ratio	A		C		Pearson	L. ratio
NEG %	POS %	NEG %	POS %	NEG %	POS %			NEG %	POS %				
14/06/12	18	70	30	50	50	0,36	0,35	70	30	90	10	0,26	0,25
08/11/12	13	85,71	14,29	87,5	12,5	0,91	0,91						

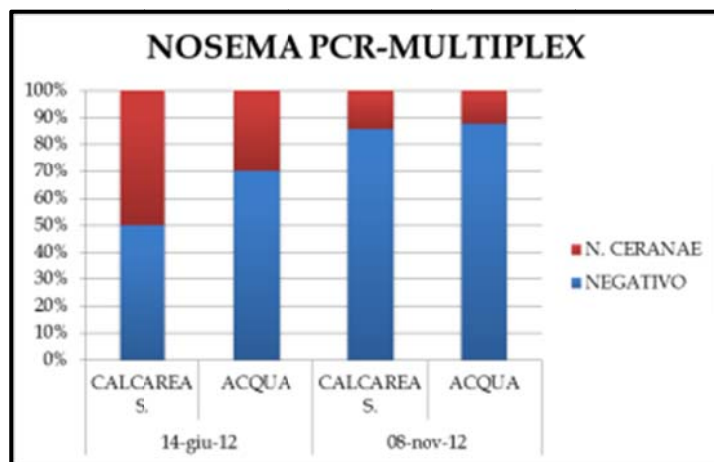


Grafico 24. Incidenza *Nosema ceranae* laboratorio CRA Marchamalo

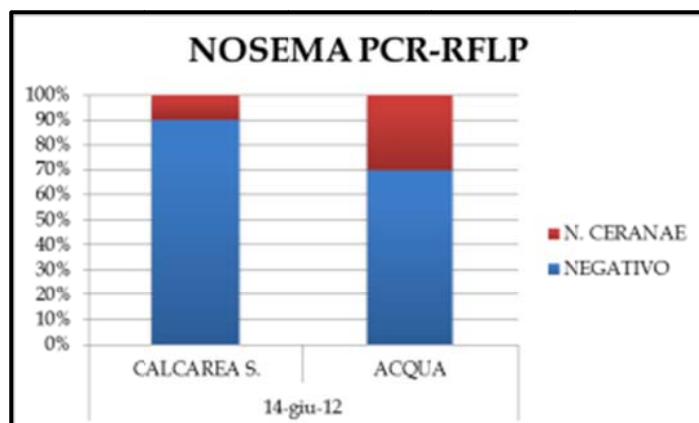


Grafico 25. Incidenza *Nosema ceranae* laboratorio IZS

Avendo analizzato le api dallo stesso campione in tutti e due i laboratori, le differenze riscontrate nell'incidenza del *N. ceranae* probabilmente sono dovute ai diversi protocolli di analisi. Inoltre nel laboratorio di Marchamalo (Spagna) è stato possibile eseguire la caratterizzazione genetica su tutti i campioni di api mentre, nel laboratorio in Italia sono stati processati solo i campioni positivi al controllo microscopico.

## 4.7. Virus

Sono note da tempo la correlazione tra varroa e infezioni virali ed al ruolo che essa ha come vettore e attivatore di virus. La varroa produce solo ferite nell'esoscheletro, rotture meccaniche, tutto il resto dei problemi è causato dai virus i quali nonostante siano i veri responsabili della morte delle api sono ampiamente sottovalutati dall'apicoltore. I virus associati all'acaro sono in particolare il virus delle ali deformi (DWV) e il virus della paralisi acuta (ABPV). Studi del Centro svizzero di ricerche (Agroscope Liebefeld-Posieux ALP) approfondiscono la relazione tra mortalità invernale di famiglie e la presenza di ABPV e DWV. Questi possono giocare un ruolo essenziale anche per ciò che riguarda la mortalità invernale delle famiglie. Inoltre la simultanea infezione è risultata molto frequente in famiglie deboli o spopolate o vicine al collasso. La ridotta aspettativa di vita delle api colpite da virosi è nota da tempo. Questo è anche confermato da diversi studi dove la parassitizzazione da varroa è collegata ad un'alta presenza del virus delle ali deformate (DWV) e ciò dà luogo ad una notevole diminuzione dell'aspettativa di vita dell'ape (Yang e Cox-Foster, 2007). La varroa ha un ruolo fondamentale anche per quanto riguarda danni al comportamento di volo, all'orientamento oltre che all'apprendimento (Kralj *et al.*, 2006). Il lavoro di Zhang *et al.*, 2012 dimostrata che il BQCV è, dopo il virus delle ali deformate DWV, il virus più presente negli alveari. Negli alveari, la comparsa di situazioni sintomatiche derivanti da BQCV risulta collegata alla presenza di Nosema. Quando l'incidenza di Nosema è più alta in primavera ed estate, l'infezione da BQCV risulta maggiormente prevalente ( presente ) nelle api ( Bailey *et al.*, 1981). Lo stesso Bailey ha osservato (1982) che il BQCV si moltiplica rapidamente nelle api adulte infette da Nosema. Si ritiene che siano le nutrici a trasmetterlo alle larve reali e anche alla covata da operaia attraverso le secrezioni ghiandolari (pappa etc.) (Bailey 1982) che costituiscono la nutrizione. Il Nosema infetta i tessuti dello stomaco delle api adulte aumentando la suscettibilità del canale alimentare alle infezioni da BQCV. Anche il virus della paralisi acuta delle api (ABPV) che uccide l'ape in maniera asintomatica risulta molto diffuso. La correlazione fra mortalità invernale delle famiglie e virus ABPV è stata verificata da una ricerca tedesca (Siede *et al.*, 2008-12). È stata studiata la relazione tra il Virus Kashmir quello della covata a sacco (SBV) e la varroa. I risultati dimostrano che KBV e SBV possono co-infettare le api confermando che l'acaro può fungere da vettore di infezioni virali multiple.

Per quanto riguarda i virus possiamo dire che il campionamento di 20 aprile 2011 rappresenta il punto zero dove si valuta l'infestazione iniziale delle arnie da comparare l'andamento dei virus del resto della prova. Riguardo la seconda prova invece al momento sono stati analizzati solo i virus del primo campionamento, il punto zero per la seconda prova.

Dai dati ottenuti è stata effettuata l'analisi della contingenza dei risultati della PCR-TEM dei campioni positivi o negativi ai Virus in base al gruppo sperimentale, nelle diverse date di campionamento. È da sottolineare che è stata valuta l'incidenza dei virus quindi l'assenza o la presenza, non la quantità all'interno dei nostri campioni. Di seguito vengono riportati i risultati riguardanti ogni virus.

#### 4.7.1. ABPV Virus Paralisi Acuta

Tabella 53. Analisi contingenza ABPV. Prima prova

DATA	GL	GRUPPO				SIGNIFICATIVITA'			
		A		C		CHI SQUARE			
		NEG %	POS %	NEG %	POS %	Pearson		Likelihood ratio	
20-apr-11	18	0	100	100	0	<,0001	***	<,0001	***
24-giu-11	18	30	70	0	100	0,0603	n.s.	0,0303	*
15-lug-11	18	0	100	80	20	0,0003	***	<,0001	***
17-nov-11	13	0	100	0	100	0		0	
19-apr-12	11	100	0	100	0	0		0	

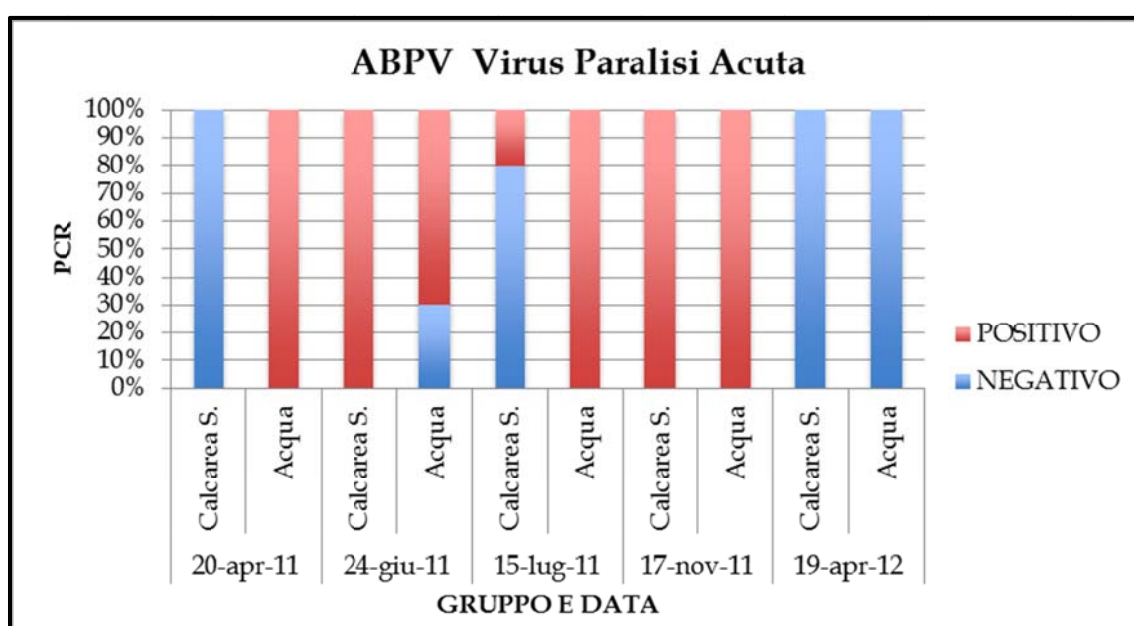


Grafico 26. Incidenza ABPV. Prima prova

Riguardo il virus della paralisi acuta possiamo dire che il campionamento punto zero di aprile 2011 ci sono delle differenze significative nei due gruppi sulla presenza del virus, infatti guardando il grafico si può vedere che i 2 gruppi la presenza del virus è opposta ( C 0% e A 100%). Nei campionamenti successivi si notano inversioni continue della presenza del virus fino ad arrivare al mese di aprile 2012, la fine della prima prova dove si nota che il gruppo trattato con Calcarea Sulphurica 200 CH ha la stessa percentuale di presenza di virus rispetto al punto zero 0%, mentre il gruppo di controllo da 100% diventa 0%. Quindi in questo caso si può dedurre che la Calcarea Sulphurica 200 CH sembra non aver effetto sul virus della paralisi acuta.

#### 4.7.2. CBPV Virus Paralisi Cronica

Tabella 54. Analisi contingenza CBPV. Prima prova

DATA	GL	GRUPPO				SIGNIFICATIVITA'			
		A		C		CHI SQUIRE			
		NEG %	POS %	NEG %	POS %	Pearson		Likelihood ratio	
20-apr-11	18	90	10	20	80	0,0017	**	0,0009	***
24-giu-11	18	80	20	100	0	0,136	n.s.	0,0835	n.s.
15-lug-11	18	100	0	70	30	0,0603	n.s.	0,0303	*
17-nov-11	13	100	0	87,5	12,5	0,938	n.s.	1,32	n.s.
19-apr-12	11	83,33	16,67	85,71	14,29	0,013	n.s.	0,014	*

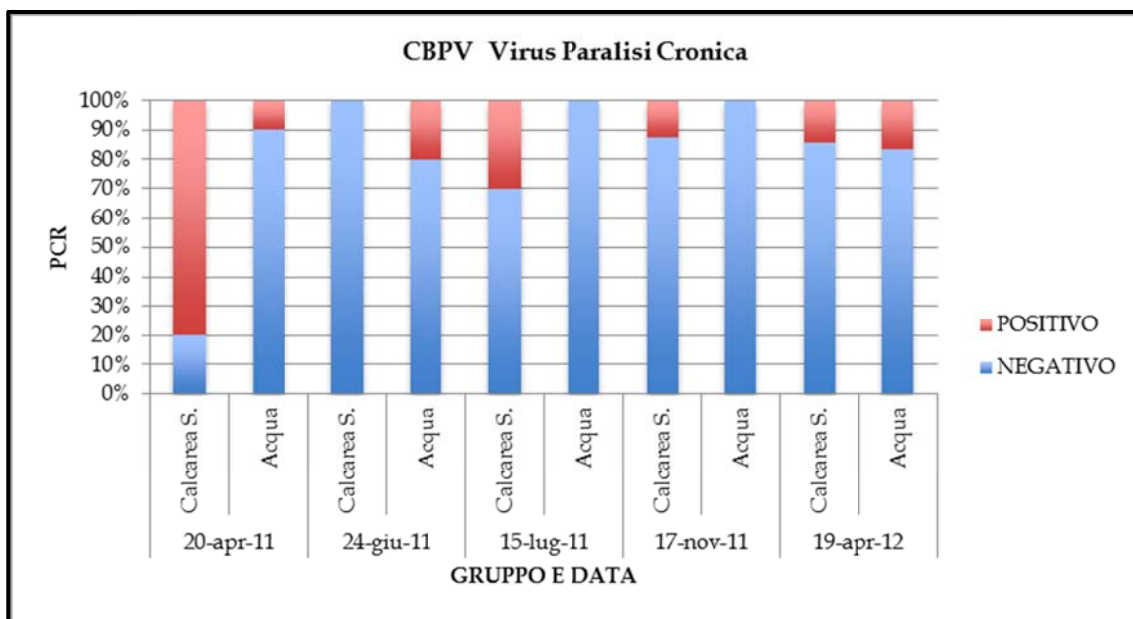


Grafico 27. Incidenza CBPV. Prima prova

Riguardo il virus della paralisi cronica nel campionamento di aprile 2011, il punto zero, si nota che si ha una differenza significativa riguardo alla presenza del virus all'interno dei due gruppi: il gruppo trattato con Calcarea Sulphurica 200 CH mostra una incidenza di infezione molto più alta rispetto al gruppo di controllo. Nei campionamenti successivi si può notare che nel gruppo trattato con il rimedio la presenza del virus tende a diminuire mentre nel gruppo di controllo la presenza rimane più o meno costante. In questo caso possiamo dire che la Calcarea Sulphurica 200 CH potrebbe aver un effetto positivo sul virus della paralisi cronica, diminuendo l'incidenza di infezione.

### 4.7.3 DWV Virus Ali Deformi

Tabella 55. Analisi contingenza DWV. Prima prova

DATA	GL	GRUPPO				SIGNIFICATIVITA'			
		A		C		CHI SQUARE			
		NEG %	POS %	NEG %	POS %	Pearson		Likelihood ratio	
20-apr-11	18	10	90	0	100	0,3049	n.s.	0,23203	n.s.
24-giu-11	18	0	100	0	100				
15-lug-11	18	0	100	100	0	<,0001	***	<,0001	***
17-nov-11	13	0	100	0	100				
19-apr-12	11	66,67	33,33	42,86	57,14	0,737	n.s.	0,746	n.s.

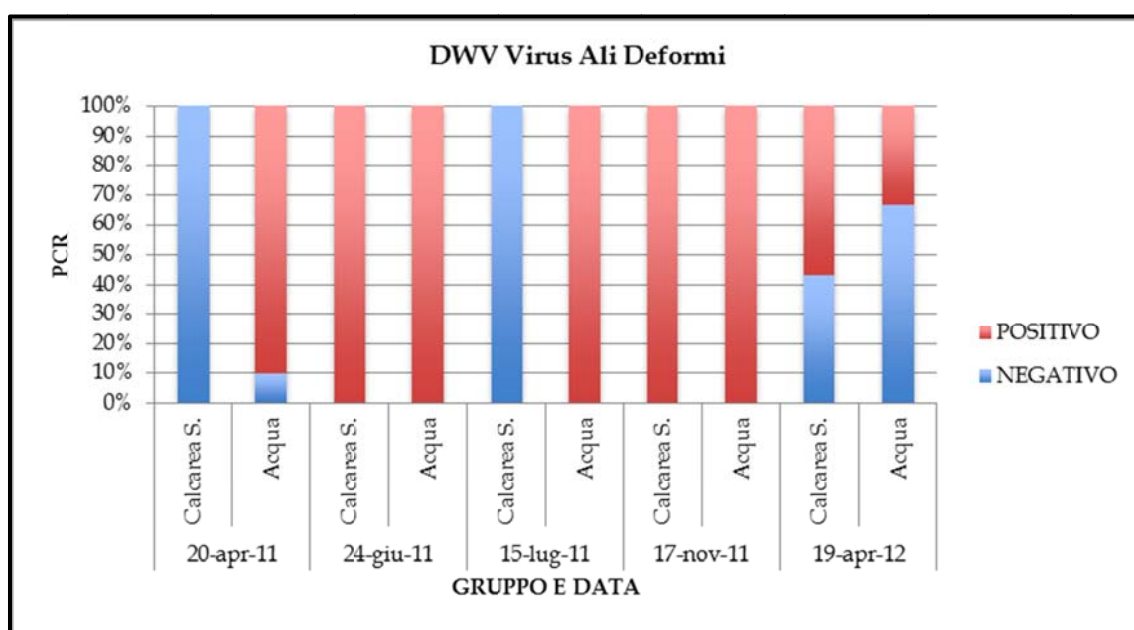


Grafico 28. Incidenza DWV. Prima prova

Riguardo al virus delle ali deformi nel primo campionamento, il punto zero della prima prova, si può notare che per quanto riguarda il gruppo trattato con Calcarea Sulphurica 200 CH non si ha la presenza del virus mentre del gruppo trattato con Acqua si ha un'incidenza del 90%. Nei campionamenti successivi la presenza del virus si manifesta in tutti e due i gruppi con un'incidenza molto elevata, a parte nel mese di luglio dove nel gruppo trattato con il rimedio non si ha la presenza del virus. Alla fine della prova possiamo notare che i livelli di presenza del virus sono più o meno paritari nei due gruppi. Quindi in questo caso possiamo dire che la Calcarea Sulphurica 200 CH sembra non apportare effetti per quanto riguarda il virus delle ali deformi.



#### 4.7.4. BQCV Virus Cella Reale Nera

Tabella 56. Analisi contingenza BQCV. Prima prova

DATA	GL	GRUPPO				SIGNIFICATIVITA'			
		A		C		CHI SQUARE			
		NEG %	POS %	NEG %	POS %	Pearson		Likelihood ratio	
20-apr-11	18	0	100	30	70	0,0603	n.s.	0,0303	*
24-giu-11	18	80	20	30	70	0,0246	*	0,0213	*
15-lug-11	18	70	30	100	0	0,0603	n.s.	0,0303	*
17-nov-11	13	85,71	14,21	75	25	0,268	n.s.	0,273	n.s.
19-apr-12	11	83,33	16,67	100	0	1,264	n.s.	1,644	n.s.

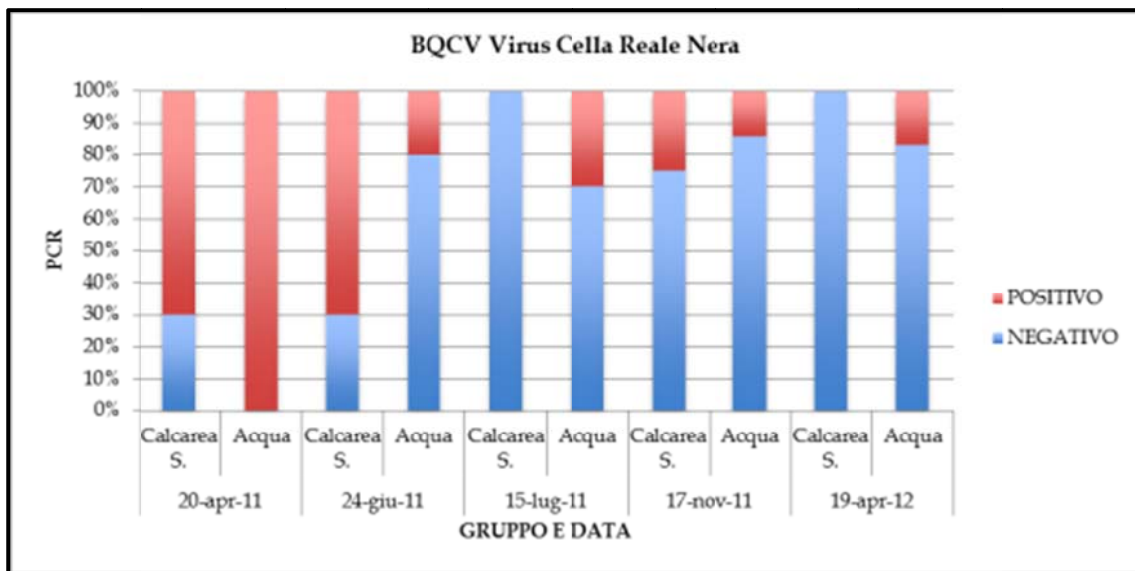


Grafico 29. Incidenza BQCV. Prima prova

Riguardo il virus della cella nera nel campionamento punto zero di aprile 2011, si ha una differenza significativa tra i due gruppi dove il gruppo trattato con Calcarea Sulphurica 200 CH mostra un livello di incidenza inferiore a quello del gruppo di controllo. Nei campionamenti successivi la tendenza della presenza del virus è quella di diminuire in tutti e due i gruppi fino a arrivare all'ultimo campionamento dove ambedue i gruppi risultano bassi (0% in C e 16,67% in A). Dato che l'andamento è simile nei due gruppi, si può dire che la Calcarea Sulphurica 200 CH non ha avuto effetto sul controllo del virus della cella reale nera.

#### 4.7.5. SBV Virus Covata a Sacco

Tabella 57. Analisi contingenza SBV. Prima prova

DATA	GL	GRUPPO				SIGNIFICATIVITA'			
		A		C		CHI SQUIRE			
		NEG %	POS %	NEG %	POS %	Pearson		Likelihood ratio	
20-apr-11	18	50	50	10	90	0,051	n.s.	0,0437	*
24-giu-11	18	100	0	0	100	<,0001	***	<,0001	***
15-lug-11	18	0	100	100	0	<,0001	***	<,0001	***
17-nov-11	15	100	0	87,5	15,5	0,938	n.s.	1,32	n.s.
19-apr-12	11	0	100	0	100				

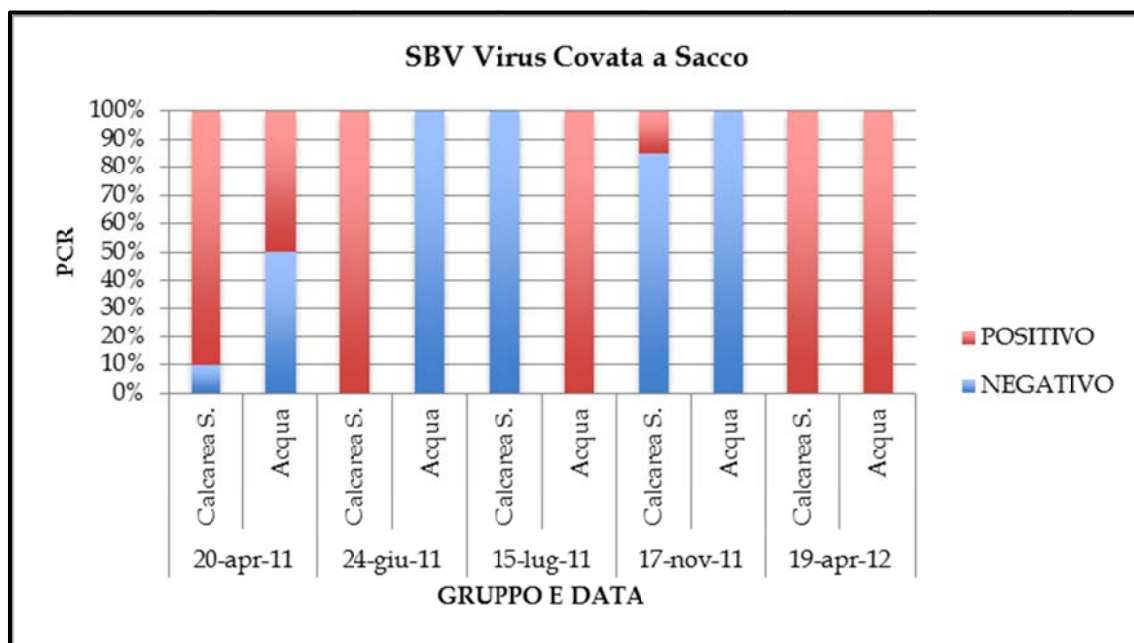


Grafico 30. Incidenza SBV. Prima prova

Riguardo il virus della covata a sacco nel campionamento di aprile 2011, il punto zero, il gruppo trattato con Calcareo Sulphurica 200 CH presenta una incidenza del virus superiore rispetto al gruppo trattato con acqua. Nei campionamenti successivi l'andamento della presenza del virus è molto altalenante. Nell'ultimo campionamento della prima prova però si riscontra che in tutti e due i gruppi la presenza del virus ha un'incidenza del 100%. Quindi si può dire che il rimedio omeopatico anche in questo caso non ha influito sull'incidenza del virus, visto che si mantiene costante nei campionamenti iniziale e finale nel gruppo trattato e aumenta nel gruppo di controllo.

#### 4.7.6. KBV Virus del Kashmiri

Tabella 58. Analisi contingenza KBV. Prima prova

DATA	GL	GRUPPO				SIGNIFICATIVITA'			
		A		C		CHI SQUARE			
		NEG %	POS %	NEG %	POS %	Pearson		Likelihood ratio	
20-apr-11	18	100	0	100	0				
24-giu-11	18	100	0	100	0				
15-lug-11	18	100	0	100	0				
17-nov-11	15	100	0	100	0				
19-apr-12	11	100	0	100	0				

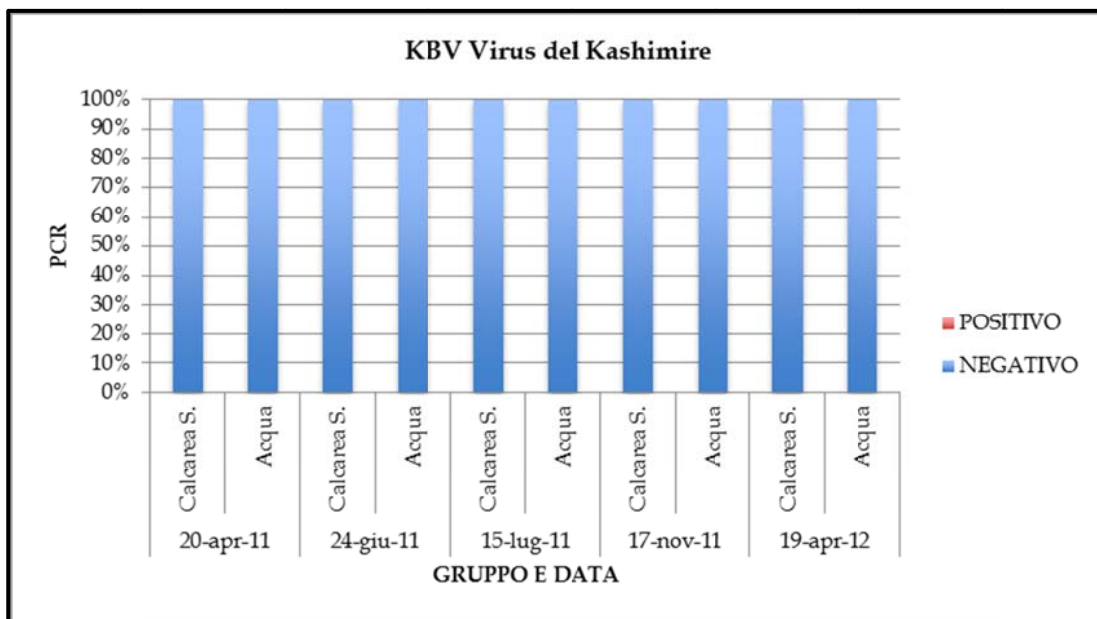


Grafico 31. Incidenza KBV. Prima prova

Per quanto riguarda il virus del kashimire, questo non è stato riscontrato in nessun caso nei campioni analizzati.

#### 4.7.7. IAPV Virus Israeliano Paralisi Acuta

Tabella 59. Analisi contingenza IAPV. Prima prova

DATA	GL	GRUPPO				SIGNIFICATIVITA'			
		A		C		CHI SQUARE			
		NEG %	POS %	NEG%	POS %	Pearson		Likelihood ratio	
20-apr-11	18	60	40	100	0	0,0253	*	0,0105	**
24-giu-11	18	90	10	80	20	0,5312	n.s.	0,5212	n.s.
15-lug-11	18	40	60	100	0	0,0034	**	0,0009	**
17-nov-11	13	87,71	14,29	12,5	87,5	8,04	n.s.	8,958	n.s.
19-apr-12	11	50	50	85,71	14,29	1,935	n.s.	1,989	n.s.

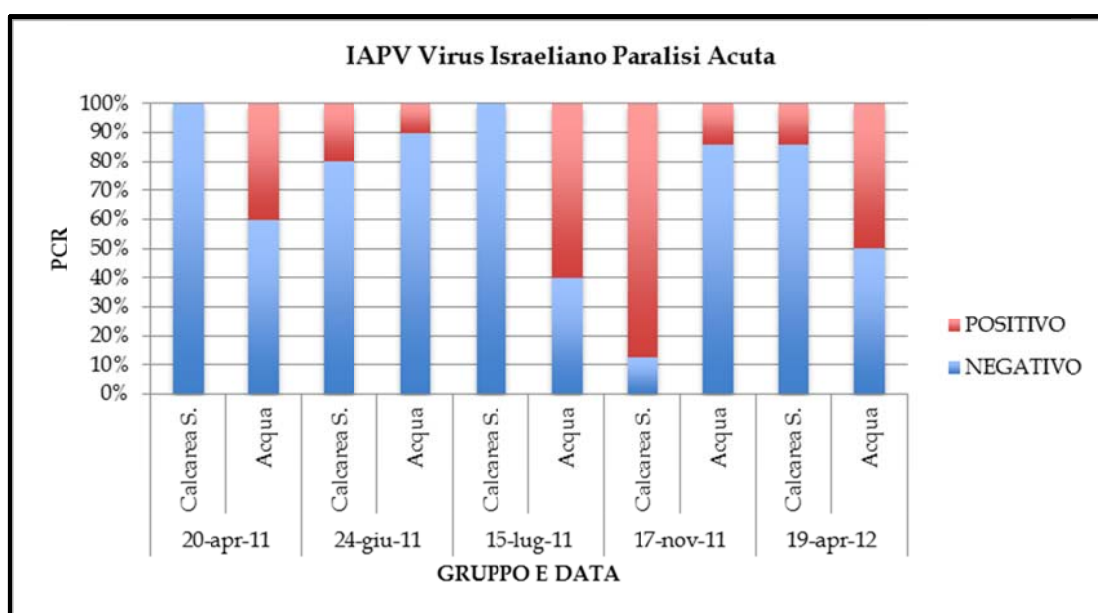


Grafico 32. Incidenza IAPV. Prima prova

Riguardo al virus della paralisi acuta, nel primo campionamento di aprile 2011, il punto zero, si ha una differenza significativa tra i due gruppi, dove il gruppo di controllo, trattato con acqua risulta avere un'incidenza maggiore rispetto al gruppo trattato con Calcarea Sulphurica 200 CH che non presenta il virus. Nei campionamenti successivi nel gruppo trattato con il rimedio l'incidenza rimane costante, a livelli molto bassi, tranne che nel campionamento di novembre, mentre nel gruppo di controllo il virus rimane presente in tutti i campionamenti. Nell'ultimo campionamento si nota che l'incidenza del virus è molto simile a quella del punto zero. Questo ci può far pensare che la Calcarea Sulphurica 200 CH non ha avuto effetti positivi sul virus della paralisi acuta.

## 5. CONCLUSIONI

La seconda prova terminerà nell'aprile 2013 e quindi i risultati sono stati analizzati soltanto fino a novembre 2012.

Per quanto riguarda la varroa in accordo con la letteratura, e con quanto da noi atteso, il rimedio omeopatico non ha eliminato il parassita. I dati fanno pensare che si sia ottenuto un naturale equilibrio tra il parassita e il suo ospite nel gruppo trattato. D'altra parte anche i parassiti, in questo caso gli acari, sono degli animali e si ritiene che possano subire anche loro l'influenza positiva dei rimedi omeopatici. Riguardo la caduta naturale della varroa, in tutte e due le prove, nelle diverse date in cui sono stati effettuati i monitoraggi, si riscontrano cadute significativamente diverse nei due gruppi, questo starebbe quindi ad indicare che, soprattutto dopo il blocco di covata e il trattamento con Api-bioxal, nelle famiglie trattate con Calcarea Sulphurica 200 CH l'infestazione è risultata statisticamente inferiore.

Le sostituzioni di regine/sciamature avute nel periodo precedente al blocco di covata indotto avrebbero potuto causare differenze nella crescita di varroa, solo parzialmente rilevate con la caduta naturale, ma eliminando queste famiglie dall'analisi statistica il risultato è rimasto lo stesso.

Nelle nostre due prove, il gruppo C ha quindi dimostrato un livello di infestazione significativamente inferiore rispetto al gruppo A dopo blocco di covata e successivo trattamento con Api-Bioxal, il che dimostra la validità visto che il risultati si sono ripetuti nei due anni di prova.

Una plausibile spiegazione può essere che le api hanno raggiunto una sorta di equilibrio con il loro parassita e quindi la minore caduta è può essere dovuta al fatto che ci sono meno varroe all'interno della colonia.

Questa conclusione è comunque confortata dalla letteratura (Ruiz Espinoza and Guerrero Salinas 2003, 2004), e fa pensare alle api come animali estremamente sensibili ed adatti alla sperimentazione di rimedi omeopatici e naturali. Probabilmente i ricercatori italiani (Persano Oddo and Marinelli, 2002) che avevano sperimentato per la prima volta il rimedio della Omeonatus, si erano aspettati troppo: i rimedi omeopatici sembrano funzionare meglio non da soli, come loro ritenevano, ma solo se accompagnati da trattamenti biomeccanici (blocco di covata e Api-Bioxal), secondo la filosofia di quella che attualmente viene chiamata 'medicina integrata'.

Riguardo le altre variabili che abbiamo campionato, per la caduta naturale della varroa media giornaliera nei 21 gg di osservazione, si è visto che questa è diversa tra i due gruppi nelle differenti date in cui è stato effettuato il monitoraggio nelle due prove. Se si considerano i dati dell'analisi statistica senza i valori che potrebbero influire sulla caduta, togliendo alveari che hanno avuto regine vergini, sostituzioni, sciamature (regine non marcate), le differenze altamente significative si hanno tra i diversi rilievi che si sono effettuati nelle due prove e non tra i due gruppi sperimentali.

Per la conta degli acari su api adulte, anche se ci sono delle differenze tra i singoli campionamenti, il numero delle varroe contate all'interno dei due gruppi non differisce statisticamente. Infatti le differenze del numero di varroe incontrate nei diversi rilievi differisce statisticamente nelle prove. Inoltre se si tolgono gli alveari che hanno avuto regine vergini, sostituzioni, sciamature (regine non marcate), il risultato non cambia.

Il peso delle arnie e la produzione di miele, non risultano statisticamente diversi i due gruppi sperimentali, ma sono ci sono differenze significative per quanto riguarda i rilievi nei diversi campionamenti per le prove. Questo vuol dire che le arnie pesano e hanno prodotto miele in maniera statisticamente diversa nei vari campionamenti della prove.

Il numero di api totale e la quantità di covata nelle colonie non differisce all'interno dei due gruppi A e C. Per tutte e due le variabili si riscontrano differenze significative per le diverse date dei campionamenti all'interno delle prove, cioè i diversi rilievi effettuati sono statisticamente differenti a seconda della data in cui sono stati effettuati i campionamenti.

Riguardo il *Nosema*, dai campioni analizzati è stato verificato che questo appartiene sempre alla specie *Nosema ceranae*. In nessun campione è stato riscontrato *Nosema apis*. Il *Nosema ceranae* è un patogeno naturale di *Apis cerana* originaria dell'Asia. Recentemente (dal 2006) si è rilevata la parassitazione in *A. mellifera* e questa specie è stata isolata in quasi tutta Europa e in altre parti del mondo. Questo salto di ospite può spiegare la maggior virulenza che *Nosema ceranae* presenta in condizioni tanto naturali che sperimentali, dovuto alla sua capacità di completare il ciclo biologico a differenti temperature e nel ruolo fondamentale che riveste nella sindrome da collasso degli alveari. Non si possono ancora compare le due prove, però dai risultati della prima prova si può evincere che per testare se il trattamento con il rimedio omeopatico è efficace anche su questa infestazione delle api ci sono diverse variabili che non abbiamo considerato e che quindi c'è bisogno di ulteriori studi per vedere se *Calcarea Sulphurica* 200 CH può rafforzare le famiglie anche nei confronti di questa patologia.

Durante il periodo passato in Spagna presso il Centro Regional Apicola di Marchamalo, sono stati analizzati i campioni della nostra sperimentazione, che anche in questo caso sono risultati tutti appartenenti alla specie *Nosema ceranae*. Dal confronto dei risultati delle analisi dei due diversi laboratori, è risultato che quelli del laboratorio del CRA di Guadalajara sono stati effettuati con metodiche più sensibili di quelle dell'IZSLT. Il risultato è probabilmente dovuto al differente protocollo utilizzato e anche alla maggior disponibilità di mezzi ed attrezzature di cui il laboratorio di Marchamalo dispone.

Riguardo ai virus analizzati in base all'andamento dei dati dell'analisi della contingenza, anche se ci sono delle differenze significative tra le diverse date dei campionamenti, si è riscontrata una presenza altalenante nei vari rilievi. Infatti di

tutti i virus monitorati solo riguardo al Virus della paralisi cronica si riscontra un possibile effetto della Calcarea Sulphurica 200 CH. L'incidenza dei virus è stata valutata sulla positività o negatività del campione al virus e non in base alla quantità. I possibili effetti che il rimedio omeopatico può avere devono essere correlati prima di tutto con il tipo di api che si vanno a campionare. Inoltre si deve considerare anche la relazione che questi virus hanno con gli altri patogeni, soprattutto rispetto alla varroa che è correlata a DWV e ABPV e il Nosema con BQCV. Nonostante questi virus siano stati riscontrati nei nostri campioni, l'andamento è stato molto variabile, e quindi non si può affermare che il rimedio abbia degli effetti sui virus.

La caduta della varroa, come il Nosema e i virus sono influenzati da moltissime variabili, quali clima, gestione dell'apiario, sostituzione della regina e quindi susseguente blocco di covata naturale rispetto alle altre famiglie della prova. Ancora si devono raccogliere tutti i dati della seconda prova, che finirà nella primavera 2013, e solo allora si potrà avere un quadro generale e completo e avere una comparazione definitiva dei due anni di sperimentazione effettuati.

Il lavoro svolto ha permesso di mettere a punto un modello di monitoraggio sanitario degli alveari con metodiche che vanno da tecniche semplici (come la misurazione del peso in campo, metodo dei sestii) a metodi più sofisticati come le analisi di laboratorio (conta delle varroa su api adulte, conta delle spore di Nosema) fino alla metodologie di biologia molecolare per l'individuazione genetica delle varie specie di patogeni (Nosema e Virus).

In futuro ci piacerebbe testare altri rimedi omeopatici e/o altre potenze, se riusciremo a reperire i finanziamenti necessari, tenendo conto che le prove sono impegnative, perché per ogni gruppo sperimentale non si può avere un numero inferiore a dieci arnie per ottenere un buon risultato e che si deve partire da famiglie per quanto possibile prive di patogeni con regine coetanee e sorelle.



## 6. BIBLIOGRAFIA

Accorti M. (1985). Valutazione numerica degli adulti di *Apis mellifera* L. : variazioni e modifiche al metodo dei sestini. *Apicoltura*, 1 : 63-73.

Accorti M. (2000). Impollinatori, economia e gestione delle risorse. Ed. Pinzauti M. *Api e impollinazione*, Regione Toscana, Dipartimento Sviluppo Economico Firenze Italy. 219-231.

Adl S.M., Simpson A.G.B., Farmer M.A., Andersen R.A., Anderson O.R. , Barta J.R., Bowser S.S., Brugerolle G., Fensome R.A., Fredericq S., James T.Y., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C.E., Lewis L.A., Lodge J., Lynn D.H., Mann D.G., McCourt R.M., Mendoza L., Moestrup O., Mozley-Standridge S.E., Nerad T.A., Shearer C.A., Smirnov A.V., Spiegel F.W., Taylor M.F.J.R. (2005). The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists, *J. Eukar. Microbiol.* 52, 399-451.

Allen M, Ball B (1996). The incidence and world distribution of honeybee viruses. *Bee World* 77: 141-162

Amdam G.V., Omholt W. (2003). The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis, *J. Theor. Biol.* 223, 451-464.

Amsler T., Schmid L. (2010). Controllo della varroa in apicoltura biologica. FiBL.

Anderson D.L., Trueman J.W.H. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species, *Exp. Appl. Acarol.* 24, 165-189.

Antúnez K., Martín-Hernández R., Prieto L., Meana A, Zunino P., Higes M. (2009). Immune-suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia), *Environ. Microbiol.* 11, 2284-2290.

Avilez J. P., Araneda X. (2007). Hatching stimulation in bees (*Apis mellifera*), *Arch. Zootec.* 56, 885-893.

Baeley L., Ball B. (1991). *Honey bee pathology*. Accademy Press London , pp 193

Bailey L (1982). Viruses of honeybees. *BeeWorld* 63, 165-173

Bailey L, Ball BV, Perry JN (1981). The prevalence of viruses of honey bees in Britain. *Ann*

Bailey L. (1953). The treatment of *Nosema* disease with fumagillin, *Bee World* 34, 136-137.

Bailey L. (1954). The control of *Nosema* disease, *Bee World* 35, 111-113.

Bailey L. (1955). The epidemiology and control of Nosema disease of the honeybee, *Ann. Appl. Biol.* 43, 379–389.

Bakonyi T., Farkas R., Szendrői A., Dabos-Kovács M., Rusvai M. (2002). Detection of acute bee paralysis virus by RT-PCR in honey bee and *Varroa destructor* field sample: rapid screening of representative Hungarian apiaries. *Apidologie*. 33: 63-74.

Becnel J., Andreadis T. (1999). The Microsporidia and Microsporidiosis, Wittner and Weiss (Eds.), Washington DC, ASM press.

Békési L., Szalai Mátyás E., Harka L., Hegedus D., Albert A. (2009). Medication possibilities against new age-nosemosis, Proc. Workshop “Nosema disease: lack of knowledge and work standardization” (COST Action FA0803) Guadalajara, <http://www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online> (accessed on 20 Nov. 2009).

Bellavite P., Signorini A. (1993). *Fondamenti Teorici e Sperimentali della Medicina Omeopatica*. Nuova Ipsa Editore, Palermo pagg 306.

Berényi O., Bakonyi T., Derakhshifar I., Koglböcker H., Nowotny N. (2006). Occurrence of Six Honeybee Viruses in Diseased Austrian Apiaries. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2414-2440.

Blanchard P., Olivier V., Iscache A.L., Celle O., Schurr C.F., Lallemand P., Ribière M. (2008). Improvement of RT-PCR detection of chronic bee paralysis virus (CBPV) required by the description of genomic variability in French CBPV isolates. *J. Invertebr. Pathol.* 97: 182-185.

Blanchard P., Schurr F., Celle O., Cougoule N., Drajnudel P., Thiéry R., Faucon J.P., Ribière M. (2008). First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybee (*Apis Mellifera*).

Botías C., Martín-Hernández R., Garrido-Bailón E., Higes M., Anderson D.L. (2009b). *Nosema ceranae* is able to infect different *Apis* species, Proc. 41st Congress Apimondia Montpellier, p. 161.

Botías C., Martín-Hernández R., Meana A., Higes M. (2009a). *Nosema* spp. Infection in Spain: Consequences in colony productivity and vitality, Workshop “Nosema disease: lack of knowledge and work standardization” (COST Action FA0803) Guadalajara, <http://www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online> (accessed on 20 Nov. 2009).

Bourgeois A.L., Rinderer T.E., Beaman L.D., Danka R.G. (2010). Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee, *J. Invertebr. Pathol.* 103, 53–58.

Bowen W., Martin S.J., Guann A. (2002). The transmission of the Deform Wing virus between honeybees (*Apis mellifera*) by the ectoparasitic mite varroa jacobsoni Oud. Internet

Brooks D., Hoberg E.P. (2007). How will global climate change affect parasites? Trends Parasitol. 23, 571- 574.

Buchler R., Drescher T. (1994). Correlazione fra sviluppo di varroa e periodo di opercolazione. Jar 29/3

Bush A.O., Fernandez J.C., Esch G.W., Seed J.R. (2001). Parasitism: The Diversity and Ecology of Animal Parasites, Cambridge University Press, Cambridge.

Calderón A., L. E. (2008). Control de Varroa (*Varroa destructor*) en abejas (*Apis mellifera*) mediante productos homeopáticos y químicos. Departamento de Zootecnia. UACH. Chapingo, México. p.49.

Calderone N. W. (2000). Varroa Mite Infestations in Elevated Honey Bee Brood Cells: Effects of Context and Caste. Journal of Insect Behavior, Volume 13, Issue 2, pp 201-215

Canello S. (1995). Teoria e metodologia omeopatica in Medicina Veterinaria. Ipsa Editore, Palermo, pp. 319.

Canning E.U., Lom J. (1986). The Microsporidia of vertebrates, Academic Press, New York.

Cantwell G.E., Shimanuki H. (1970). The use of heat to control Nosema and increase production for the commercial beekeeper, Am. Bee J. 110, 263.

CELLI G. (1994). L'ape come indicatore biologico dei pesticidi in: Atti del convegno: "L'ape come insetto test dell'inquinamento agricolo" P.F "Lotta biologica e integrata per la difesa delle colture agrarie e delle piante forestali" March 28, 1992, Florence, Italy. (D'Ambrosio, M.T. and Accorti, M., Eds.) Ministero Agricoltura e Foreste, Rome, Italy, pp. 15-20

Charrière J.D. (2009). Colony losses in Switzerland: newest results, 5th COLOSS Meet. Montpellier, [http://www.coloss.org/documents/Vth\\_Coloss\\_Conference\\_Proceedings.pdf/](http://www.coloss.org/documents/Vth_Coloss_Conference_Proceedings.pdf/) (accessed on 20 Nov. 2009).

Charrière J.D., Dietemann V., Schäfer M., Dainat B., Neumann P., Gallmann P. (2011). Guida sulla salute delle api del centro di ricerca apicola. Stazione di ricerca Agroscope Liebefeld-Posieux ALP-Haras, CH-3003 Bern

Chauzat M.P., Higes M., Martín-Hernández R., Meana A., Cougoule N., Faucon J.P. (2007). Presence of *Nosema ceranae* in French honey bee colonies, J. Apic. Res. 46, 127-128.

Chen Y., Evans J., Feldlaufer M. (2006). Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. Journal of Invertebrate Pathology Volume 92, Issue 3, July 2006, Pages 152–159 Society of Invertebrate Pathology 2006 Special Issue

Chen Y.P., Evans J.D., Murphy C., Gutell R., Zuker M., Gundensen-Rindal D., Pettis J.S. (2009a). Morphological, molecular and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a Microsporidian parasite isolated from the European honey bee *Apis mellifera*, J. Eukar. Microbiol. 56, 142–147.

Chen Y.P., Evans J.D., Smith J.B., Pettis J.S. (2008). *Nosema ceranae* is a long-present and widespread microsporidian infection of the European honeybee (*Apis mellifera*) in the United States, J. Invertebr. Pathol. 97, 186–188.

Chen Y.P., Evans J.D., Zhou L., Boncristiani H., Kimura K., Xiao T., Litkowski A.M., Pettis J.S. (2009b). Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees, J. Invertebr. Pathol. 101, 204–209.

Chioveanu G., Ionescu D., Mardare A. (2004). Control of nosemosis-treatment with protofil, *Apiacta* 39, 31–38.

Colin M.E., Tournaire M., Gauthier L. (2009). On the epidemiology of *Nosema ceranae* in France, in: Abstracts of 41st Congress Apimondia, 2009, Montpellier, France, p. 144.

COLOSS workshop (2009). Conclusions, Proc. Workshop “*Nosema* disease: lack of knowledge and work standardization” (COST Action FA0803) Guadalajara, <http://www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online> (accessed on 20 Nov. 2009).

Contessi Alberto (2004). *Le Api, biologia, allevamento, prodotti*. Bologna, Edagricole.

Cornejo L.G., Rosi C.O. (1975). *Enfermedades de las abejas: su profilaxis y prevención*, Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires.

Cornman R.S., Chen Y.P., Schatz M.C., Street C., Zhao Y., Desany B., Egholm M., Hutchison S., Pettis J.S., Lipkin W.I., Evans J.D. (2009). Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees, *PLoS Pathog* 5, e1000466.

Corona M., Velarde R., Remolina S., Moran-Lauter A., Wang Y., Hughes K.A., Robinson G.E. (2007). Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signalling, and queen honey bee longevity, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 7128–7133.

Costa C., Lodesani M., Maistrello L. (2009). New possibilities for control of intestinal parasite *Nosema ceranae*, *Apoidea* 6, 31–38.

Cox-Foxter D.L., Conlan S., Holmes E.C., Palacios G., Evans J.D., Moran N.A., Quan P.L., Brise T., Horning M., Geiser D.M., Martinson V., VanEngelsdorp D., Kalkstein A.L., Drysdale A., Hui J., Zhai J., Cui L., Hutchinson S.K., Simons J.F., Egholm M., Pettis J.S., Lipkin W.I. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder, *Science* 318, 283–287.

Cramp S. (1985). *Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa*, Vol. IV, Oxford University Press, Oxford, pp. 748–763.

De la Rocque S., Rioux J. A., Slingenbergh J. (2008). Climate change: effects on animal disease systems *Nosema ceranae* in Europe 15 and implications for surveillance and control, *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 27, 339–354.

Delfinado, M.D. and Baker, E.W. (1974). Varroidae, a new family of mites on honeybees (Mesostigmata: Acarina). *J. Wash. Acad. Sci.*, 64: 4-9

Derakhshifar I., Köglberger H., Oberlerchner J., Moosbeckhofer R. (2009). Incidence of *Nosema* spp. and colony performance in Austria 2006–2008, *Proc. Workshop “Nosema disease: lack of knowledge and work standardization” (COST Action FA0803) Guadalajara*, <http://www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online> (accessed on 20 Nov. 2009).

Didier E.S. (1997). Effects of albendazole, fumagillin and TNP-470 on microsporidial replication in vitro. *Antim, Agents and Chemother.* 41, 1541–1546.

El-Shemy A.A.M., Pickard R.S. (1989). *Nosema apis* Zander infection levels in honeybees of known age, *J. Apic. Res.* 28, 101–106.

Faucon J.P. (2005). La Nosémose, *La Santé de l’Abeille* 209, 344–368.

Fenoy S., Rueda C., Higes M., Martín-Hernández R., Aguila C. (2009). High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation, *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6886–6889.

Formato G., Ermenegildi A., Bozzano A. (2010). *Quaderni di zooprofilassi (periodico dell’istituto zooprofilattico sperimentale delle regioni Lazio e Toscana. Aspetti igienico sanitari in apicoltura. Terza edizione.*

Franzen C., Muller, A. (2001). Microsporidiosis: human diseases and diagnosis, *Microbes Infect.* 3, 389–400.

Fries I. (2009). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*), *J. Invertebr. Pathol.*, in press.

Fries I., Feng F., da Silva A., Slemenda S.B., Pieniazek N.J. (1996). *Nosema ceranae* sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae), *Eur. J. Protistol.* 32, 356–365.

Fries I., Martín-Hernández R., Meana A., García-Palencia P., Higes M. (2006). Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *J. Apic. Res.* 45, 230–233.

Fry C.H. (1983). Honeybee predation by bee-eaters, with economic considerations, *Bee World* 64, 65–78.

Gajda A. (2009). The size of bee sample for investigation of *Nosema* sp. infection level in honey bee colony, Proc. Workshop “*Nosema* disease: lack of knowledge and work standardization” (COST Action FA0803) Guadalajara, <http://www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online> (accessed on 20 Nov. 2009).

Gajda A., Topolska G. (2009). Most probable causes of colony losses during the winter of 2008/2009 in Poland, 5th COLOSS Meet., Montpellier, [http://www.coloss.org/documents/Vth\\_Coloss\\_Conference\\_Proceedings.pdf/](http://www.coloss.org/documents/Vth_Coloss_Conference_Proceedings.pdf/) (accessed on 20 Nov. 2009).

Galeotti P., Inglisa M. (2001). Estimating predation impact on honeybees *Apis mellifera*L. European bee-eaters *Merops apiaster* L., *Revue d'Ecologie (La Terre et la Vie)* 56, 373–388.

Gelli G., Porrini C., Radeghiei P., Sabatini A.G., Marcazzan G.L. Colombo R., Barbattini R., Greatti M. and D'aragaro M. (1996). Honeybees (*Apis mellifera*L.) as bioindicators for the presence of pesticide in the agroecosystem. *Filed test, Ins. Soc. Life* 1, 207-212

Giacomelli A., Ferrari C., Milito M., Muscolini C., Ermenegildi A., Aquilini E., Formato G. (2009). Effectiveness in reducing the number of *Nosema* spores of Api Herb and Vita Feed Gold, Proc. Workshop “*Nosema* disease: lack of knowledge and work standardization” (COST Action FA0803) Guadalajara, <http://www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online> (accessed on 20 Nov. 2009).

Giersch T., Berg T., Galea F., Hornitzky M. (2009). *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia, *Apidologie* 40, 117–123.

Gilliam M., Prest D.B., Lorenz B.J. (1989). Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds, *Apidologie* 20, 53–68.

Glinski & Jarosz, (1992). La varroa come vettore di infezioni batteriche. *Apodologie*, 23.

Gómez A., Torres C., Orantes F.J. (2008). Colony losses: a double blind trial on the influence of supplementary protein nutrition and preventive treatment with fumagillin against *Nosema ceranae*, *J. Apic. Res.* 47, 84–86.

Granato A., Caldon M., Falcaro C., Mutinelli F. (2009). Presence of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in Italian apiaries, Proc. Workshop “Nosema disease: lack of knowledge and work standardization” (COST Action FA0803) Guadalajara, <http://www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online> (accessed on 20 Nov. 2009).

Guidugli K.R., Nascimento A.M., Amdam G.V., Barchuk A.R., Omholt S.W. *et al.* (2005). Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect, *FEBS Lett.* 579, 4961–4965.

Harbo J. (1990). Ricerca di un più corto period di opercolazione. American Bee research Conference.

Hassanein M.H. (1953). The influence of infection with *Nosema apis* on the activities and longevity of the worker honey bee, *Ann. Appl. Biol.* 40, 418–423.

Higes M., García-Palencia P., Martín-Hernández R., Meana A. (2007). Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with the Microsporidia *Nosema ceranae*, *J. Invertebr. Pathol.* 94, 211–217.

Higes M., Martín R., Sanz A., Álvarez N., Sanz A., García-Palencia P., Meana A. (2005). El síndrome de despoblamiento de las colmenas en España. Consideraciones sobre su origen, *Vida Apícola* 133, 15–21.

Higes M., Martín-Hernández R., Botías C., Garrido-Bailón E., González-Porto A.V., Barrios L., delNozal M. *et al.* (2008a). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse, *Environ. Microbiol.* 10, 2659–2669.

Higes M., Martín-Hernández R., García-Palencia P., Marín P., Meana A. (2009c). Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (Microsporidia) from worker honey bees to queens (*Apis mellifera*), *Environ. Microbiol. Reports* 1, 495–498.

Higes M., Martín-Hernández R., Garrido-Bailón E., Botías C., García-Palencia P., Meana A. (2008b). Regurgitated pellets of *Merops apiaster* as fomites of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores, *Environ. Microbiol.* 5, 1374–1379.

Higes M., Martín-Hernández R., Garrido-Bailón E., Botías C., Meana A. (2009a). First detection of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in African Honey bees (*Apis mellifera intermissa*), *J. Apic. Res.* 48, 217–219.

Higes M., Martín-Hernández R., Garrido-Bailón E., García-Palencia P., Meana A. (2008c). Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honey bees, *J. Invertebr. Pathol.* 97, 76–78.

Higes M., Martín-Hernández R., Garrido-Bailón E., González-Porto A.V., García-Palencia P., Meana A., Del Nozal M.J., Mayo R., Bernal J.L. (2009b). Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries, *Environ. Microbiol. Reports* 1, 110–113.



Higes M., Martín-Hernández R., Martínez-Salvador A., Garrido-Bailón E., González-Porto A.V., Meana A., Bernal J.L., Nozal M.J. Bernal J. (2009d). A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain, *Environ. Microbiol. Reports*, in press.

Higes M., Martín-Hernández R., Meana A. (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe, *J. Invertebr. Pathol.* 92, 93–95.

Higes M., Martín-Hernández R., Meana A. (2010). *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* Available online at: INRA/DIB-AGIB/EDP Sciences, 2010 [www.apidologie.org](http://www.apidologie.org) DOI: 10.1051/apido/2010019

Huang W.F., Jiang J.H., Chen Y.W., Wang C.H. (2007). A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*, *Apidologie* 38, 30–37.

Huang Z.Y., Robinson G.E. (1996). Regulation of honey bee division of labor by colony age demography, *Behav. Ecol. Sociobiol.* 39, 147–158.

IASMA Notizie apicoltura (8 giugno 2012). Notiziario tecnico del centro di trasferimento tecnologico della fondazione Edmund Mach - Istituto Agrario S. Michele all'Adige. N. 25 - Anno XI. 1-4

Infantidis M.D. (1987). *Varroa jacobsoni* Oud.: aspetti biologici e prospettive di lotta. *Apicoltore moderno* 78, 135-145. Torino

Keeling P. (2009) Five questions about Microsporidia, *Plos. Pathog.* 5, 1–3.

Keeling P., Fast N.M. (2002). Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites, *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 93–116.

Keoghane E.M., Weiss L.M. (1999). The Microsporidia and Microsporidiosis, Wittner and Weiss (Eds.), Washington, DC, ASM press.

Klee J., Besana A.M., Genersch E., Gisder S., Nanetti A., Tam D.Q., Chinh T.X., Puerta F., Ruz J.M., Kryger P., Message D., Hatjina F., Korpela S., Fries, I. Paxton R. (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*, *J. Invertebr. Pathol.* 96, 1–10.

Korpela S. (2009). *Nosema* situation in Finland, 5th COLOSS Meet., Montpellier, [http://www.coloss.org/documents/Vth\\_Coloss\\_Conference\\_Proceedings.pdf/](http://www.coloss.org/documents/Vth_Coloss_Conference_Proceedings.pdf/) (accessed on 20 Nov. 2009).

Kralj J, Brockmann A, Fuchs S, Tautz J (2006). The parasitic mite *Varroa destructor* affects non-associative learning in honey bee foragers, *Apis mellifera*L. JCPANSNBP NOV

Kralj J., Fuchs S. (2006). Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers, *Apidologie* 37, 577-587.

Kralj J., Fuchs S. (2009). *Nosema* sp. influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers, *Apidologie*, in press.

Kryeger P. (2009). Rare *Nosema* infections in Denmark. Proc. Workshop "Nosema disease: lack of knowledge and work standardization" (COST Action FA0803) Guadalajara, <http://www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online> (accessed on 20 Nov. 2009).

Langella V., Formato G. (2010). Introduzione alle malattie delle api. Quaderni di zooprofilassi (periodico dell'istituto zooprofilattico sperimentale delle regioni Lazio e Toscana. Aspetti igienico sanitari in apicoltura. Terza edizione. 17-23.

Lavazza A., Carpana E., Dottri M., Bassi S., Vecchi M.A., Arculeo P. (1996). Indagine sulla diffusione delle virosi in Italia negli anni 1989-1993. *Sel. Vet.* 11:873-885.

Lin H., Sullivan J., Huang Z.Y. (2009). Mechanisms through which *Nosema apis* affects onset of foraging in worker honeybees (*Apis mellifera* L.). Proc. Workshop "Nosema disease: lack of knowledge and work standardization" (COST Action FA0803) Guadalajara, <http://www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online> (accessed on 20 Nov. 2009).

Linneo C. (1758). *Systema Naturae*. 10° Ed. Holmiae Laur Salvii.

Linneo C. (1761). *Fauna Suecica*. Stocholmiae Laur Salvii.

Liu T.P. (1984). Ultrastructure of the midgut of the worker honeybee *Apis mellifera* heavily infected with *Nosema apis*, *J. Invertebr. Pathol.* 44, 282-291.

Maistrello L., Lodesani M., Costa C., Leonardi F., Marani G., Caldon M., Mutinelli F., Granato A. (2008). Screening of natural compounds for the control of *Nosema* disease in honeybees (*Apis mellifera*), *Apidologie* 39, 436-445.

Malone L.A., Gatehouse H.S., Tregidga E.L. (2001). Effects of Time, Temperature, and Honey on *Nosema apis* (Microsporidia: Nosematidae), a Parasite of the Honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), *J. Invertebr. Pathol.* 77, 258-268.

Marchetti S. (1985). Il "metodo dei sestì" per la valutazione numerica degli adulti in famiglie di *Apis mellifera*. *Apicoltura* 1: 41-61.

Martin C, Salvy M, Provost E, Bagnères AG, Roux M, Crauser D, Clément JL, Le Conte Y. (2001). Variations in chemical mimicry by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* according to the developmental stage of the host honeybee *Apis mellifera*. *Exper. & Appl. Acarol* 19, 199-210

Martin S.J. (1994). Ontogenesis of the mite *varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural condition. *Exper.& Appl.Acarol* 18,87-100.

Martínez C. (1984). Notes on the prey taken by bee-eaters *Merops apiaster* at a colony in central Spain, *Alauda* 52, 45–50.

Martín-Hernández R., Botías C., Garrido Bailón E., Martínez-Salvador A., Prieto L., Meana L., Higes M., (2012). Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*?. *Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd, Environmental Microbiology*, 14, 2127–2138

Martín-Hernández R., Botías C., Meana A., Higes M. (2009b). *Nosema* diagnostic, Proc. Workshop “*Nosema* disease: lack of knowledge and work standardization” (COST Action FA0803) Guadalajara, <http://www.coloss.org/news/nosemaworkshop-proceedings-online> (accessed on 20 Nov. 2009).

Martín-Hernández R., Meana A., García-Palencia P., Marín P., Botías C., Garrido-Bailón E., Barrios L., Higes M. (2009a). Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia, *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2554–2557.

Martín-Hernández R., Meana A., Higes M. (2005). Increase of nosemosis in Spain, *Acta Parasitol. Portuguesa* 12, 49–50.

Martín-Hernández R., Meana A., Prieto L., Martínez-Salvador A., Garrido-Bailón E., Higes M. (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*, *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6331–6338.

Mathis A. (2000). Microsporidia: emerging advances in understanding the basic biology of these unique organisms, *Int. J. Parasitol.* 30, 795–804.

Mattila H.R., Otis G.W. (2006). Effects of pollen availability and *Nosema* infection during spring on division of labour and survival of worker honey bees, *Environ. Entomol.* 35, 708–717.

Mayack C., Naug D. (2009). Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection, *J. Invertebr. Pathol.* 100, 185–188.

McCowen M.C., Callender M.E., Lawlis J.F. (1951). Fumagillin (H-3) a new antibiotic with amebicidal properties, *Science* 113, 202–203.

Meana A., García-Palencia P., Martín-Hernández R., Garrido-Bailón E., Fenoy S., Del Águila C., Higes M. (2007). Life cycle of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*, in: abstract of XXI International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Gent (Belgium), p. 352.

Nanetti A. (2009). ApiHerb as an alternative product to treat *Nosema* infection. Proc. Workshop "Nosema disease: lack of knowledge and work standardization" (COST Action FA0803) Guadalajara, <http://www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online> (accessed on 20 Nov. 2009).

Nanetti A., Stradi G. (1999). Modalità di azione dell'acido ossalico, *Rivista di Apicoltura Lapis* VII (2)

Nanetti A., Stradi G., (1997). Trattamento chimico con acido ossalico in sciroppo zuccherino. *Ape Nostra Amica*, 19 (5): 6-14.

Naug D., Camazine S. (2002). The role of colony organization on pathogen transmission in social insects, *J. Theor. Biol.* 215, 427-439.

Naug D., Gibbs A. (2009). Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*, *Apidologie* 40, 595-599.

Naug D., Smith B. (2007). Experimentally induced change in infectious period affects transmission dynamics in a social group, *Proc. R. Soc. B* 274, 61-65.

Nelson C.M., Ihle K.E, Fondrk M.K., Page R.E., Amdam G.V. (2007). The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization, *Plos Biol.* 5, 673-677.

Neumann P. (2009). Conclusions of 5th COLOSS Meet. Montpellier, [http://www.coloss.org/documents/Vth\\_Coloss\\_Conference\\_Proceedings.pdf/](http://www.coloss.org/documents/Vth_Coloss_Conference_Proceedings.pdf/) (accessed on 20 Nov. 2009).

Neveu-Lemaire M. (1938). *Traité d'Entomologie Médicale et Vétérinaire*, Vigot Frères, Éditeurs, Paris.

O'Mahony E.M., Tay W.T., Paxton J.R. (2007). Multiple rRNA variants in a single spore of the microsporidium *Nosema bombi*, *J. Eukar. Microbiol.* 54, 103-109.

Office International des Epizooties (OIE) (2004). Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines, [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00123.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00123.htm) (accessed on 20 Nov. 2009).

Oudemans, A. C. (1904). On a new genus and species of parasitic acari. *Notes. Leyden Mus.* 24 216-222.

Paxton R., Klee J., Korpela S., Fries I. (2007). *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*, *Apidologie* 38, 558-565.

Persano Oddo L, Marinelli E (2002). Impiego di prodotti omeopatici nella lotta contro *Varroa destructor* Anderson & Trueman. Atti XIX Congresso Nazionale di Entomologia, Catania, 10-15 giugno.

Pignatelli P, Martini A (2007). Omeopatia. In Pignatelli P. Medicina veterinaria non convenzionale. Edagricole, 3-25. Paolo Pignatelli. Manuale di medicina veterinaria non convenzionale 2007 Edagricole

Pinzauti Mauro. (2000). Capitolo 6. Le Api Mellifiche (*Apis Mellifera* L.) nel contesto degli Apoidei. Libro Api e Impollinazione. Edizioni della Giunta Regionale Toscana Marzo 2000. 73-82

Plischuk S., Martín-Hernández R., Prieto L., LucíaM., Botías C., Meana A., Abrahamovich A.H., Lange C., Higes M. (2009). South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honey bees (*Apis mellifera*), Environ. Microbiol. Reports 1, 131-135.

Porrini C. (2007). Le api come bioindicatori dell'inquinamento ambientale. <http://www.entom.agrsci.unibo.it/Convegno%20api/Le%20api%20come%20bioindicatori-1.pdf>

Prigli M. (2000). Homöopatische Behandlung von Bienenvölkern. Schweizerische Bienen Zeitung, 123, 11: 645.

Regolamento (CE) n. 834/2007 del Consiglio relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici

Regolamento(CE) N. 889/2008 recante modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 834/2007 del Consiglio.

Rehm S.M., Ritter W., (1989). Sequence of the sexes in the offspring of *Varroa jacobsoni* and the resulting consequence for the calculation of the developmental period. Apidologie 20, 339-343

Reinhold Siede, Matthias König, Ralph Büchler, Klaus Failing and Heinz-Jürgen Thiel (2008-12). A real-time PCR based survey on acute bee paralysis virus in German bee colonies. Apidologie

Remolina S.C., Hafez D.M., Robinson G.E., Hughes K.A. (2007). Senescence in the worker honey bee *Apis mellifera*, J. Insect Physiol. 53, 1027-1033.

Ricciardelli D'Albore, Intoppa Francesco. (2000). Fiori e api. La flora visitata dalle api e dagli altri Apoidei in Europa. Calderini ed agricole. p 3, 5,

Rice R.N. (2001). *Nosema* disease in honeybees. Genetic variation and control. RIRDC-  
N° 01/46, Kingston, <https://www.rirdc.infoservices.com.au/downloads/01-046.pdf> (accessed on 1 December 2009).

Robinson G.E., Strambi C., Strambi A. (1991). Comparison of juvenile hormone and ecdysteroid hemolymph titres in adult worker and queen honeybees (*Apis mellifera*), *J. Insect Physiol.* 37, 929–935.

Ruiz Espinoza FJ, Guerrero Salinas JI (2003). Control homeopatico del acaro (*Varroa destructor* Oud.) en abejas. (Fase I). Seminario de Avances y Resultados de Investigación del Programa de Agricultura Orgánica.

Ruiz Espinoza FJ, Guerrero Salinas JI (2004). Control homeopatico del acaro (*Varroa destructor* Oud.) en abejas. (Fase II). Seminario de Avances y Resultados de Investigación del Programa de Agricultura Orgánica

Santrac V., Granato A., Mutinelli F. (2009). First detection of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* from Bosnia and Herzegovina, Proc. Workshop “*Nosema* disease: lack of knowledge and work standardization” (COST Action FA0803) Guadalajara, <http://www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online> (accessed on 20 Nov. 2009).

Seehuus S.C., Norberg K., Gimsa U., Krekling T., Amdam G.V. (2006). Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress, *PNAS* 103, 962–967.

Shen M., Cui L., Ostiguy N., Cox-Foster D. (2005). Intricate transmission routes and interaction between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and Sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *J. Gen. Virol.* 86:2281–2289.

Shen M., L. Cui, N. Ostiguy, D. Cox-Foster (2005). Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honey bee host and the parasitic varroa mite. *J. Gen. Virol.*, 86, pp. 2281–2289

Shen M., Yang X., Cox-Foster D., Cui L. (2005). The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees *Virology*, Volume 342, Issue 1, 10 November 2005, Pages 141-149

Tapasztai Z., Forgách P., Kövágó C., Békési L., Bakonyi T., Rusvai M. (2009). First detection and dominance of *Nosema ceranae* in Hungarian honeybee colonies, *Acta Vet. Hung.* 57, 383–388.

Tofilski A. (2009). Shorter-lived workers start foraging earlier, *Insectes Soc.* 56, 359–366.

Topolska G., Gajda A., Hartwig A. (2008). Polish honey bee colony-loss during the winter of 2007/2008, *J. Apic. Sci.* 52, 95–103.

Topolska G., Kasprzak S. (2007). First cases of *Nosema ceranae* infection in bees in Poland, *Medycyna Wet.* 63, 1504–1506.

Van der Zee R. (2009). Colony Losses in the Netherlands, *J. Apic. Res.*, accepted.

Van der Zee R., Bakker O., Higes M., Martín-Hernández R. (2008). Dutch trial on beecolony losses 2008–2009, first findings, in: *Proceedings of Eurbee3, the 3rd European conference of Apidology*. Queen's University Belfast Northern Ireland, p. 108.

Volet B., Burkhardt M. (2006). Rare and unusual records of breeding, migrating and wintering bird species in Switzerland, 2005, *Ornithologische Beobachter* 103, 257–270.

Webster T.C., Pomper K.W., Hunt G., Thacker E.M., Jones S.C. (2004). *Nosema apis* infection in worker and queen *Apis mellifera*, *Apidologie* 35, 49–54.

Weidner E., Byrd W. (1982). The microsporidian spore invasion tube. II. Role of calcium in the activation of invasion tube discharge, *J. Cell. Biol.* 93, 970–975.

Weiss L.M. (2003). Microsporidia 2003: IWOP 8, *J. Eukar. Microbiol.* 50, 566–568.

Weiss L.M., Vossbrinck C.R. (1999). Molecular biology, molecular phylogeny, and molecular diagnostic approaches to the microsporidia, in: Wittner M., Weiss L.M. (Eds.), *The Microsporidia and microsporidiosis*, American Society for Microbiology Press, Washington DC, pp. 129–171.

Whitfield C.W., Ben-Shahar Y., Brillet C., Leoncini I., Crauser D., Leconte Y., Rodriguez-Zas S., Robinson G.E. (2006). Genomic dissection of behavioral maturation in the honey bee, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 16068–16075.

Williams B.A.P. (2009). Unique physiology of host-parasite interactions in microsporidia infections, *Cell. Microbiol.* 11, 1551–1560.

Williams G.R., Shafer A.B.A., Rogers R.L.E., Shutler D., Stewart D.T. (2008). First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA, *J. Invertebr. Pathol.* 97, 189–192.

Wittner M., Weiss L.M. (1999). *The Microsporidia and Microsporidiosis*, Washington, DC, ASM press.

Woyciechowski M., Morón D. (2009). Life expectancy and onset of foraging in the honeybee (*Apis mellifera*), *Insectes Soc.* 56, 193–201.

[www.apicolturaonline.it/classif](http://www.apicolturaonline.it/classif).

[www.bioapi.it](http://www.bioapi.it)

[www.fedeapi.it](http://www.fedeapi.it)

[www.forumdiagraria.org/malattie-e-nemici-f99/modalita-di-somministrazione-api-bioxal-t28010.html](http://www.forumdiagraria.org/malattie-e-nemici-f99/modalita-di-somministrazione-api-bioxal-t28010.html)



[www.mielidautore.it/storia.htm](http://www.mielidautore.it/storia.htm)

[www.mieliditalia.it](http://www.mieliditalia.it) (Unaapi)

[www.progettostranova.it/index.php?option=com\\_content&view=article&id=110&Itemid=177](http://www.progettostranova.it/index.php?option=com_content&view=article&id=110&Itemid=177)

[www.vithoukas.com/books\\_study/onlinemateriamedica/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2315](http://www.vithoukas.com/books_study/onlinemateriamedica/index.php?option=com_content&view=article&id=2315)

Yang X, Cox-Foster D. (2007). Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. *Parasitology*

Yosef R., Markovets M., Mitchell L., Tryjanowski P. (2006). Body conditions as a determinant for stopover in bee-eaters (*Merops apiaster*) on spring migration in the Arava Valley, southern Israel, *J. Arid Environ.* 64, 401–411.

Zhang, X., He, S., Evans, J.D., Pettis, J.S., Yin, G., Chen, Y. (2012). New evidence that deformed wing virus and black queen cell virus are multi-host pathogens. *Journal of Invertebrate Pathology.* 109(1):156-159.

## 7. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il prof. Andrea Martini per la sua idea, disponibilità e dedizione. Per l'opportunità di approfondire e sperimentare una diversa e nuova passione: il mondo delle api.

Duccio, per la pazienza, disponibilità, sostegno e aiuto che ci ha dato. Senza di te questo lavoro non sarebbe stato possibile visto che hai messo a disposizione le tue apine per la nostra sperimentazione.

Cinzia e Melissa, che mi hanno accompagnato, sostenuto e aiutato in apiario, nei campionamenti e nelle analisi delle api.

Lorenzo, che grazie alla sua passione per le api, mi ha trasmesso sicurezza e curiosità per questo nuovo mondo; inoltre mi ha supportato, sopportato e aiutato sia nei momenti critici sia nei campionamenti. Grazie!!!

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, presso il quale abbiamo effettuato le analisi. Soprattutto la sezione di Firenze e in particolare Giuseppe, con il quale ho condiviso le analisi di laboratorio dove ho imparato a sbuzzare le api.

Ringrazio il Centro Apicola Regional de Marchamalo de la Consejeria de Agricultura de Guadalajara. In particolare il direttore Jose Alberto Viñuela, Mariano Higes e Raquel Martín Hernández che mi hanno dato l'opportunità di approfondire le mie conoscenze pratiche e teoriche su Nosema. Inoltre ringrazio tutto il laboratorio di analisi Teresa, Virginia, Maria e Carmen che mi hanno fisicamente ospitato e aiutato nelle mie analisi; tutte le altre collaboratrici Cristina Cris, Tamara, Cristina, Meli e Jessi; tutti i dipendenti Paco, Jesus, Javi, Oscar, Miguel, Juan e Antonio, che hanno animato e allietato le giornate passate lì.

Ringrazio mamma, babbo e Veronica per avermi da sempre appoggiato nelle mie decisioni.

E ringrazio tutti quelli che non ho menzionato, ma che mi hanno aiutato e mi sono stati vicini.

Grazie a tutti di cuore!!!

Allegato 1. Scheda valutazione arnia

ARNIA n°	Anno								Apiario								
	Note																
Descrizione sintetica della colonia																	
DATA Meteo	Telaini nido							Melari	Regina				Fuchi		Docilità		Giudizio
	Api	Covata	Scorte	Vuoti	Tolti	Inseriti	Totale		Telaini pieni	S i	N o	Stadi di Covata ( 1-3)	Celle reali	Si	No	Si	



Allegato 3. Scheda forza alveare

ARNIA n°	Note														
	FORZA ALVEARE			FORZA ALVEARE				FORZA ALVEARE				FORZA ALVEARE			
DATA	Telai no	Api/ n° sesti	Covata/ n° sest	DAT A	Telai no	Api/ n° sesti	Covata/ n° sest	DAT A	Telai no	Api/ n° sesti	Covata/ n° sest	DAT A	Telai no	Api/ n° sesti	Covat a/n° sesti
	1°				1°				1°				1°		
	2°				2°				2°				2°		
	3°				3°				3°				3°		
	4°				4°				4°				4°		
	5°				5°				5°				5°		
	6°				6°				6°				6°		
	7°				7°				7°				7°		
	8°				8°				8°				8°		
	9°				9°				9°				9°		
	10°				10°				10°				10°		

Allegato 4. Punti salienti 1

N°	Gruppo	20-04-11										27-05-11										24-06-2011										Note		
		Trattamento				Campionamento						No te	Trattamento				Campionamento						No te	Trattamento				Campionamento						
		Calcarea S.	Acqua	Blocco Cinzola	Ossalico	Varroa ca.d. nathu	Varroa su adulti	Forza	Peso	Nosema	Virus		Calcarea S.	Acqua	Blocco Cinzola	Ossalico	Varroa ca.d. nathu	Varroa su adulti	Forza	Peso	Nosema	Virus		Calcarea S.	Acqua	Blocco Cinzola	Ossalico	Varroa ca.d. nathu	Varroa su adulti	Forza	Peso		Nosema	Virus
1	Calcarea S.	X				X	X	X	X	X	X	X										X					X	X	X	X	X		Regina Vergine	
2	Calcarea S.	X				X	X	X	X	X	X	X										X					X	X	X	X	X			
3	Calcarea S.	X				X	X	X	X	X	X	X										X					X	X	X	X	X			
4	Calcarea S.	X				X	X	X	X	X	X	X										X					X	X	X	X	X			
5	Calcarea S.	X				X	X	X	X	X	X	X										X					X	X	X	X	X			
6	Calcarea S.	X				X	X	X	X	X	X	X										X					X	X	X	X	X			
7	Calcarea S.	X				X	X	X	X	X	X	X										X					X	X	X	X	X			
8	Calcarea S.	X				X	X	X	X	X	X	X										X					X	X	X	X	X			
9	Calcarea S.	X				X	X	X	X	X	X	X										X					X	X	X	X	X			
10	Calcarea S.	X				X	X	X	X	X	X	X										X					X	X	X	X	X			
11	Acqua		X			X	X	X	X	X	X	X		X									X				X	X	X	X	X			
12	Acqua		X			X	X	X	X	X	X	X		X									X				X	X	X	X	X			
13	Acqua		X			X	X	X	X	X	X	X		X									X				X	X	X	X	X			
14	Acqua		X			X	X	X	X	X	X	X		X									X				X	X	X	X	X			
15	Acqua		X			X	X	X	X	X	X	X		X									X				X	X	X	X	X			
16	Acqua		X			X	X	X	X	X	X	X		X									X				X	X	X	X	X			
17	Acqua		X			X	X	X	X	X	X	X		X									X				X	X	X	X	X			
18	Acqua		X			X	X	X	X	X	X	X		X									X				X	X	X	X	X			
19	Acqua		X			X	X	X	X	X	X	X		X									X				X	X	X	X	X			
20	Acqua		X			X	X	X	X	X	X	X		X									X				X	X	X	X	X			

Allegato 5. Punti salienti 2

N°	Gruppo	15-07-11								05-08-11								21-09-2011														
		Trattamento			Campionamento					Note	Trattamento			Campionamento					Note	Trattamento			Campionamento					Note				
		Calcina S.	Acqua	Blocco Covola	Ossalico	Vanno anal.	Vanno anal. - subito	Forza	Peso		Numero	Viva	Calcina S.	Acqua	Blocco Covola	Ossalico	Vanno anal. dopo lav.	Vanno anal. - subito		Forza	Peso	Numero	Viva	Calcina S.	Acqua	Blocco Covola	Ossalico		Vanno anal. - subito	Vanno anal. - subito	Forza	Peso
1	Calcina a S.	X		X		X	X	X	X	X												X										Morta
2	Calcina a S.	X		X		X	X	X	X	X				X	X							X										
3	Calcina a S.	X		X		X	X	X	X	X				X	X							X										
4	Calcina a S.	X		X		X	X	X	X	X				X	X							X										
5	Calcina a S.	X		X		X	X	X	X	X				X	X							X										
6	Calcina a S.	X		X		X	X	X	X	X				X	X							X										
7	Calcina a S.	X		X		X	X	X	X	X				X	X							X										
8	Calcina a S.	X		X		X	X	X	X	X				X	X							X										Orfana
9	Calcina a S.	X		X		X	X	X	X	X				X	X							X										Morta
10	Calcina a S.	X		X		X	X	X	X	X				X	X							X										
11	Acqua		X	X		X	X	X	X	X				X	X							X										Morta
12	Acqua		X	X		X	X	X	X	X				X	X							X										
13	Acqua		X	X		X	X	X	X	X				X	X							X										
14	Acqua		X	X		X	X	X	X	X				X	X							X										
15	Acqua		X	X		X	X	X	X	X				X	X							X										
16	Acqua		X	X		X	X	X	X	X				X	X							X										
17	Acqua		X	X		X	X	X	X	X				X	X							X										No regina nella gabbietta (orfana) regina nuova
18	Acqua		X	X		X	X	X	X	X				X	X							X										
19	Acqua		X	X		X	X	X	X	X				X	X							X										
20	Acqua		X	X		X	X	X	X	X				X	X							X										







Allegato 8. Punti salienti 5

N°	Gruppo	20-08-2012										22-09-2012 e 02-11-2012										08-11-2012												
		Trattamento				Campionamento						Note	Trattamento				Campionamento						Note	Trattamento				Campionamento						Note
		Calcestruzzo	Acqua	Elenco Corallo	Ossidato	Varca ind, rallo	Varca su adulti	Forza	Peso	Numero	Vita		Calcestruzzo	Acqua	Elenco Corallo	Ossidato	Varca ind, rallo	Varca su adulti	Forza	Peso	Numero	Vita		Calcestruzzo	Acqua	Elenco Corallo	Ossidato	Varca ind, rallo	Varca su adulti	Forza	Peso	Numero	Vita	
1	Acqua		x			x							x											x	x	x	x	x	x	x				
2	Acqua		x			x							x											x	x	x	x	x	x	x				
3	Calcestruzzo S.	x				x						x												x	x	x	x	x	x	x	Regina non marcata			
4	Calcestruzzo S.	x				x						x												x	x	x	x	x	x	x				
5	Calcestruzzo S.	x				x						Morta	x											x	x	x	x	x	x	x	Morta			
6	Calcestruzzo S.	x										x												x	x	x	x	x	x	x				
7	Acqua		x			x							x											x	x	x	x	x	x	x	Morta			
8	Calcestruzzo S.	x				x						x												x	x	x	x	x	x	x				
9	Calcestruzzo S.	x				x						x												x	x	x	x	x	x	x				
10	Acqua		x			x							x											x	x	x	x	x	x	x				
11	Acqua		x			x						Morta	x											x	x	x	x	x	x	x	Morta			
12	Acqua		x			x							x											x	x	x	x	x	x	x	Regina non marcata			
13	Acqua		x			x							x											x	x	x	x	x	x	x				
14	Calcestruzzo S.	x				x						x												x	x	x	x	x	x	x				
15	Calcestruzzo S.	x				x						x												x	x	x	x	x	x	x	Morta			
16	Calcestruzzo S.	x				x						x												x	x	x	x	x	x	x				
17	Acqua		x			x							x											x	x	x	x	x	x	x	Controllare			
18	Acqua		x			x							x											x	x	x	x	x	x	x	Controllare			
19	Acqua		x			x							x											x	x	x	x	x	x	x	Morta			
20	Calcestruzzo S.	x				x						x												x	x	x	x	x	x	x	Controllare			