

# PESTE AMERICANA

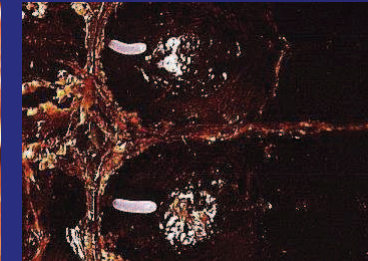
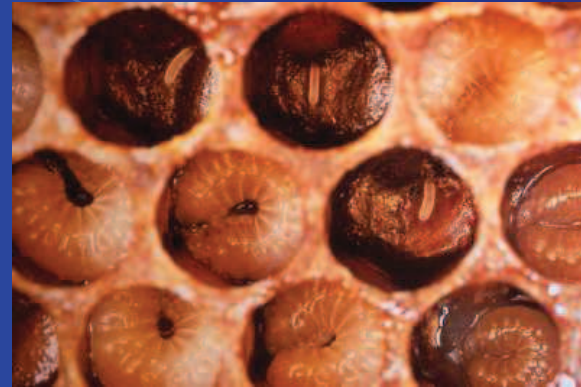
Emanuele Carpana

CRA-API Unità di ricerca di apicoltura e bachicoltura



# Ciclo ontogenetico ape operaia

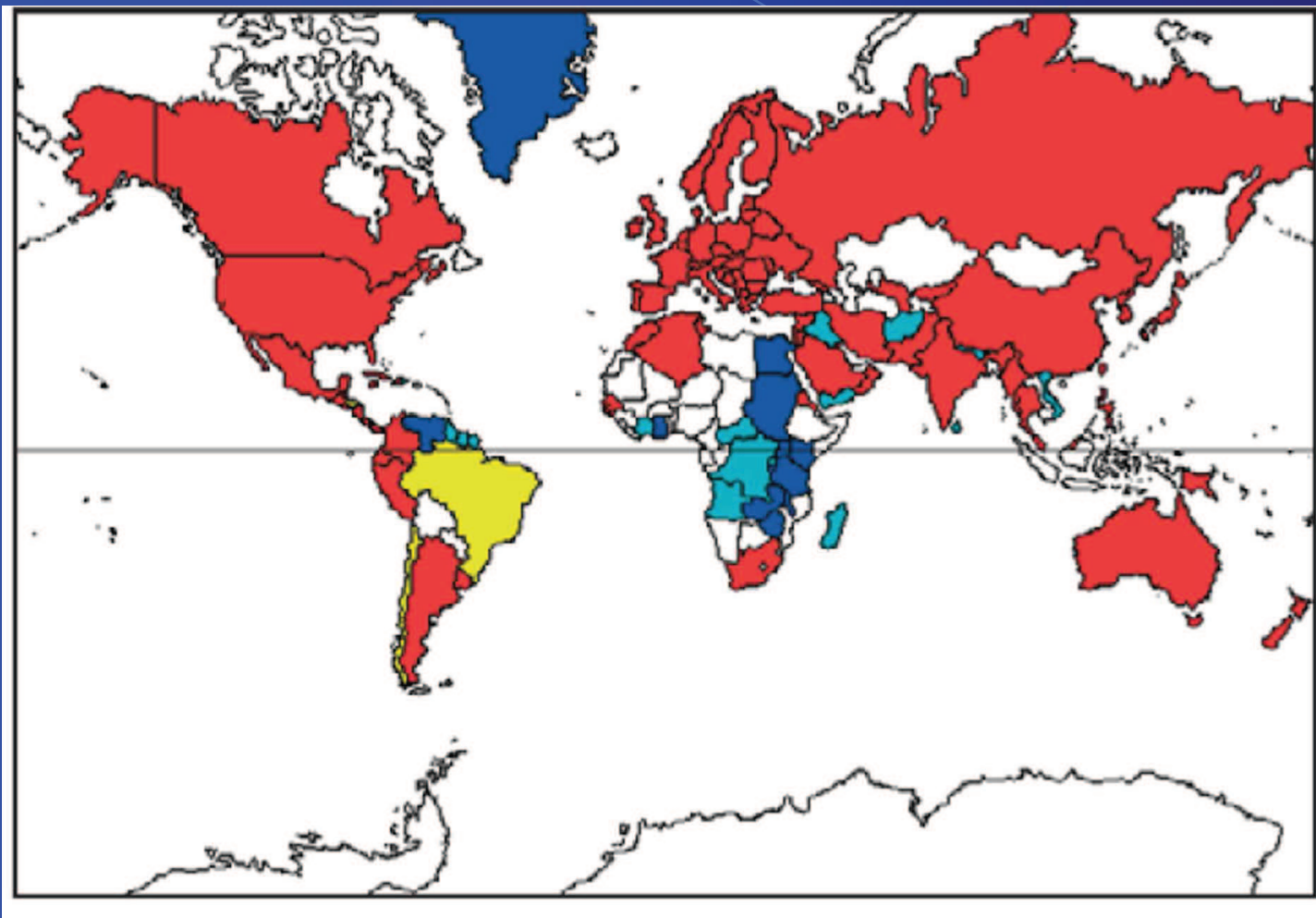
1		U O V O
2		
3	schiusa	
4	1 <sup>a</sup> muta	L A R V A
5	2 <sup>a</sup> muta	
6	3 <sup>a</sup> muta	
7	4 <sup>a</sup> muta	
8		
9	Opercolatura Filatura bozzolo	
10		P R O P U P A
11		
12	5a muta	
13		P U P A
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21	Sfarfallamento	



# Introduzione

- La più diffusa patologia infettiva delle api
- Colpisce gli stadi larvali ma produce effetti letali sull'intera colonia
- L'agente eziologico è un batterio sporigeno, *Paenibacillus larvae*, che persiste nel materiale e nell'attrezzatura per un tempo indefinito
- Infezione ricorrente diffusa, mediante le spore, anche allo stato sub-clinico
- Non sono disponibili mezzi curativi risolutivi
- Malattia soggetta a denuncia (OIE) e misure di Polizia Veterinaria

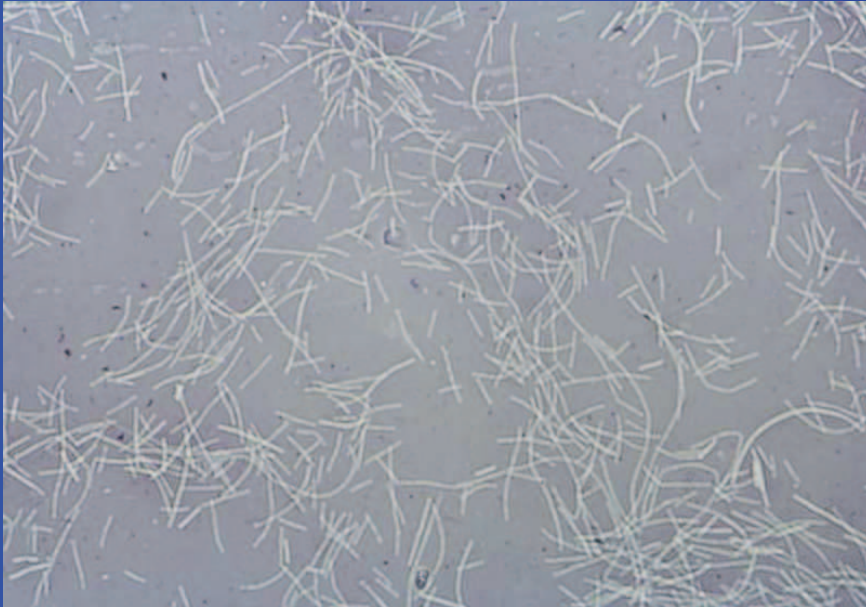
# Diffusione





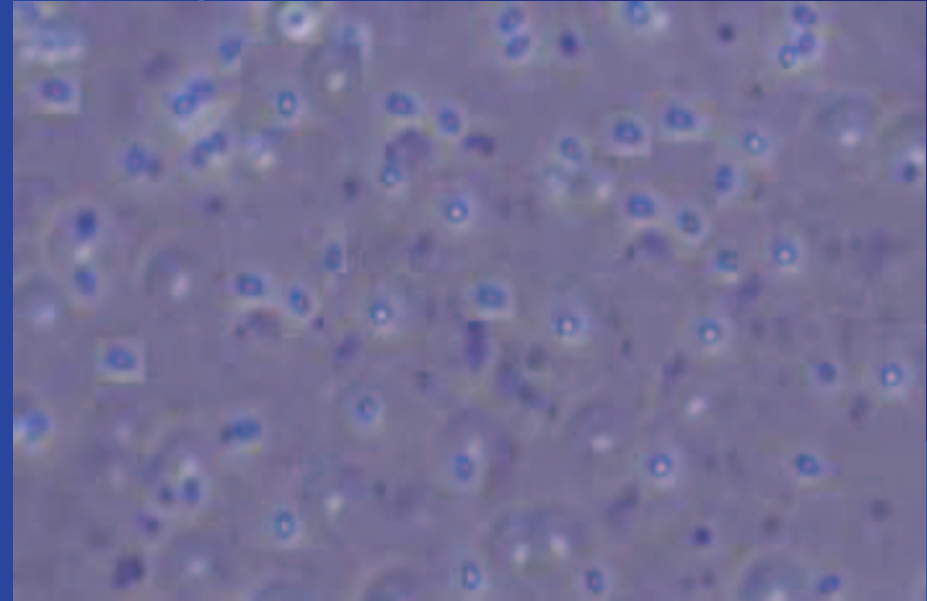
# Eziologia e patogenesi

## *Paenibacillus larvae*



### Forme vegetative:

- Bastoncini Gam +



### Spore:

- Forma infettante
- Altamente resistenti, possono rimanere vitali per decenni

L'infezione si trasmette alle larve mediante  
l'alimento contaminato dalle spore



Sono suscettibili le larve fino a 48 h di  
età, con massima sensibilità a 12-36 h  
( $LD_{50} \simeq 10$  spore)

Le spore germinano nell'intestino della larva, circa 12 ore dopo l'ingestione.

Le cellule batteriche si moltiplicano e colonizzano l'intestino.

Successivamente, le cellule batteriche attraversano la membrana peritrofica, penetrano nell'epitelio intestinale e infine invadono l'emolinfa dando origine alla fase setticemica dell'infezione.





# Mortalità delle larve

La morte della larva infetta può avvenire in un ampio arco di tempo. Nella situazione più tipica la larva muore prevalentemente dopo l'opercolatura, in fase di propupa o di pupa

*Più in generale:*

LT<sub>50</sub> da 2 a 5 gg p.i.

LT<sub>100</sub> da 5 a 13 gg p.i.

Segue la sporificazione delle cellule batteriche.

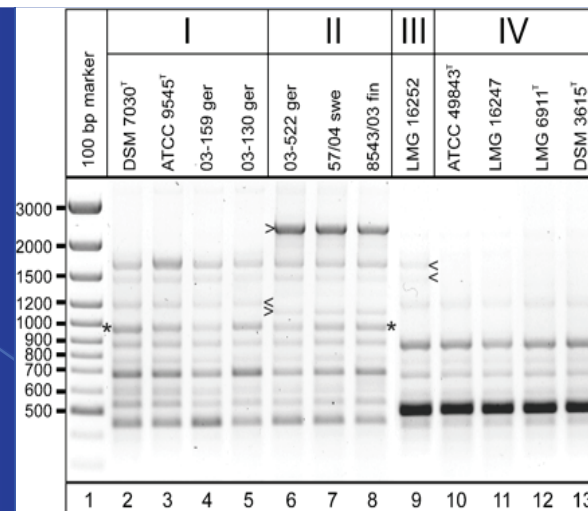
Si producono circa 2,5 miliardi di spore per larva





# Genotipi di *P. larvae*

Quattro genotipi: ERIC I – IV \*



□ ERIC I Responsabile della forma classica della PA. E' il più diffuso.

□ ERIC II Responsabile di una forma atipica. Risulta diffuso solo in Europa

□ ERIC III – IV Corrispondono all'ex *P.I.pulvifaciens* (covata polverosa) Da tempo non viene rinvenuto in campo

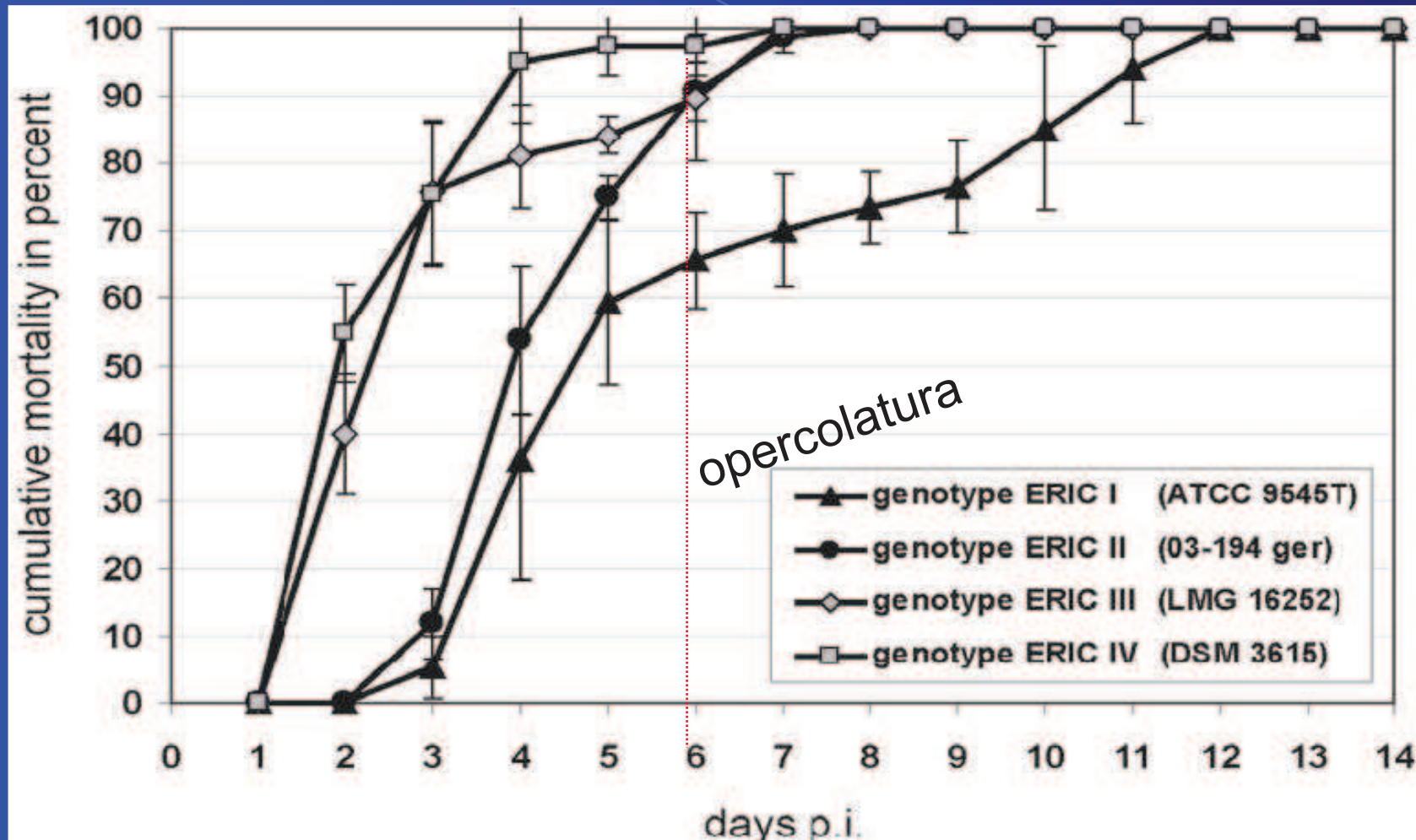
LT<sub>100</sub>

12-13 gg

5-7 gg

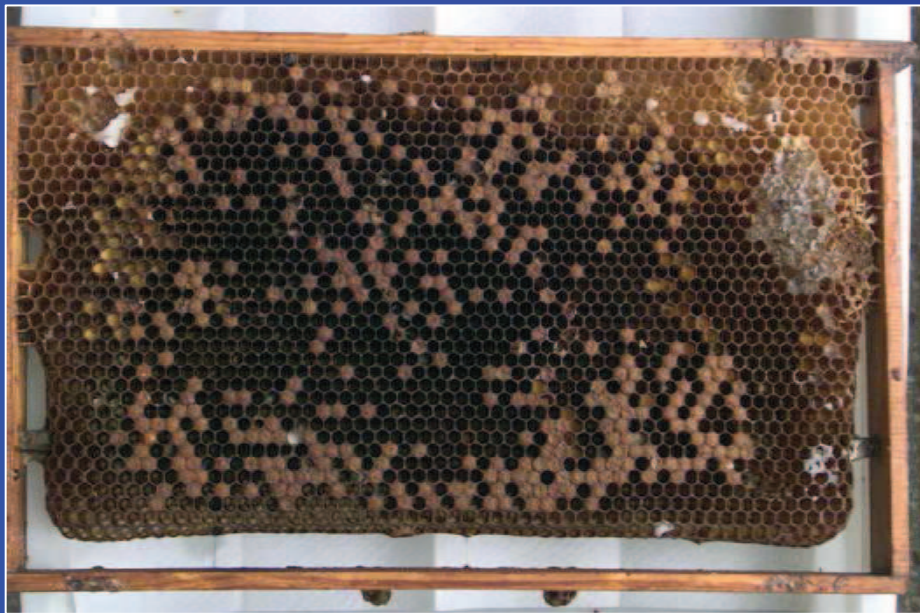
\* Caratterizzazione genomica mediante rep-PCR con ERIC primers

## Decorso dell'infezione: mortalità larve



# Sintomatologia

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



Covata ammalata:

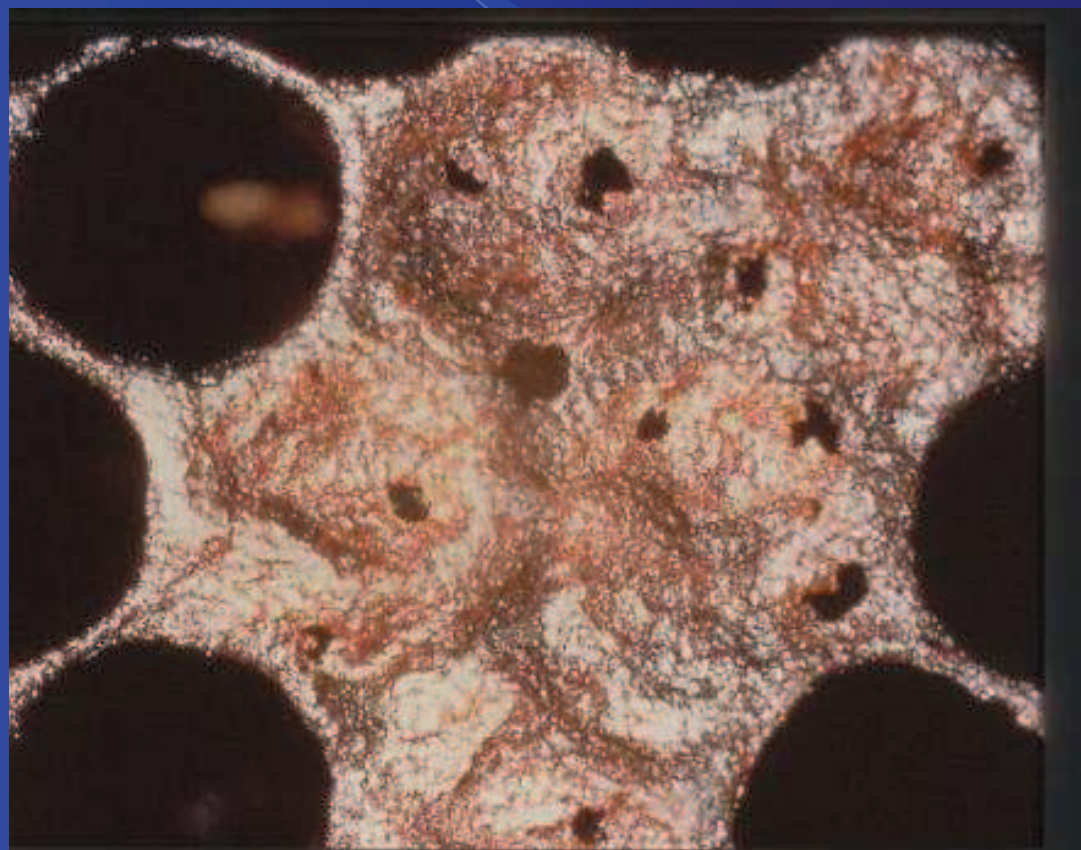
- Disposizione irregolare
- odore caratteristico



Covata sana

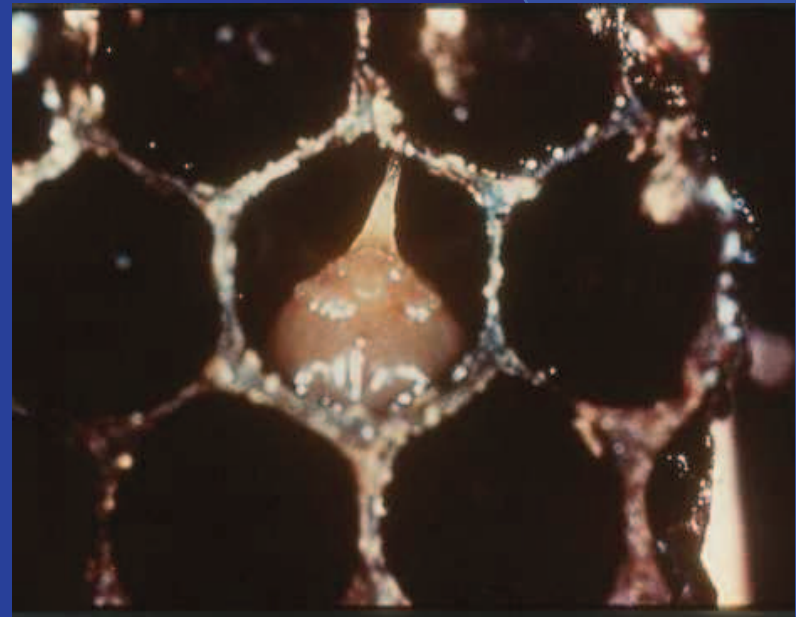


## Opercoli depressi e forati





# Trasformazioni delle larve

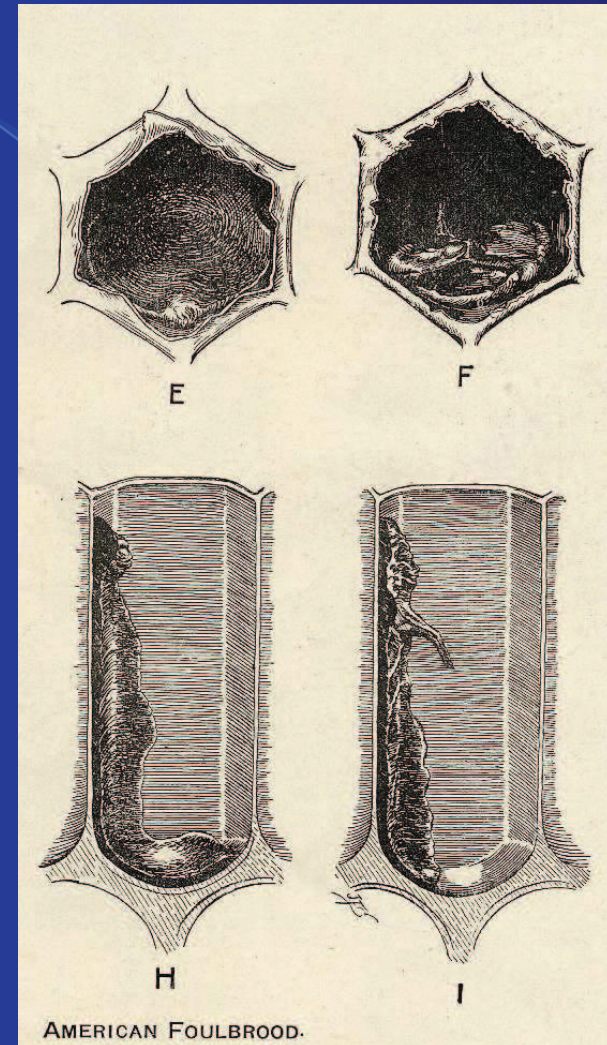
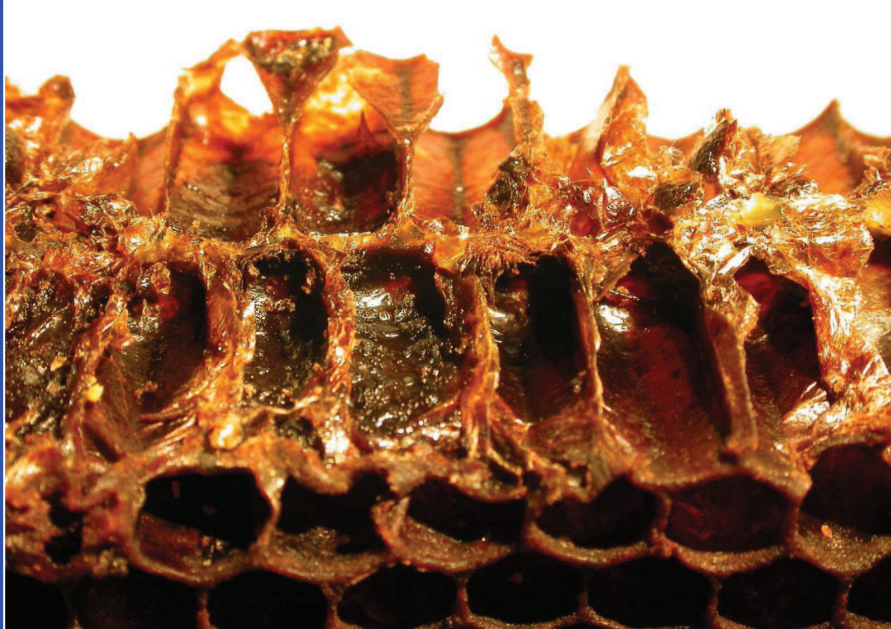
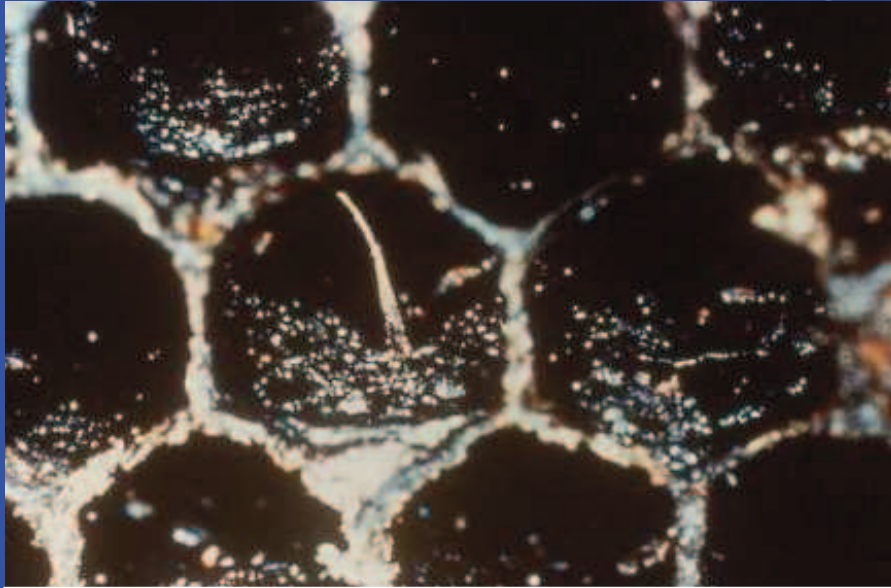


Consistenza viscosa,  
3-4 settimane dalla morte

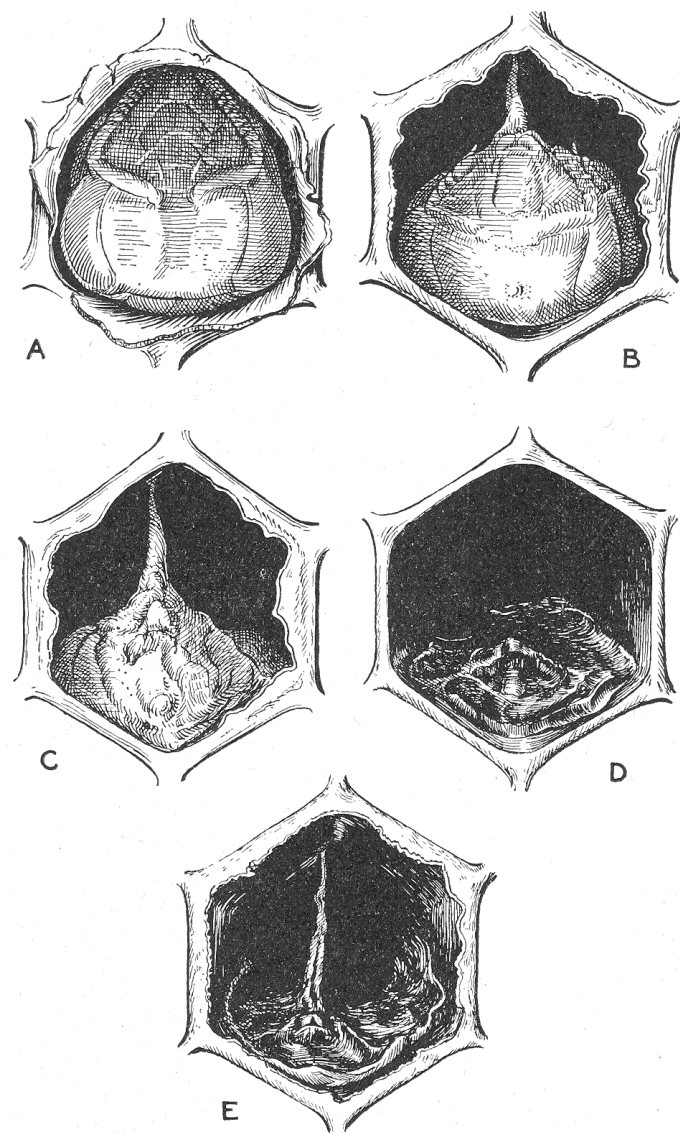
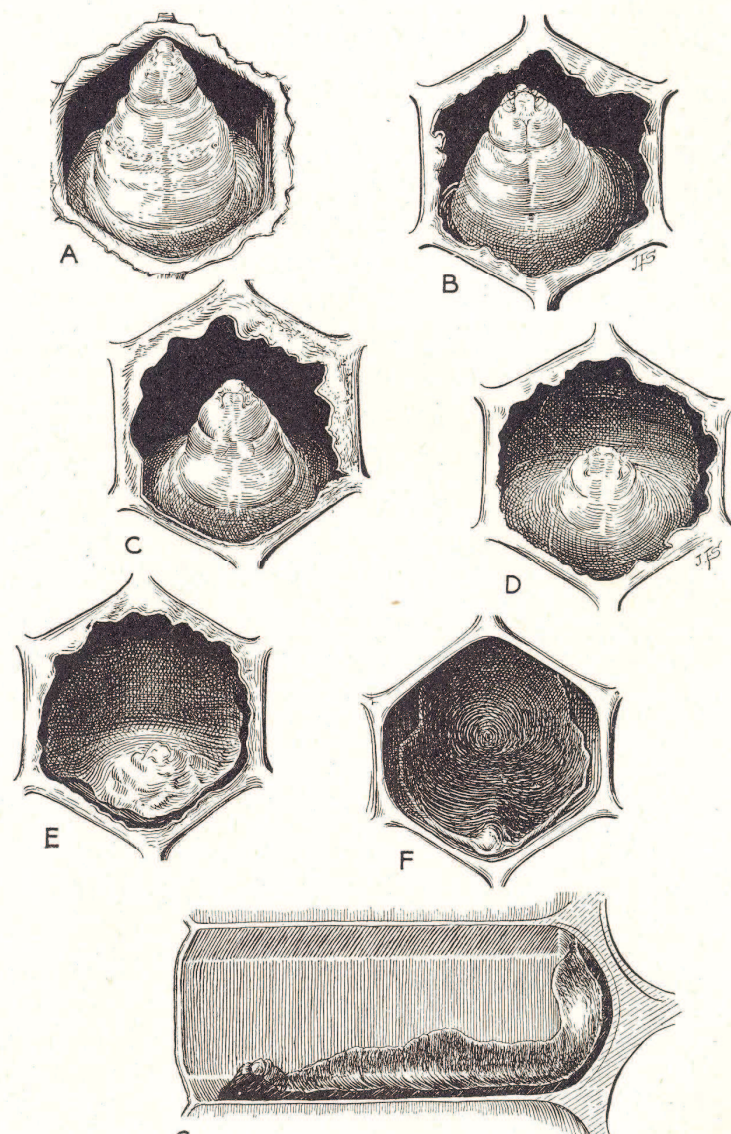




## Scaglia, 6-7 settimane dalla morte









## Variabilità della virulenza di *Paenibacillus larvae*

- Si misura con prove biologiche:  $LC_{50}$  = concentrazione di spore necessaria per uccidere il 50% degli individui
- Varia in dipendenza di fattori legati all'agente patogeno, all'ospite, all'ambiente

- $LC_{50}$  varia di un fattore pari a 10 in base al ceppo batterico e pari a 2 in base al grado di tolleranza della famiglia di api.
- Il fattore di variazione complessivo è pari a 20.
- Anche per questo la concentrazione di spore nel miele ha un valore predittivo modesto rispetto al rischio di malattia nel singolo alveare.

# Genotipi e virulenza

Geno tipo	Età morte larve $LT_{100}$	Grado virulenza <i>P. larvae</i> a livello di larva	Proporzione larvae morte dopo opercolatura	Sviluppo larve filanti e produzione spore	Rapporto diffusione infezione entro la colonia	Grado virulenza <i>P. larvae</i> a livello di colonia
ERIC I	12 gg	<u>Bassa</u>	Elevata	Elevato	Alto	<u>Alto</u>
ERIC II	7 gg	<u>Alta</u>	Ridotta	Basso	Basso	<u>Basso</u>

# Sintomi atipici

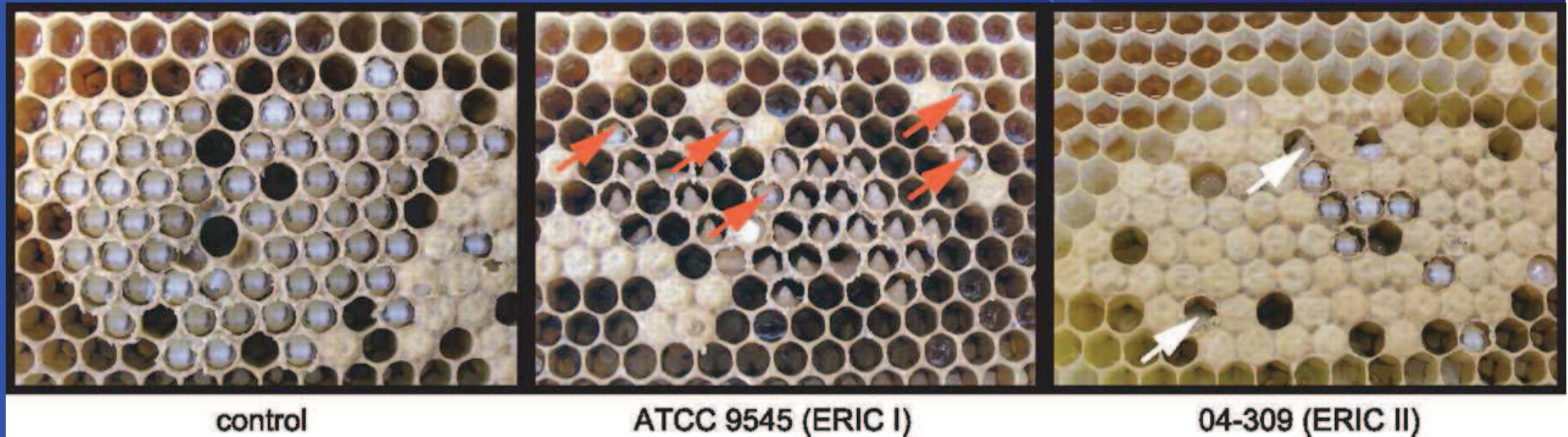
E' possibile riscontrare sintomi atipici come i seguenti:

- gli opercoli delle celle non diventano scuri;
- le larve degenerate sono di colore bruno chiaro o grigio, di consistenza più acquosa e con scarsa tendenza a formare filamenti;
- le scaglie sono di colore bruno o grigio e si possono rimuovere dalle celle con facilità; sono presenti larve bianche o grigie morte nelle celle disopercolate.

Questo quadro clinico è generalmente riferibile al genotipo ERIC II



# Sintomi a confronto



Rauch, S. et al. 2009. Appl. Environ. Microbiol. 75(10):3344-3347

# Implicazioni diagnostiche

Le larve morte prime dell'impupamento vengono rapidamente rimosse dalle api (comportamento igienico).

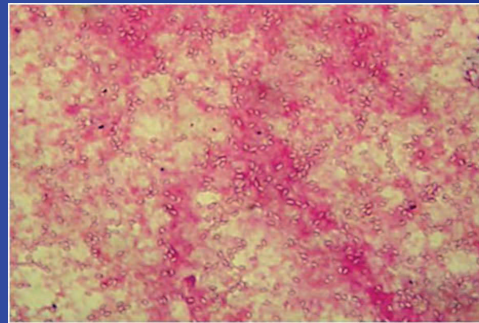
Di conseguenza l'infezione da ERIC II può sfuggire all'ispezione clinica.

In ogni caso, l'infezione in uno stadio ancora iniziale può sfuggire al controllo ispettivo a causa della rimozione delle larve infette da parte delle api, efficace se avviene prima della formazione delle spore, quando la larva non ha ancora assunto la consistenza viscosa.

# Diagnosi

In campo:

- ❖ Sintomi
- ❖ Kit diagnostici



In laboratorio:

- ❖ Osservazione al microscopio
- ❖ Prove colturali e biochimiche
- ❖ Analisi molecolari e genotipizzazione (PCR)





## Campioni da inviare al laboratorio

- Un favo intero in cui sono presenti celle sospette.
- In alternativa una porzione di favo di almeno 20x20 cm con covata sospetta e, se possibile, senza miele.
- Avvolgere il campione in fogli di carta, mettere in una scatola di cartone e inviare o consegnare al laboratorio. Non usare sacchetti o fogli di plastica.

# Fattori influenti sullo sviluppo PA

## Difese colonia:

- Resistenza fisiologica delle larve (età, genotipo ...)
- Proprietà antibatteriche di gelatina reale, polline e propoli
- Filtro del proventricolo nelle api adulte
- Microflora intestinale antagonista (← polline)
- Attività igienica

## Fattori ambientali:

- Raccolto nettare

## Agente infettivo:

- Grado virulenza
- Gradi contaminazione

# Comportamento igienico

HB = Hygienic behavior

Scoperto da Rothenbuhler (1964), HB si esprime al massimo livello nelle api di mezza età (15-20 gg) e consiste nella capacità di *individuare, disopercolare e quindi rimuovere* la covata infetta da *Paenibacillus larvae* o da *Ascosphaera apis*, prima della formazione delle spore.

In parte il meccanismo funziona anche per la covata infestata da *Varroa destructor*.

La rimozione delle larve infette avviene in maniera significativa anche prima dell'opercolatura





Le colonie di api esprimono HB in maniera molto variabile in quanto si tratta di un carattere ereditabile.

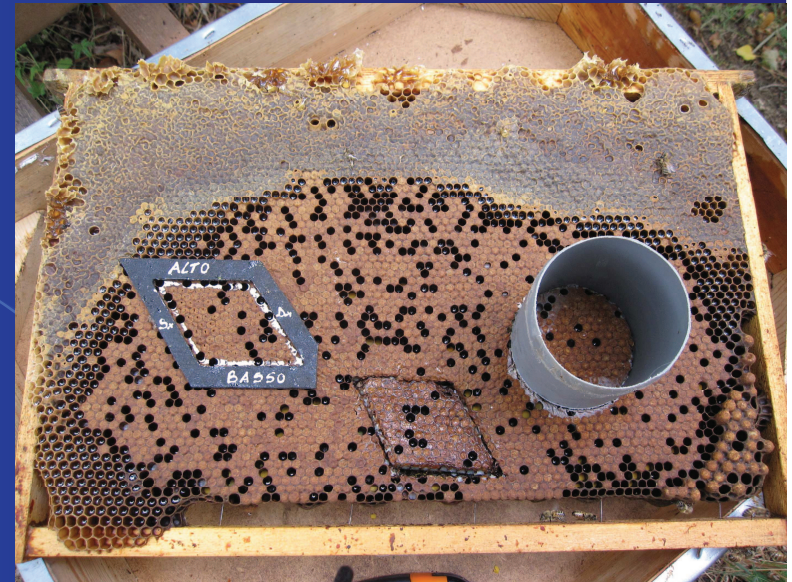
Il modello genetico è di tipo poligenico: al carattere sono associati almeno 7 QTLs che spiegano l'80% della varianza fenotipica del carattere.

E' influenzato da fattori ambientali (raccolto nettario) e dalla proporzione di api nella colonia capace di metterlo in atto.

E' mediato da stimoli olfattivi.

# Tipi di test

- Uccisione per congelamento:
  - ritaglio di porzioni di favo da mantenere per 24 ore in congelatore
  - azoto liquido
- Pin test (spillo)



# Misurazione

- % larve rimosse in n ore
- Tempo impiegato a rimuovere il 50% della covata uccisa

Le colonie “igieniche” rimuovono tutte le larve entro 48 h

Il risultato è il prodotto della maggior capacità individuale delle api e della maggiore proporzione di api impegnate nell'attività igienica

Si stima che la % di colonie “igieniche” sia attorno al 10 % in popolazioni non sottoposte a programmi di selezione.



# Epidemiologia

## Trasmissione orizzontale (tra alveari)

- **naturale:** saccheggio, deriva
- **mediata dall'uomo:** scambio di favi, nutrizione, uso di attrezzatura contaminata (arnie e accessori); movimentazione colonie e commercio

*Il rischio di saccheggio è relativo ad un raggio di 1 km*

# Epidemiologia

## Trasmissione verticale (da una generazione all'altra)

- **sciamatura**

*La sciamatura naturale comporta generalmente il risanamento a livello della colonia figlia*

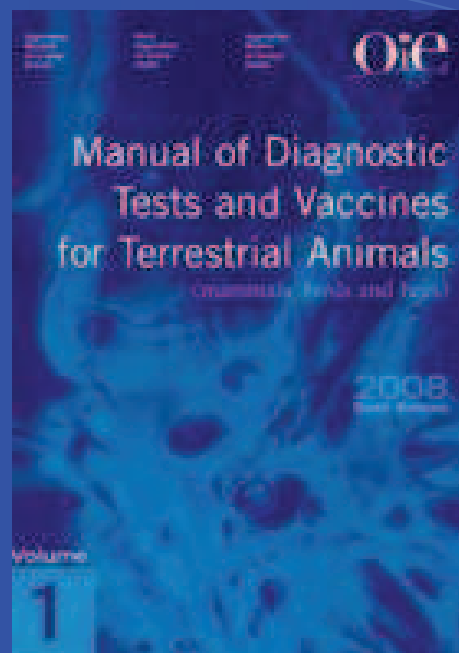
# Infezioni sub-cliniche e diagnosi preclinica

- Anche in assenza di manifestazioni cliniche gli alveari possono essere contaminati da quantità considerevoli di spore di *P. larvae*.
- Queste situazioni latenti si possono rivelare mediante la ricerca delle spore nelle matrici dell'alveare, in particolare: miele, api, residui sul fondo dell'arnia.



# Diagnosi preclinica

- ✓ Prevenzione: diagnosi dell'infezione prima dello sviluppo delle malattia
- ✓ Razionalizzazione del lavoro: ispezioni cliniche e/o interventi profilattici mirati
- ✓ Indagine conoscitiva: monitoraggio: prevalenza dell'infezione nel territorio o nell'azienda;
- ✓ Indice di valutazione dell'efficacia di programmi di risanamento



## *Metodi diagnostici Manuale Oie*

CHAPTER 2.2.2.

### AMERICAN FOULBROOD OF HONEY BEES

.....

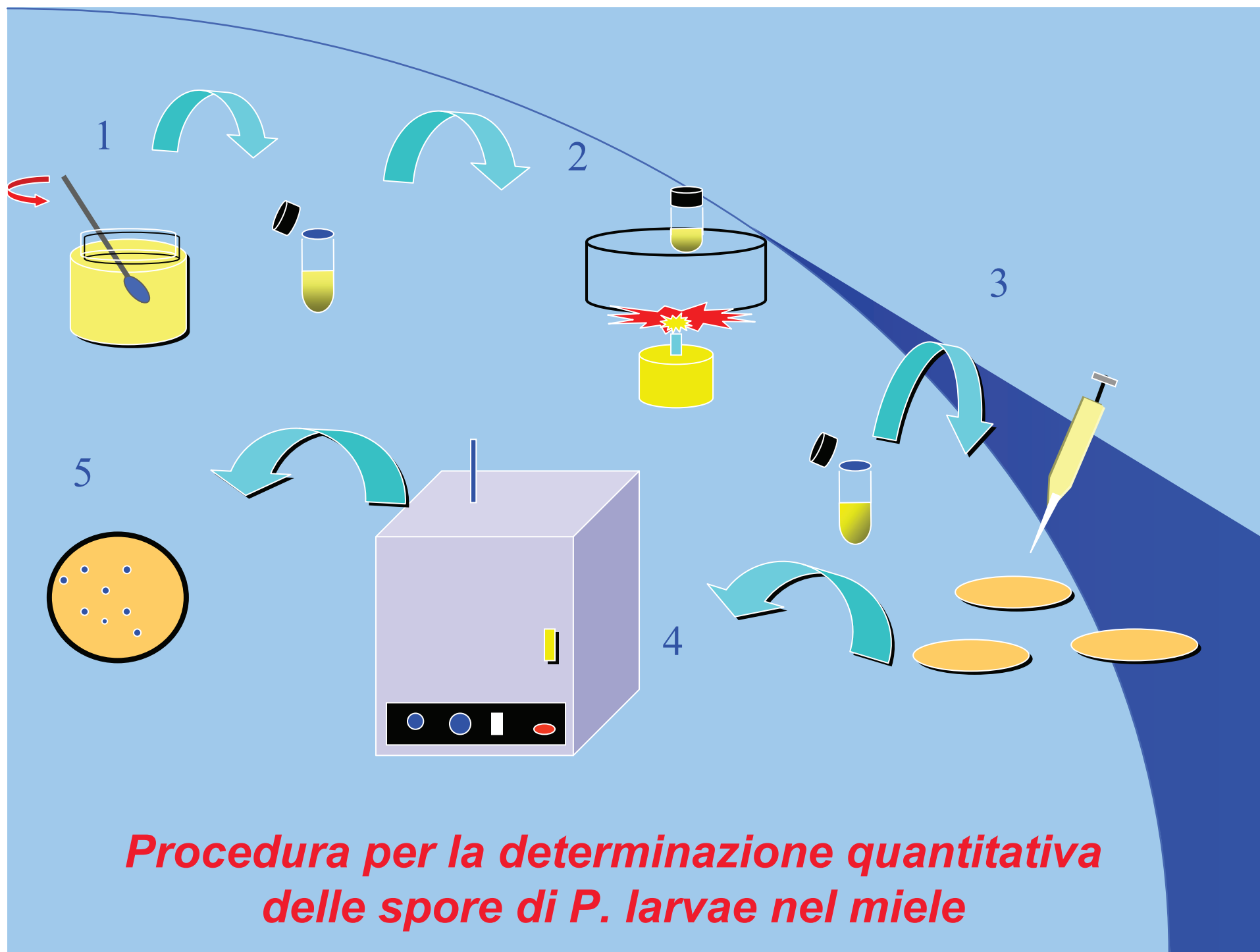
#### ii) Samples for AFB monitoring/prevention programmes

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

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

## **Raccolta campioni per la ricerca delle spore**

- a) Miele: - a fine inverno da 20% alveari  
- dopo la smielatura dai decantatori
- b) Api
- c) Detriti sul fondo dell'arnia a fine inverno  
nel cassetto diagnostico



***Procedura per la determinazione quantitativa  
delle spore di *P. larvae* nel miele***



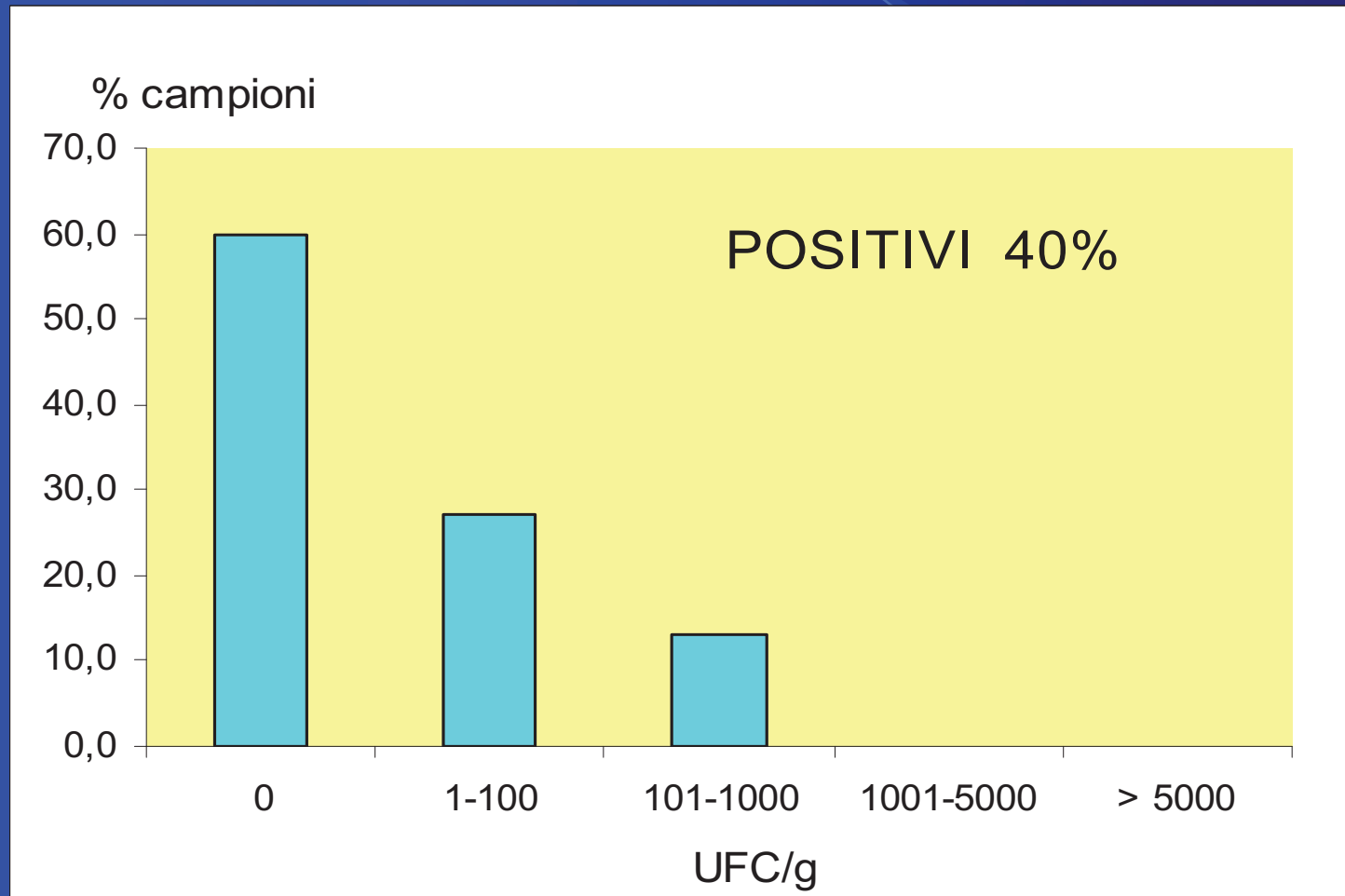
## Colonie di *P.larvae* su terreno colturale



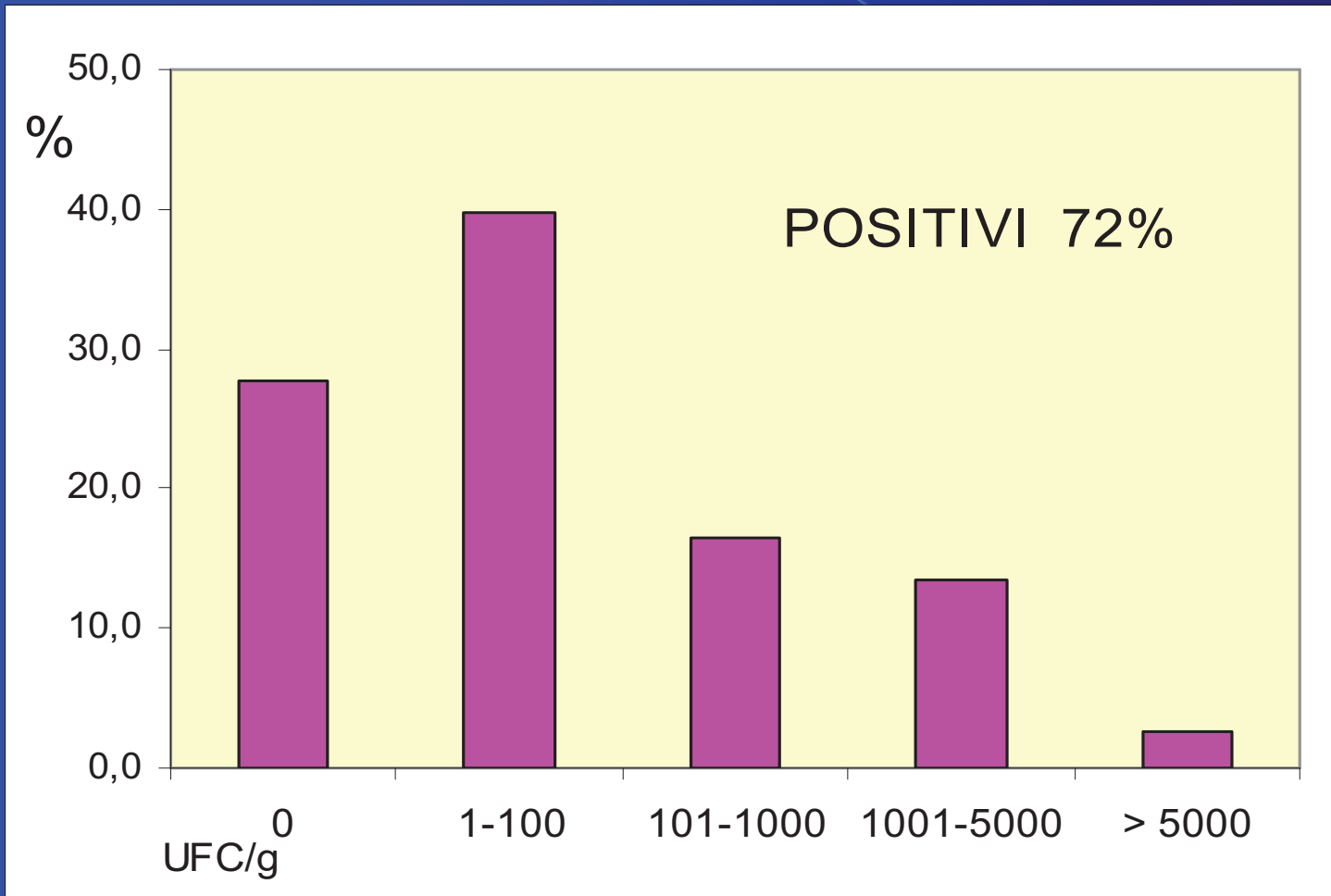
Non più del 10%  
delle spore presenti  
nel campione dà  
origine a colonie  
visibili

# Monitoraggio mediante ricerca delle spore nel miele

## Territorio a bassa prevalenza

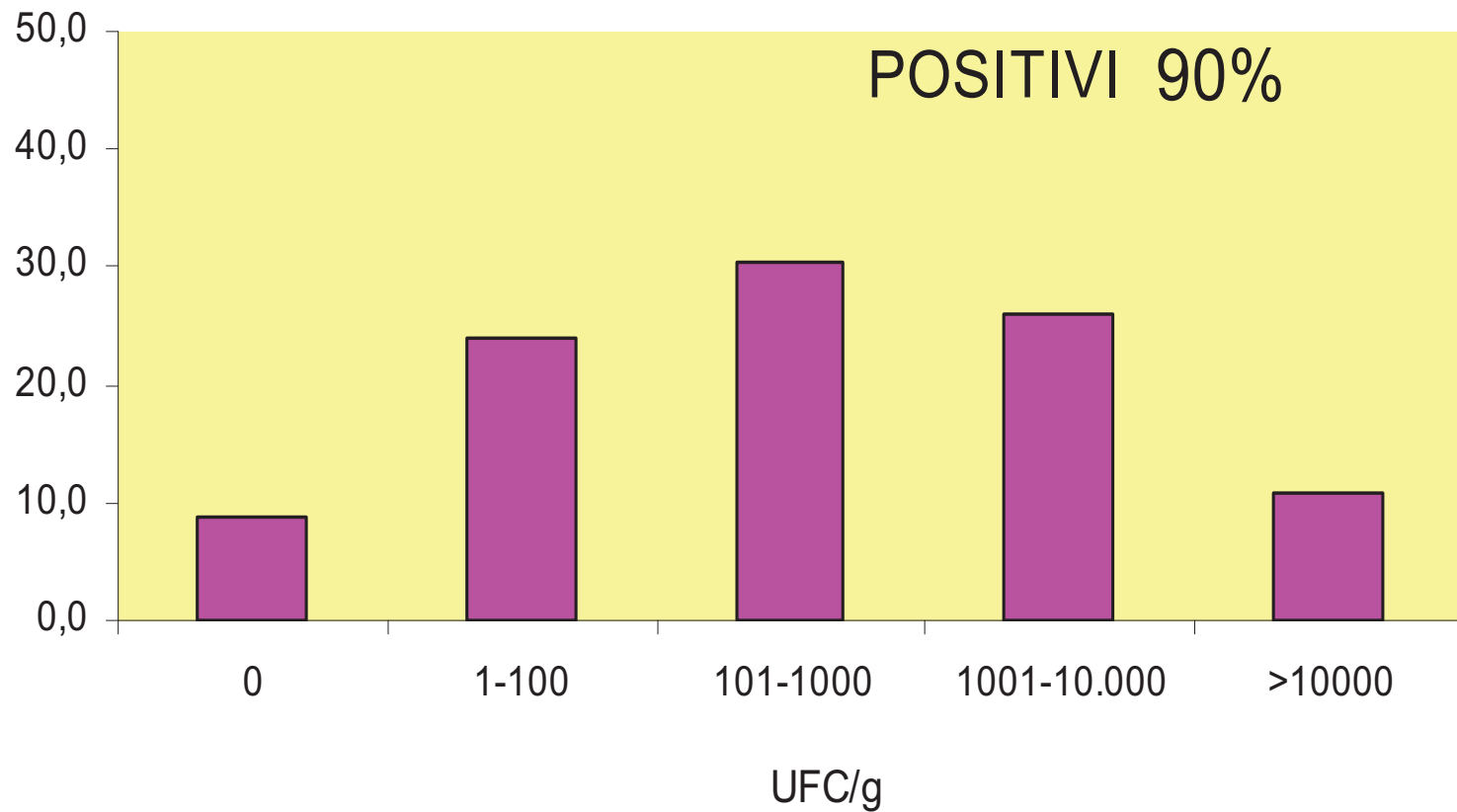


## Territorio a prevalenza media



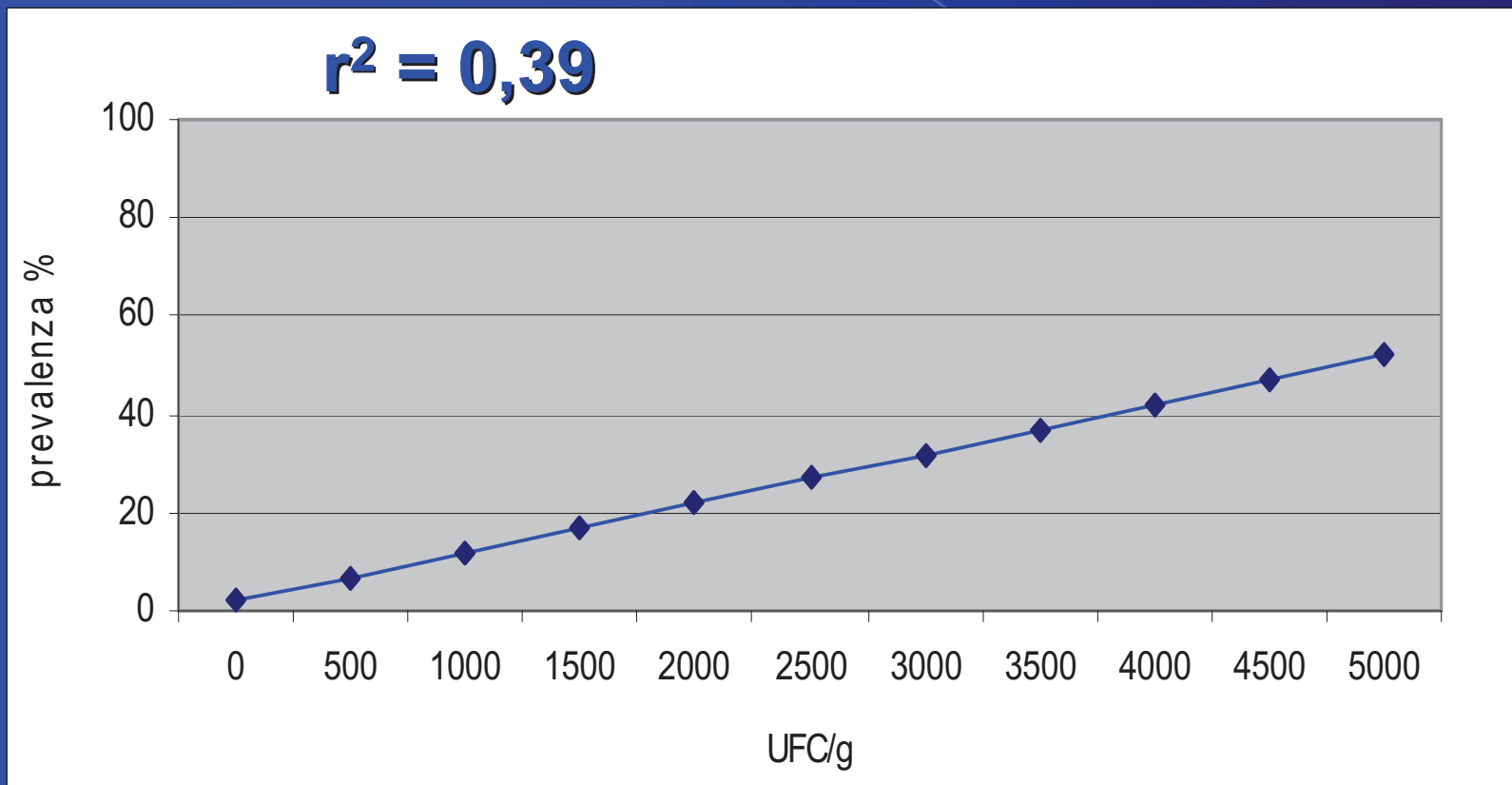
## Territorio a prevalenza elevata

% campioni



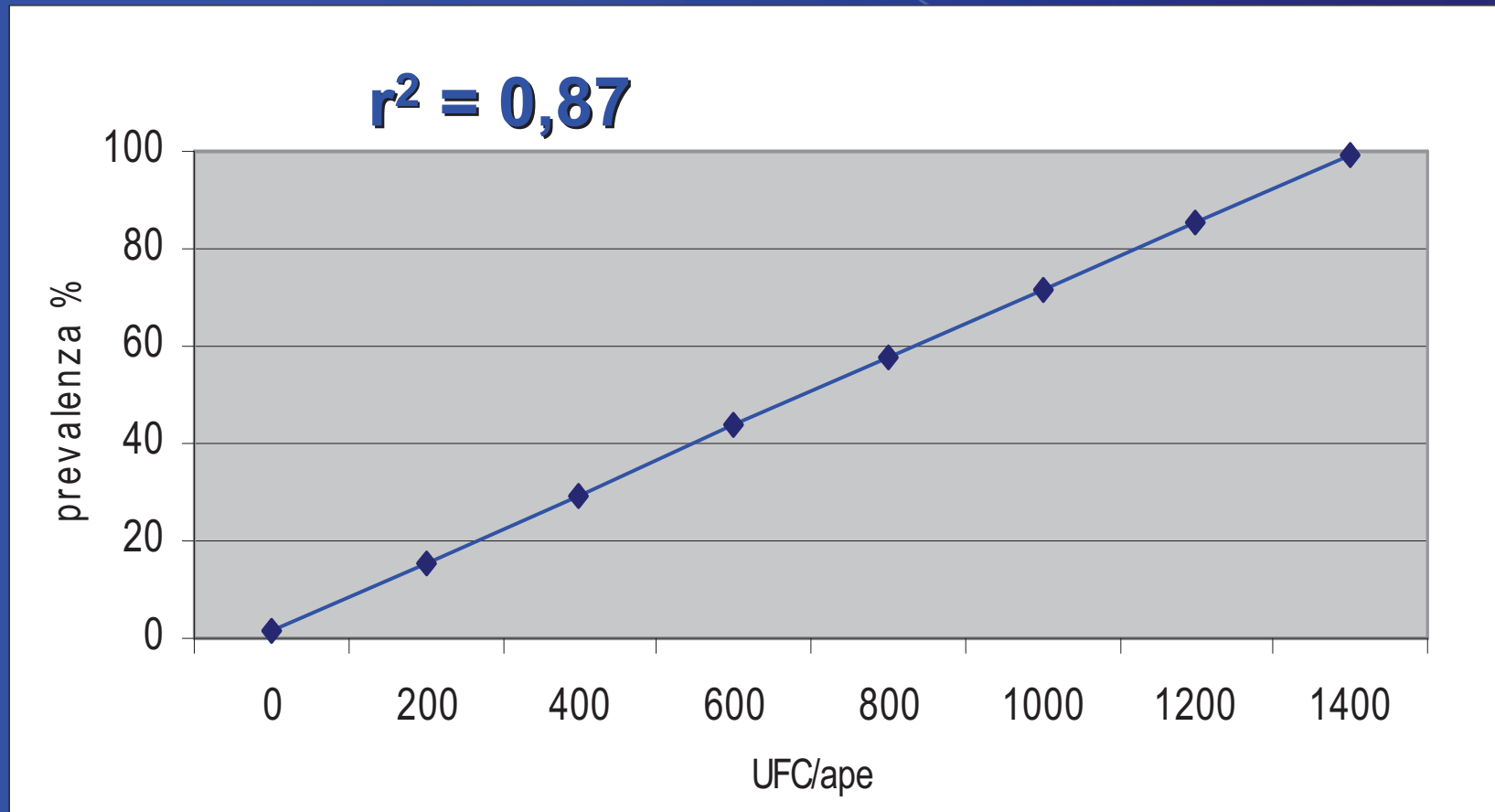


n° medio spore ➡ prevalenza PA in azienda  
Miele (produzione di massa)



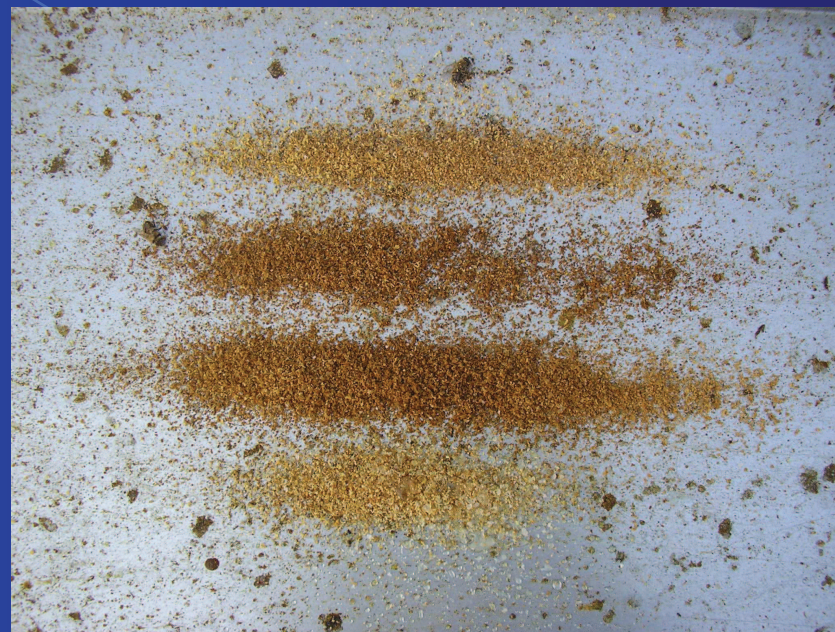
*Da: Pernal e Melathopoulos - Canada (Apiacta 2006)*

n° medio spore ➡ prevalenza PA in azienda  
Api



*Da: Pernal e Melathopoulos – Canada (Apiacta 2006)*

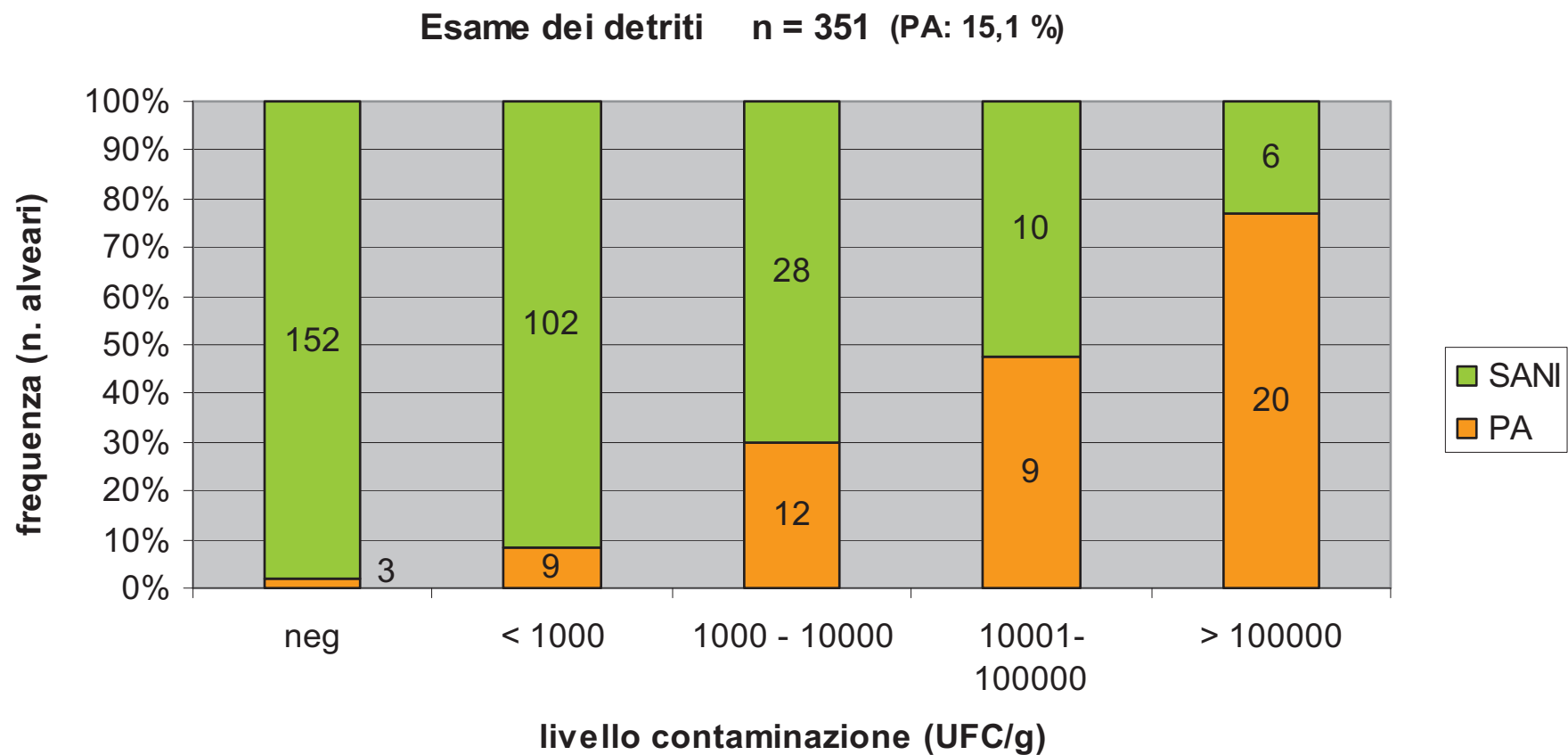
# Raccolta detriti



# Campionamento invernale

## Valore predittivo del test

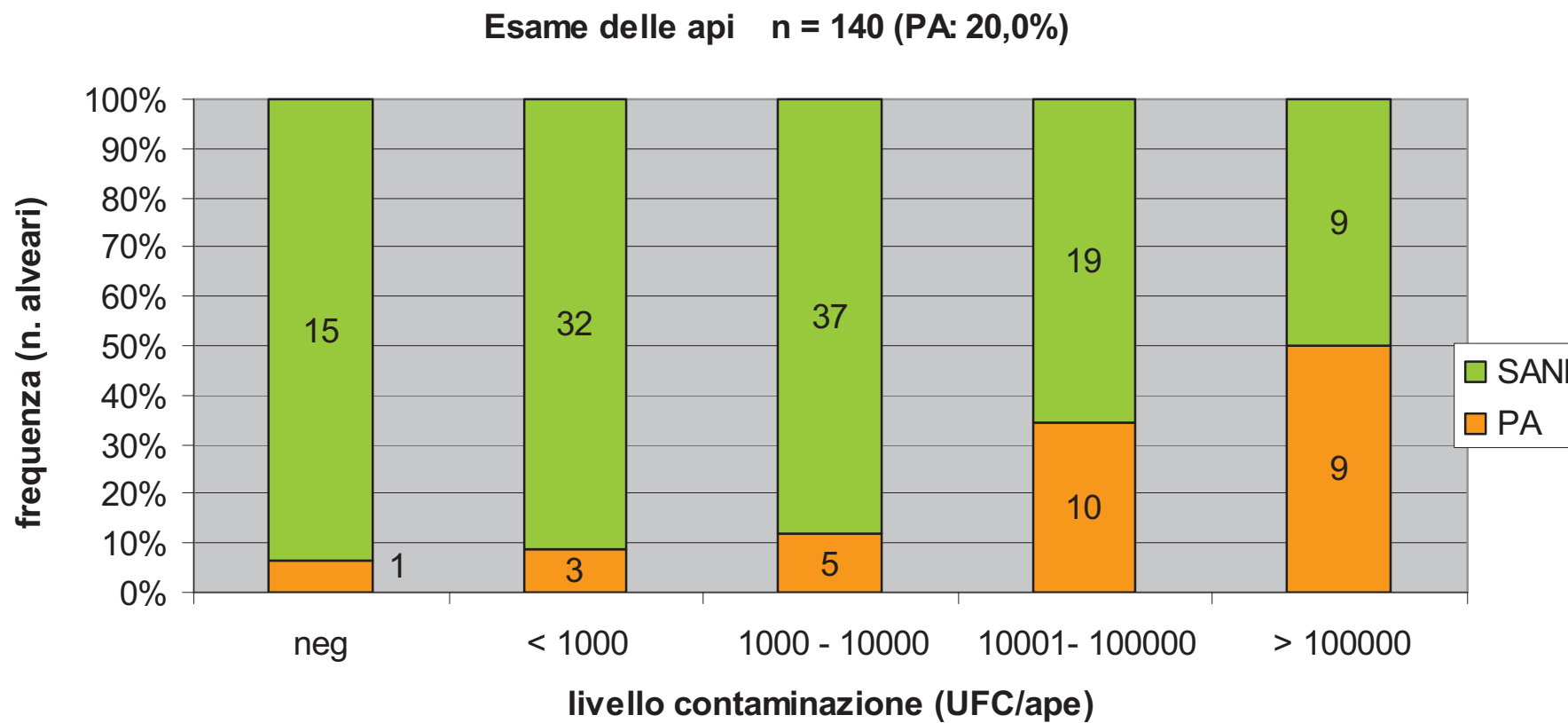
### DETRITI



*Dati CRA-API e IZSLER (2009-2011)*



# API



*Dati CRA-API e IZSLER (2009)*

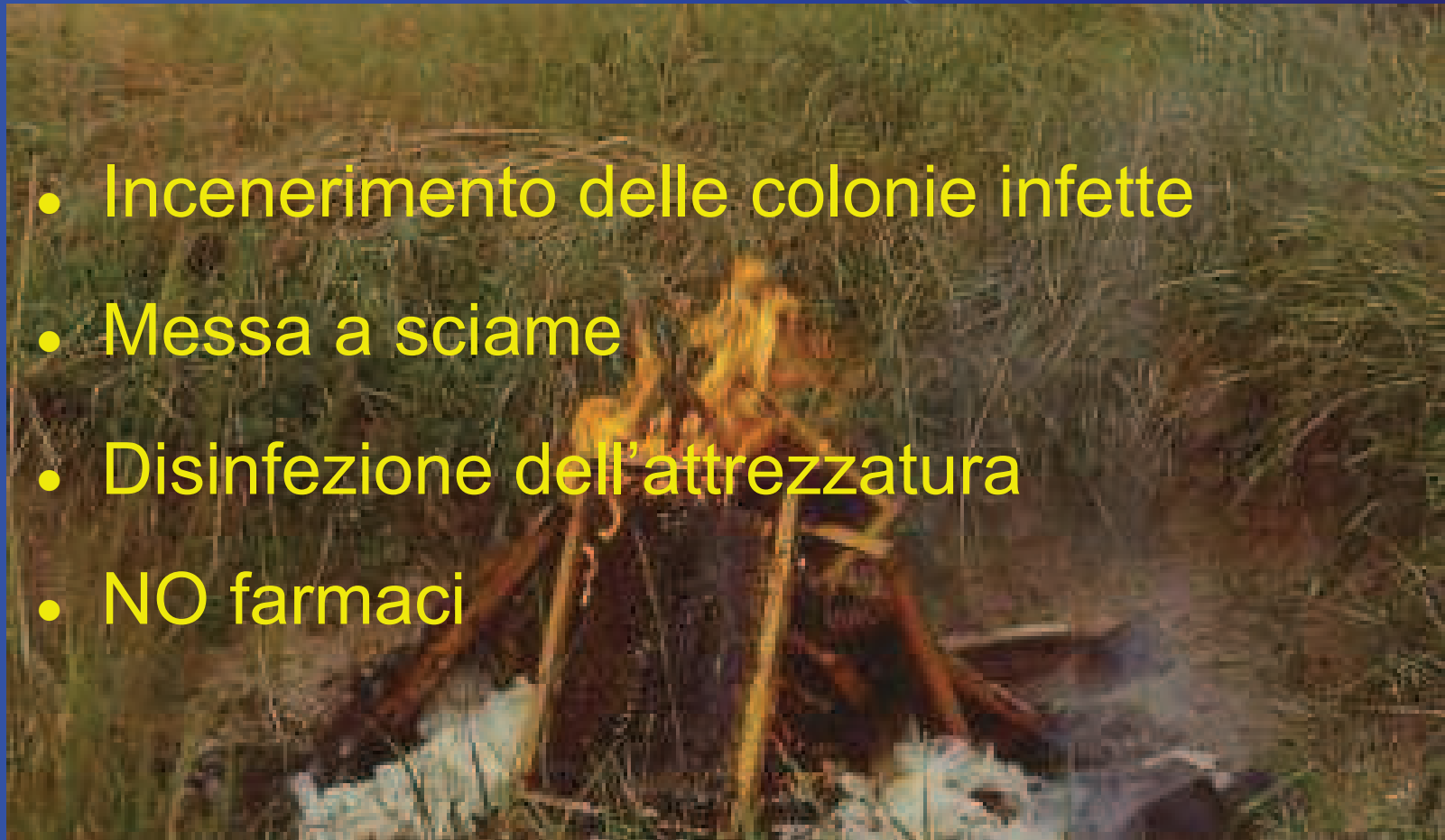
# Regolamento di Polizia Veterinaria (DPR 320/54)

- Denuncia obbligatoria all'autorità sanitaria.
- Provvedimenti restrittivi e divieti:
  - divieto di rimozione degli alveari e del materiale, ispezioni sanitarie ...
- Distruzione delle famiglie infette.
- Disinfezione delle arnie e degli attrezzi.
- Controllo degli apiari nel raggio di 3 km
- Trattamenti curativi consentiti solo in caso di malattia allo stadio iniziale.

# Controllo

Conformemente alla legislazione

- Incenerimento delle colonie infette
- Messa a sciame
- Disinfezione dell'attrezzatura
- NO farmaci



## Metodi biotecnici: messa a sciame con doppio travaso

- Tecnica laboriosa, da associare alla disinfezione dell'arnia e distruzione dei favi (o sterilizzazione con le radiazioni ionizzanti)
- Efficacia > 95%
- Applicabile nei periodi di raccolto
- Presuppone l'efficienza delle difese naturali delle colonie
- Può essere impiegata anche solo come misura preventiva



# Antibiotici

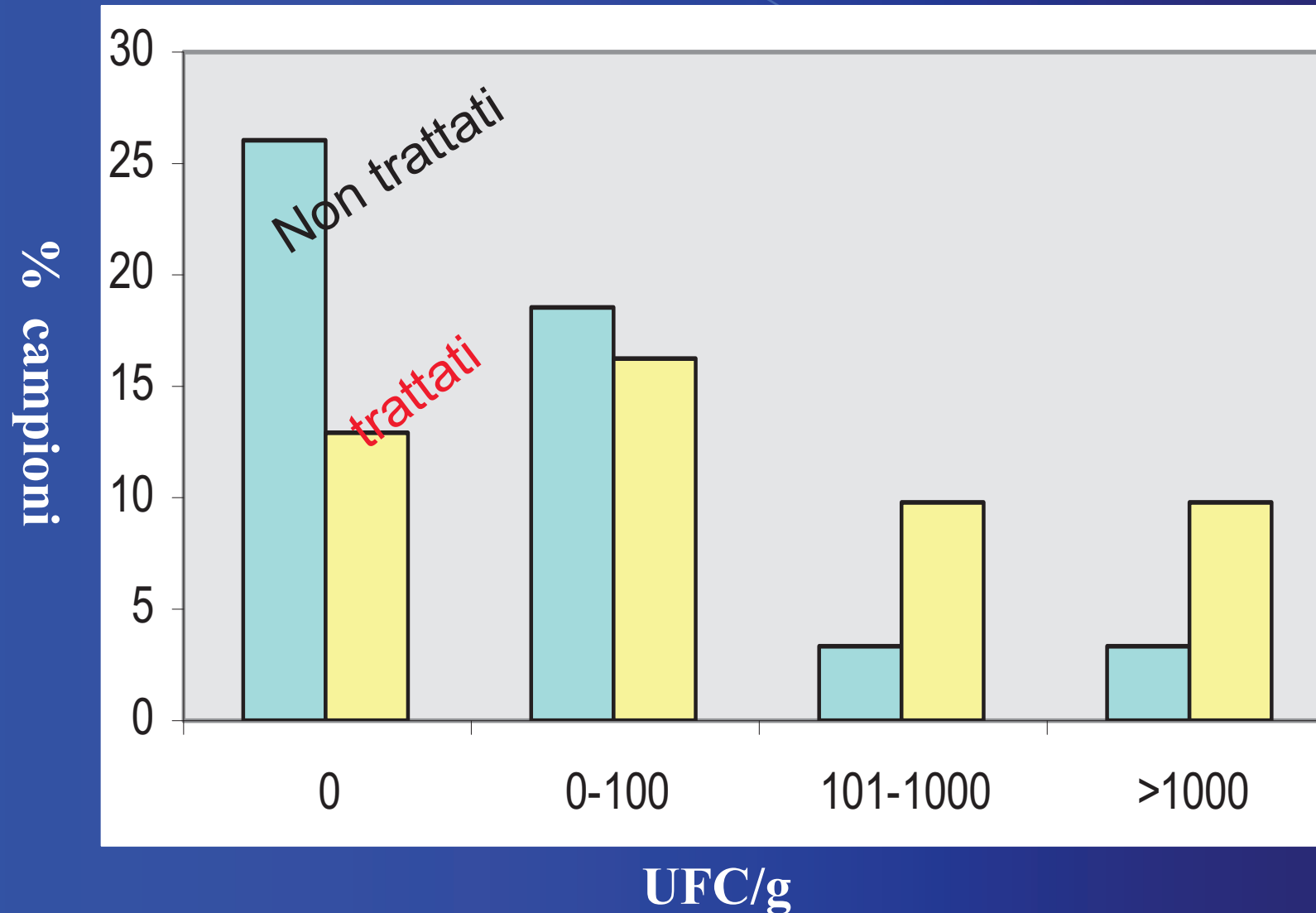
- Utilizzo non autorizzato
- Rischio residui
- Metodo non risolutivo che facilita la persistenza e la diffusione dell'infezione allo stato latente
- Rischio farmaco-resistenza



# Residui di antibiotici nel miele

- Nei paesi dell'Unione europea, in mancanza di un limite massimo residuale (LMR), non è tollerato alcun residuo.
- Oggi i metodi analitici in uso rilevano livelli di residui molto più bassi rispetto ad un recente passato.
- Quindi, anche il rispetto di un periodo di sospensione tra il trattamento e il raccolto non annulla il rischio di contaminare il miele del melario con tracce di antibiotici.
- Una volta contaminato il miele l'antibiotico residua per diversi mesi (almeno 4 l'ossitetraciclina, almeno 8 mesi la tilosina).
- Il limite di azione di 5 microgrammi / kg (ppb) stabilito dal Piano Nazionale Residui costituisce una misura provvisoria, che può essere in futuro revocata; inoltre tale limite vale solo per il prodotto commercializzato in Italia.
- Oltre che nel miele gli antibiotici residuano in altre matrici, in particolare nella propoli e nella gelatina reale.

# Situazione sub-clinica (contaminazione miele spore *P. larvae*) in apiari trattati e non trattati con antibiotici



# Principi naturali sperimentati contro *P. larvae*

## Composti

### In vitro

- Oli essenziali
- Acidi grassi
- Azadiractina
- ...

### In campo

- olio essenziale di cannella*  
(*Cinnamom sp.*)  
(Floris et al. 1990, 1996;  
Carpana et al. 1996)
- *Acido linoleico*  
(Carpana et al. 1999-2004)

## Probiotici

- Batteri simbionti  
ape:  
*Lactobacillus*,  
*bifidobacterium*  
.....

**MINIMA CONCENTRAZIONE INIBENTE**  
**SULLA CRESCITA DI *Paenibacillus larvae*\***

antibiotici	MIC $\mu\text{g/ml}$		
	media	min	max
Ossitetraciclina	<b>0,11</b>	0,02	0,38
Tilosina	<b>0,11</b>	0,01	0,38
Amossicillina	<b>0,26</b>	0,09	0,75
Acido linoleico	<b>2,25</b>	1,25	2,50
Olio ess. di cannella	<b>64</b>	40	80



# Disinfezione

## Agenti chimici

- Soluzioni disinfettanti
  - soda caustica
  - lisciva di soda
  - ipoclorito di sodio
  - formalina
  - Ecc.
- gas/vapori germicidi
  - ossido di etilene
  - bromuro di metile
  - formalina

# Agenti fisici

## *Calore*

- secco  
(fiamma,  
forno)
- paraffina
- umido  
(ebollizione,  
autoclave)

## *Radiazioni*

- raggi UV
- radiazioni  
ionizzanti
  - elettroni  
accelerati
  - raggi gamma

# Disinfezione dell'arnia e dell'attrezzatura in legno

- Soda caustica

1. raschiatura superficie
2. immersione per 5-20 min in soluzione bollente di soda caustica 1%
3. risciacquo per immersione in acqua calda

*Efficacia = 100 %*

## • Ipoclorito di sodio

1. raschiatura superficie
2. immersione per 30 min in soluzione 5 %
3. risciacquo

Per piccola attrezzatura e utensili:  
immersione in soluzione 0,6% ca + tensioattivo (teepol,  
detersivo ...) per 30 min

***Efficacia = 99,9 %***

- **Paraffina**

- ◆ immersione a 160 °C per 10 min

- **Forno**

- ◆ 170 °C per 1 ora - (160 °C per 2 ore)

- **Radiazioni ionizzanti**

*Efficacia 100 %*



## ● Altri mezzi

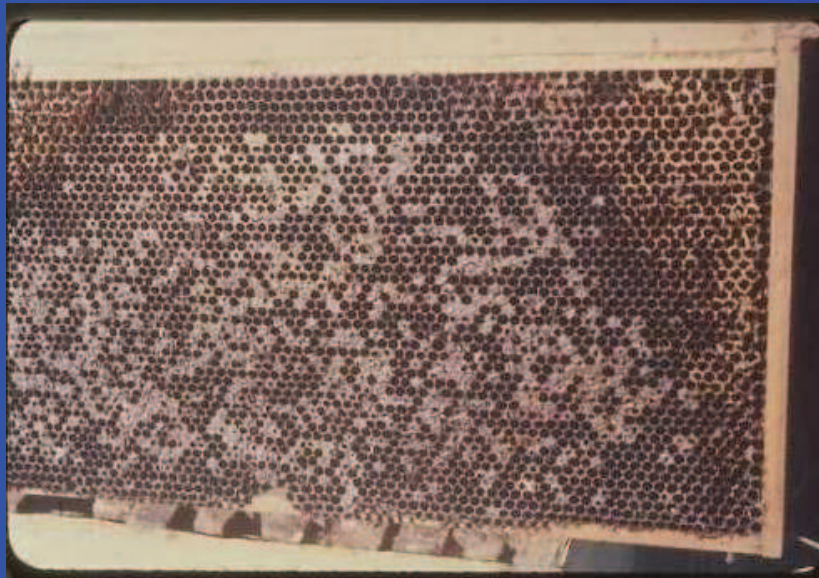
Raschiatura superficie + una delle seguenti procedure:

- Lavaggio energico con acqua calda e detersivo
- Getto di acqua fredda ad alta pressione
- Trattamento con disinfettanti per superfici
- Flambaggio fino ad imbrunimento

*Efficacia ~ 80%.*



# Radiazioni gamma



- Efficaci contro tutti gli agenti infettivi dell'alveare
- Molto penetranti
- Non alterano il materiale
- Adatti alla bonifica di tutti i materiali in particolare dei favi e della cera
- Dosaggio: 12,5 - 25 kGy

# Fattori limitanti l'impiego delle radiazioni ionizzanti

- Disponibilità limitata di impianti
- Costi: trattamento e trasporto
- Aspetti organizzativi e normativi
- Non si può trattare il miele



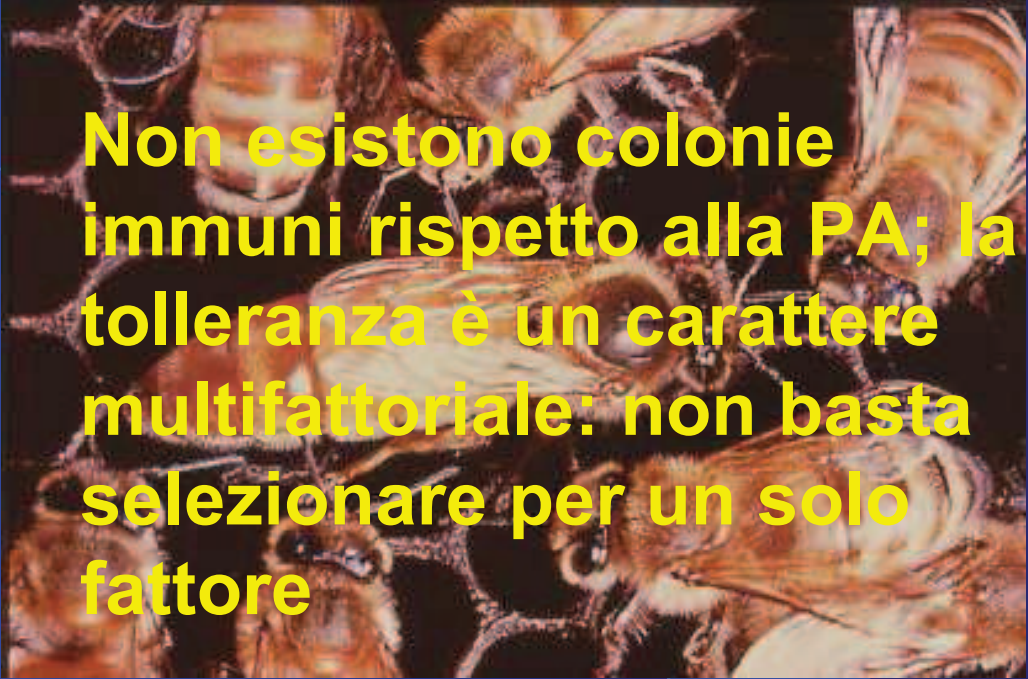
# Ipotesi di trattamento dei favi e delle arnie presso un impianto di irradiazione

- Volume unità di trattamento:
  - 120 x 100 x 200 cm
  - 20 arnie e 220 favi oppure 65 melari
- Dosaggio
  - da 12,5 a 25 kGy
- Costo
  - circa 180 Euro



# Selezione

## Il comportamento igienico



**Non esistono colonie immuni rispetto alla PA; la tolleranza è un carattere multifattoriale: non basta selezionare per un solo fattore**

- è misurabile con test di campo
- è migliorabile attraverso programmi di miglioramento genetico



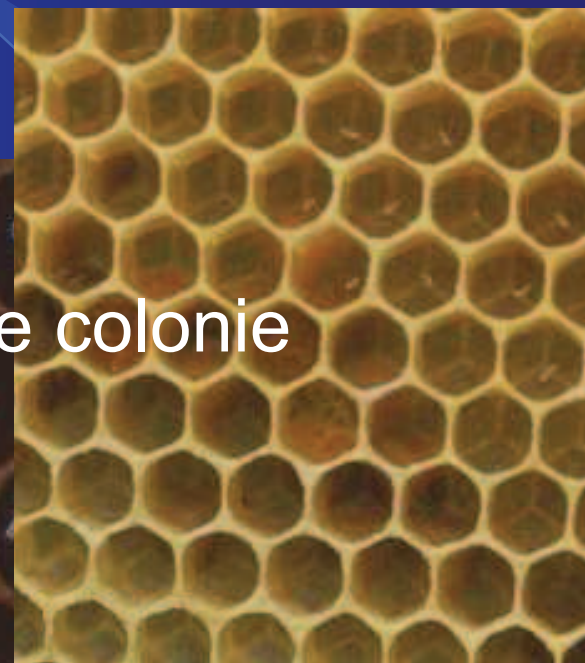
*In mancanza di metodi di controllo risolutivi,  
la lotta contro la peste americana si basa sulla  
prevenzione:*

✓ *Diagnosi precoce*

✓ *Buone pratiche di apicoltura*

# Strategia aziendale per la profilassi

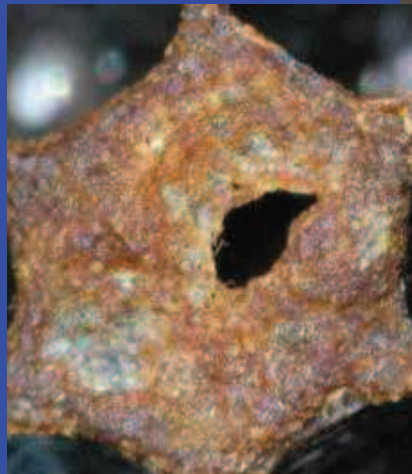
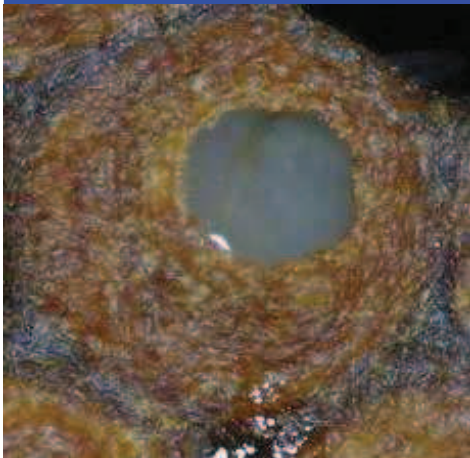
- Cautela negli acquisti di alveari e sciame
- Controlli sanitari; diagnosi precoce
- Sostituzione frequente dei favi
- Procedure di quarantena
- Provvedimenti di eliminazione delle colonie infette
- Messa a sciame
- Disinfezione



E' importante operare in un territorio sottoposto a controllo sanitario

# Ispezioni sanitarie

- Diagnosi precoce
- Sistematiche: soprattutto prima di procedere alla rimozione di favi o melari
- Accurate: ispezionare tutti i favi e aprire tutte le celle sospette



## Quarantena

- Sistema di gestione finalizzato a limitare al massimo le possibilità di trasmissione dell'infezione tra gli alveari. La PA si diffonde più mediante le pratiche apistiche che mediante le api
- Può essere applicata a livello di alveare o più semplicemente di apiario
- Evitare lo scambio di attrezzatura tra alveari/apiari,
- Evitare il saccheggio