

# **STRATEGIE di CONTROLLO** **di *Varroa destructor* e MONITORAGGIO** **di *Nosema ceranae* e *N. apis*** **in LOMBARDIA**

Quaderni della Ricerca  
 n. 162 - settembre 2014

  
**Regione Lombardia**  
 Agricoltura

**Sperimentazione condotta nell'ambito del progetto di ricerca n° 1437. "Strategie di controllo di *Varroa destructor* e monitoraggio di *Nosema ceranae* e *N. apis* in Lombardia" - STRANOVA. d.g.r. n° 9945 del 29/07/2009 - (Programma regionale di ricerca in campo agricolo 2007-2009).**

**Testi a cura di:**

Mario Colombo, Caterina Cambuli, Nicolò Corsi, Nikolay Dobrynin, F. Romana Eördegh,  
Andrea Galli, Michele Mortarino, Antonio Nanetti, Lorenzo Sesso

**Hanno realizzato le attività sperimentali:**

Università degli Studi di Milano  
Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente  
via Celoria, 2 - 20133 Milano  
referente: Prof. Mario Colombo, mario.colombo@unimi.it

Dipartimento di Scienze animali e sanità pubblica  
Via Celoria, 10 - 20133 Milano  
referente: Dott. Michele Mortarino, michele.mortarino@unimi.it

Istituto Italiano Sperimentale Lazzaro Spallanzani  
Località "La Quercia" 26027 Rivolta d'Adda (Cremona)  
referente: Dott. Andrea Galli, andrea.galli@istitutospallanzani.it

Spallanzani Technologies srl  
Via Capolago 16 - 20133 Milano  
referente: Prof. Luigi Bonizzi, luigi.bonizzi@unimi.it

Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura,  
Unità di Ricerca di Apicoltura e Bachicoltura  
Via di Saliceto 80 - 40128 Bologna (BO)  
referente: Dott. Antonio Nanetti, antonio.nanetti@entecra.it

Department of Plant Protection and Beekeeping  
Voronezh State Agricultural University, Voronezh, Russia  
referente: Prof. Nikolay Dobrynin, ndobrynin@rambler.ru

APA Varese in rappresentanza di: APA Sebini e Valli Confluenti, APA Milano Lodi,  
APA Valle Camonica, APA Brescia, APA Sondrio, APACL Como Lecco  
referente: Dott. Lorenzo Sesso, lorenzo.sesso@gmail.com

Fondazione P. Fojanini di Studi Superiori  
Via Valeriana, 32 - 23100 Sondrio  
referente: Dott.ssa Carla Gianoncelli, cgianoncelli@fondazionefojanini.it

**Per Informazioni:**

Regione Lombardia - Direzione Generale Agricoltura  
U.O. Sviluppo di innovazione, cooperazione e valore delle produzioni  
Struttura Sviluppo e promozione delle produzioni, ricerca,  
innovazione tecnologica e servizi alle imprese  
Piazza Città di Lombardia 1 - 20124 Milano  
tel: +39.02.6765.3790 fax: +39.02.6765.8056  
e-mail: agri\_ricerca@regione.lombardia.it  
referente: Elena Brugna, Giovanna Praderio - tel: +39.02.6765.3732  
e-mail: elena\_brugna@regione.lombardia.it

ISBN 978-88-905989-3-7

© Copyright Regione Lombardia



Regione Lombardia  
Agricoltura



# STRATEGIE di CONTROLLO di *Varroa destructor* e MONITORAGGIO di *Nosema ceranae* e *N. apis* in LOMBARDIA



## Indice

### Presentazione

Introduzione. Apicoltura lombarda: storia e prospettive. Conoscere il passato per progettare il futuro ..... 7

Capitolo 1. Varroosi e nosemosi. Stato dell'arte ..... 12

Capitolo 2. Controllo della varroosi. .... 16

2.1 Miglioramento dei sistemi esistenti di monitoraggio dell'infestazione da varroa: valutazione comparativa dell'affidabilità di metodiche diverse ..... 16

2.2 Trattamenti farmacologici per il controllo di *Varroa destructor* . . 26

2.2.1 Comparazione di efficacia fra acido ossalico in soluzione standard e acido ossalico contenente glicerolo ..... 26

2.2.2 Uso di Api-bioxal® nel trattamento invernale della varroosi . 30

2.2.3 Tollerabilità ed efficacia antivarroa dell'acido formico in gel (Mite-Away Quick Strips®) in assenza naturale di covata ..... 34

2.2.4 Tollerabilità ed efficacia dell'estratto di Neem come coadiuvante del trattamento acaricida tramite blocco di covata e acido ossalico (Api-Bioxal®). .... 37

2.3 Metodologie meccaniche: il blocco di covata ..... 40

2.4 Soluzioni innovative: studio di espressione genica sul comportamento igienico dell'*Apis mellifera* ..... 46

Capitolo 3. Aumento della conoscenza sulla diffusione di *Nosema ceranae* in Lombardia. Monitoraggio di *Nosema ceranae* e *N. apis* nel territorio lombardo. .... 51

Capitolo 4. Vademecum per gli apicoltori ..... 56

Prodotti del Progetto ..... 61

Bibliografia consultata ..... 63



## Presentazione

Il settore apistico, da tempo, vive una doppia realtà. Se da un lato le produzioni apistiche hanno sempre maggiore presa sul consumatore, dall'altro, una molteplicità di eventi negativi sono causa di problemi gestionali.

Soprattutto, dopo l'avvento della varroasi, la più grave parassitosi dell'ape, le tecniche apistiche si sono dovute modificare, al fine di potere salvare le api e continuare ad ottenere le produzioni mantenendone comunque inalterata la qualità.

Regione Lombardia ha sempre tenuto in profonda considerazione il settore apistico, non solo per l'aspetto commerciale, ma anche per il grande beneficio ambientale, portato da questi allevamenti attraverso l'azione pronuba.

Ai fini di salvaguardare il patrimonio apistico, valorizzare le produzioni e sostenere il settore, a completamento delle iniziative intraprese con il progetto di ricerca nazionale APENET, Regione Lombardia ha finanziato il progetto "Strategie di controllo di *Varroa destructor* e monitoraggio di *Nosema ceranae* e *N. apis* in Lombardia (STRANOVA)", i cui risultati sono oggetto di questo volume: le attività sperimentali sono state dedicate specificatamente a due gravi avversità, varroasi e noseemiasi, causate dall'acaro *Varroa destructor* e da funghi del genere *Nosema*.

Tale scelta ha posto come obiettivo il conseguimento di risposte precise, suffragate da sperimentazioni rigorose con finalità applicative, da consegnare al settore per meglio tutelare gli allevamenti.

Come è regola per qualsiasi ambito scientifico, i risultati delle ricerche rappresentano un piccolo passo avanti nella soluzione dei problemi, in attesa che nuove condizioni permettano di proporre ulteriori possibilità più efficaci e maggiormente praticabili.

Nella certezza che questo contributo rappresenti un utile aiuto al settore e all'ambiente, sin da oggi possiamo dare la garanzia che Regione Lombardia continuerà a prestare le dovute attenzioni verso le api e coloro che le gestiscono.

**Direzione Generale Agricoltura  
Regione Lombardia**





# Apicoltura lombarda: storia e prospettive

## *Conoscere il passato per progettare il futuro*

Mario Colombo

**A**ttorno alla prima metà del 1800, in Lombardia, l'attenzione verso le api e il loro allevamento crebbe in modo prepotente e si sviluppò con modalità simili a quelle delle regioni limitrofe. A tutti gli effetti, la conduzione degli allevamenti fu caratterizzata da una certa omogeneità nell'intera area padano-alpina.

In tutto il Nord, l'attività produttiva venne sostenuta e trovò ispirazione e informazione tramite due canali di comunicazione. Quello diretto, orale, propiziato dalle Organizzazioni apistiche o semplicemente dai singoli apicoltori motivati e preparati, e quello legato alla comunicazione scritta, con libri e riviste, non di rado editi da Associazioni di apicoltori o da zelanti allevatori desiderosi di trasmettere le proprie conoscenze.

Si ha ragione di credere che il sinergismo fra la comunicazione orale e quella scritta fu l'arma vincente nel determinare la crescita tecnologica e numerica del settore apistico di quegli anni. In questo senso, senza nulla togliere all'intraprendenza delle regioni limitrofe, che comunque si sono prodigate, la Lombardia ne fu modello ispiratore.

La libera iniziativa portò, dalla metà dell'ottocento, alla redazione di diverse riviste, testi librari e all'organizzazione di molteplici incontri plenari a tema apistico. Attività, queste, che si protrassero per molti decenni e che determinarono una continua attenzione all'argomento e una crescita culturale oltre che a una maggiore diffusione dell'apicoltura.

Tanto per citare qualche esempio riguardante l'indubbio e crescente fermento attorno a questa attività, a Brescia si costituì la Società Apicoltori Prealpini (1824); a Milano la Società d'Incoraggiamento fra Apicoltori (1865); a Mantova la Società Apicoltori Mantovani (1922). Fra le riviste si ricordano: a Mantova, nel 1824, "La melissa"; a Milano, nel 1868, "L'Apicoltore". Fra i testi editi in Lombardia: "Coltivazione delle api pel Regno d'Italia", Milano, 1811; "Breve trattato di Apicoltura per uso dei contadini e delle scuole rurali", Milano, 1872; "L'apicoltura in Italia", Milano, 1878. Tale attenzione continuò anche nei primi decenni del XX secolo.

Per essere obiettivi, questo interesse epidemico contagiò e si estese in tutto il Nord, ignorando i confini regionali, sino ai tempi odierni.

Nel 1800 nacquero anche numerose Scuole apistiche e furono particolarmente attive. Fra le tante si ricordano: le Cattedre Ambulanti nella provincia di Sondrio, le Scuole magistrali o d'avviamento a Bergamo e Mantova, e sempre a Mantova, le Scuole di Agricoltura e i Corsi di apicoltura.

Sotto il profilo Congressuale, il primato spetta a Milano, dove nel 1871 si tenne il primo Congresso italiano di Apicoltura e in tale contesto, il primo argomento sul quale venne posta l'attenzione dei partecipanti fu l'arnia razionale, elemento che rappresentò un forte segnale di rinnovamento totale nella gestione degli allevamenti, innanzi tut-

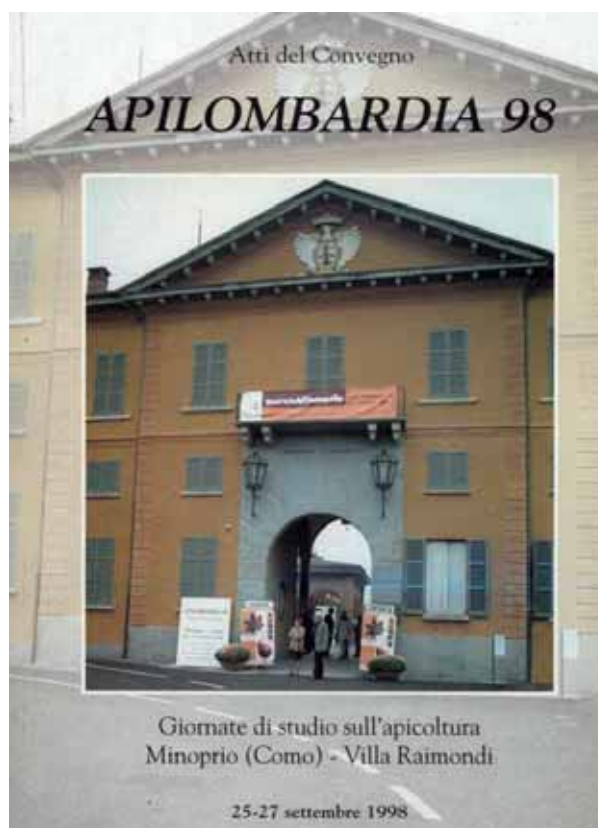
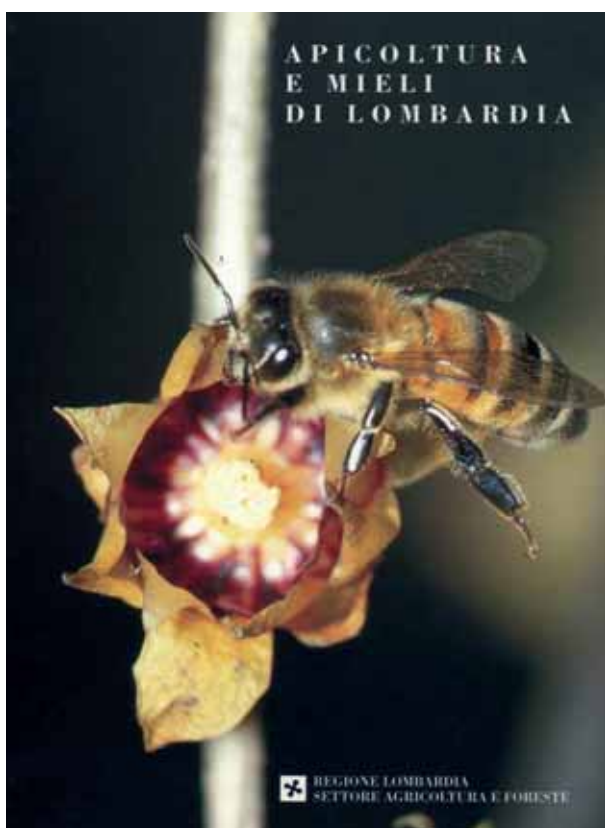


to perché con tale sistema si era in grado di produrre miele senza compiere apicidi. Dagli inizi del '900 e per alcuni decenni, il settore apistico mantenne costante la propria presenza, con una certa tendenza a contrarsi. Ciò in conseguenza di molti fatti: per motivi di patologie negli allevamenti, per questioni sociali, economiche e altre contingenti con il periodo postbellico. Tuttavia là dove l'ambiente è stato in grado di mantenere un abbondante flusso nettario, l'apicoltura è rimasta prosperosa; dove si è diffusa la monocoltura cerealicola, invece, l'allevamento ha subito una severa contrazione. Ci fu una netta ripresa sul finire del '900, con un ritorno di entusiasmo e la costituzione obbligatoria nel 1983 delle Associazioni dei produttori apistici con il conseguente scioglimento dei Consorzi costituiti con Regio Decreto di 60 anni prima. In tale contesto si assistette a un incremento degli allevatori e degli alveari, alla nascita di diverse riviste (L'Ape nostra amica, La città delle api, L'apis), alla redazione di testi e all'ideazione e realizzazione di un Laboratorio Apistico Regionale.

Se la svolta dal punto di vista gestionale, avvenne con l'adozione dell'alveare razionale in sostituzione di quello villico nella metà del 1800, dal punto di vista normativo determinante fu il cambiamento imposto dalla Regione Lombardia nel 1983 con la promulgazione della LR 54. Questa, nella sua semplicità e sinteticità (solo 15 Articoli), conteneva molti elementi innovativi di estrema importanza, che gli allevatori lombardi erano chiamati a rispettare. Il principale di questi obbligava l'uso delle arnie razionali e impediva l'apicidio, in tutte le sue forme.

A supporto di tale Legge e per esaltarne le prerogative, venne istituita la Consulta Apistica Regionale permanente, costituita dai diversi attori del mondo apistico e affini. Si soppressero i Consorzi apistici a vantaggio delle Associazioni dei produttori, sostituendo le prerogative sanitarie dei primi con gli obiettivi commerciali e di incremento delle produzioni, priorità delle seconde. Infine, vennero previsti contributi economici alle Associazioni e agli allevatori per la salvaguardia e il potenziamento dell'apicoltura. Da allora, anche grazie ai contributi finanziari, si è andati sempre di più verso una pro-





fessionalizzazione degli apicoltori, seppure di hobbisti ce ne fossero e ce ne siano anche oggi in grande numero. Indubbiamente anche altri aspetti gestionali, principalmente legati alle parassitosi e alle patologie, hanno rarefatto il consistente esercito dei piccoli allevatori.

L'ambito religioso ha sempre rappresentato un riferimento costante e fondamentale nella promulgazione dell'arte apistica e nella formazione di nuovi Maestri. Sarebbero molti i Sacerdoti e i Monaci da citare e che anche nella nostra regione capillarmente hanno fatto scuola. Volendone ricordare uno per tutti, cito Don Francesco dell'Abbazia Benedettina di Seregno, che seppe per decenni aggregare tramite Corsi, Convegni e lezioni pratiche e teoriche, molte centinaia di apicoltori dell'area briantea.

Non si possono poi ignorare, seppure al di fuori dai confini della nostra regione e in epoche diverse, due sacerdoti che oltre ad essere allevatori, furono Maestri di apicoltura e scienziati, e il cui operato portò benefici anche ai lombardi. A ovest della Lombardia Don Giacomo Angeleri, che pur professando il sacerdozio era Maestro, divulgatore e apicoltore, oltre che Autore di diversi saggi. A est un altro insigne scienziato, Mons. Franco Frilli, Docente di Apidologia e per 9 anni Rettore all'Università di Udine, tuttora in attività, sia nell'ambito apistico, sia in quello ecclesiale.

Proprio da questo sfrigolio che serpeggiava dalle corti alle chiese e dai borghi alle campagne, dopo qualche decennio di oblio, riprese tono l'apicoltura e verso la fine degli anni '80 anche in Lombardia tornò un forte interesse verso le api.

In quegli anni il mondo della ricerca, i singoli apicoltori e quanto restava del mondo associativo, ripresero a interagire e sotto una spinta di mercato, e anche tramite la LR 54, si ebbe un complessivo incremento dell'apicoltura lombarda. Già attorno alla metà degli anni '70, l'illuminata mente della Prof.ssa Graziella Bolchi Serini, Docente presso l'Università degli Studi di Milano, comprese che solo grazie alla ricerca il mondo produttivo avrebbe avuto benefici significativi.

Già si incominciavano a percepire i segnali negativi della globalizzazione con l'arrivo, nei primi anni '80, di *Varroa jacobsoni*, poi *destructor* e il diffondersi di malattie letali. La

mortificazione ambientale causata dall'antropizzazione di vasti territori, lo sviluppo della monosuccessione e l'uso sempre più frequente e improprio degli insetticidi, fecero il resto nel porre al centro dell'azione dello sviluppo apistico, la Ricerca. La forte attenzione della Regione Lombardia permise la nascita del Laboratorio Apistico Regionale (LAR), che interagendo con le Associazioni apistiche e il mondo della Ricerca (Università di Milano e altri Enti di ricerca fra cui l'Istituto Nazionale di Apicoltura (ora CRA-API)), divenne il vero motore di rilancio dell'apicoltura lombarda.

Fu un periodo irripetibile di grande fermento dove apicoltori, ricerca, Enti di Governo e LAR (quale *extension service*) operavano con alacrità e nell'unico intento di dare alle api e alle loro produzioni il ruolo di centralità meritato. La sintesi delle attività di questo Gruppo di lavoro sfociò in alcuni Convegni di "Apilombardia", e nella stampa degli Atti conseguenti, di cui restano gli scritti.

Non sempre tuttavia le azioni apistiche lombarde furono condivise da tutti; fra queste il recente trasferimento del Museo apistico Cappelletti (del cav. Angelo Cappelletti e della sua famiglia) di Bregnano (CO) a Finale Ligure (SV) presso l'Abbazia di Santa Maria rappresenta sicuramente un momento di debolezza e di impoverimento del patrimonio culturale apistico locale, evento determinato da molti fattori anche insuperabili.

Fino ad ora si è detto del passato, del luminoso, anche se alterno, trascorso apistico lombardo; ora è lecito chiedersi quale potrà essere il futuro dell'apicoltura lombarda. Come è ovvio, non posso fare altro che esprimere il mio pensiero sulla base di mie sensazioni e conoscenze, condivise o meno dal lettore!

La premessa ovvia, è che si deve tenere conto dei decenni trascorsi e che i prodotti apistici fanno parte di quel grande paniere governato dalla globalizzazione, all'interno del quale può essere difficoltoso muoversi, e dove le regole sono ben diverse da quelle dei lustri passati.

Il futuro dell'apicoltura lombarda poggia su quattro pilastri:

- l'incremento delle produzioni e la maggiore concentrazione commerciale del prodotto;
- l'ulteriore miglioramento qualitativo dei prodotti;
- la diversificazione produttiva;
- la caratterizzazione, promozione e trasformazione dei prodotti dell'alveare.

Per il miele, la richiesta di mercato è sempre in crescita e la sola popolazione lombarda, ormai superiore ai 9.500.000 di abitanti, è garanzia di un bacino commerciale molto ampio; a questi si devono aggiungere i turisti, sia interni della regione, sia provenienti da altri territori. Tenendo conto che il miele e i prodotti apistici rappresentano uno dei simboli della territorialità, oltre che il prodotto per antonomasia emblema della naturalità, si comprende come nel prossimo futuro le vendite non possano che prevedersi in crescita. A questo si deve aggiungere che in Lombardia si trovano molte industrie agroalimentari e cosmetiche, le quali contemplanò nelle loro produzioni l'uso del miele. Da ciò scaturisce la convinzione che il miele troverà sbocchi commerciali diversificati e certi. Davanti a tale prospettiva è opportuno prevedere una risposta che contempli una maggiore concentrazione del prodotto, almeno per certe fasce commerciali, in modo tale che l'offerta sia adeguata alla domanda e offra ai produttori un adeguato potenziale nella trattativa commerciale. Ciò non deve comunque significare di veder estinguersi il mercato di hobbisti o di piccoli professionisti, soprattutto a livello locale e in particolare nelle zone turistiche.

Il miele lombardo, sia per motivi legati a obblighi di legge, sia per le azioni svolte dalle Associazioni dei produttori, ma anche per volontà degli apicoltori, è (sicuramente) caratterizzato da una buona o eccellente qualità. Tuttavia restano dei margini per migliorare e diversificare ulteriormente le sue produzioni. Al di là di un ulteriore passo verso la qualità del prodotto, la possibilità di estendere la gamma dei mieli monoflora, conse-



guentemente alle modificazioni vegetazionali, permetterebbe di ottenere mieli di ailanto, di rovo o altri vegetali che susciterebbero sicuramente un nuovo interesse nel consumatore. Le stesse produzioni integrative di polline, propoli e pappa reale, pur tenendo conto della maggiore competitività delle medesime con quelle importate, avrebbero una prerogativa unica legata all'origine locale e alla qualità delle lavorazioni. Affinché questo requisito possa trovare un riscontro anche economico, tali produzioni si devono proporre sul mercato in modo chiaro e commercialmente accattivante.

Un passo deve essere fatto anche per applicare nuove tecnologie agroalimentari alle produzioni apistiche. Si pensi, ad esempio, alla trasformazione del miele in idromele, in una formulazione commerciale anidra, succedanea dello zucchero, facilmente gestibile e utilizzabile; ma anche gli altri prodotti, sino ad oggi considerati marginali, se resi più accessibili per l'uso, possono ampliare le loro occasioni d'impiego. Basta volgere lo sguardo verso Est, dove per loro tradizione i popoli balcanici e orientali hanno impiegato polline, pappa reale, propoli per molti usi, sia cosmetici sia farmacologici.

La possibilità di avere una diversificazione produttiva dipende da un'intrinseca vocazione ambientale, mentre la successiva commercializzazione, dalla capacità del settore di rendere appetibili alcuni prodotti che se lasciati tal quale, non susciteranno mai un maggiore interesse rispetto a quello attuale.

Servono poi delle politiche commerciali di salvaguardia e quindi, seppure agendo nei ristretti margini imposti dall'UE, è essenziale che le produzioni territoriali siano fortemente garantite caratterizzandole con marchi che permettano al consumatore di effettuare scelte certe e consapevoli.

A tutto ciò si devono aggiungere diverse azioni dirette nella gestione degli allevamenti quali, fra l'altro, un potenziamento delle popolazioni locali di api regine, una più incisiva gestione territoriale delle avversità, programmi di risanamento dalle malattie e parassitosi più gravi su ampie zone.

Infine non si deve scordare che il miglioramento qualitativo dei prodotti apistici e la loro promozione passa obbligatoriamente attraverso una decisa inversione nella gestione ambientale urbana e agricola a favore di una migliore qualità della vita e quindi del territorio. Da qui ci sono tutte le motivazioni per identificare nell'ape il simbolo della salute del territorio. Tutto ciò a vantaggio non solo delle api, ma anche dell'uomo.

Queste ipotesi di lavoro oggi possono apparire utopiche, ma a breve diverranno scelte obbligate, nella necessità che anche il settore apistico resti competitivo, accattivante nei confronti del consumatore, propositivo verso un mercato sempre più alla ricerca di nuove soluzioni e tipologie commerciali.

Per concludere, il settore apistico, nella componente dei produttori, deve tornare a considerare la Ricerca *sensu lato*, come un elemento trainante per la crescita. Non la si deve relegare alla soluzione dei problemi sanitari, di caratterizzazione, di certificazione (di appartenenza razziale, di qualità dei mieli, ecc.), ma è giunto il momento di passare all'agroalimentare, alla valorizzazione delle proprietà salutari, all'impiego nella cosmesi, di collegare l'apicoltura in modo inscindibile con la qualità del territorio.

In tale modo si incrementerebbe il prezzo del prodotto, tramite il valore aggiunto, l'uso, ecc.

La ricerca, che lo si voglia o no, è la cornice che ha sempre permesso la crescita di un settore, ma ci vuole lungimiranza e per averla si deve a volte abiurare a interessi meramente soggettivi, abbandonando vecchie consuetudini e pratiche, alle quali si è abituati.

Con queste considerazioni concludo la premessa alla parte sperimentale di STRANOVA, nella speranza che questo appello e queste idee, vengano accolte dai produttori e da chi ha la facoltà di indirizzare a livello regionale le scelte strategiche nell'ambito apistico.

# Varroosi e nosemosi

## Stato dell'arte

Antonio Nanetti

**L**e colonie di api possono essere colpite da agenti patogeni numerosi e appartenenti a raggruppamenti molto diversi tra loro. Miele, polline, cera, le stesse api adulte e la covata nei suoi vari stadi sono risorse abbondanti e diversificate, potenziali substrati per la vita di molti organismi. Salendo un virtuale albero di complessità biologica, virus, batteri, protisti, funghi unicellulari e pluricellulari, artropodi fra cui altri insetti e acari, uccelli e mammiferi hanno acquisito nel tempo la capacità di approfittare di questa insolita ricchezza nutritiva.

Questi organismi e microrganismi danneggiano le colonie in modo più o meno grave in rapporto alle caratteristiche biologiche peculiari a ciascuno di essi. *Varroa destructor* e *Nosema ceranae*, rispettivamente un acaro e un fungo unicellulare provenienti dall'Asia, sono fra gli agenti patogeni più importanti per le conseguenze delle loro infestazioni, la capacità di diffondersi e le difficoltà del controllo. Fra le cause maggiori di mortalità delle colonie, gli apicoltori devono conoscerli sempre meglio e affidarsi a metodi di controllo elaborati secondo metodi scientifici rigorosi.

### Varroosi (*Varroa destructor*)

Da decenni gli apicoltori devono confrontarsi con la varroa, una delle minacce più gravi al patrimonio e alle produzioni apistiche di gran parte del mondo. In sostanziale equilibrio con l'ospite originario, *Apis cerana*, l'acaro ha assunto una virulenza notevole in *Apis mellifera*, dopo un passaggio di specie verosimilmente mediato da attività umane.

Si suole suddividere la patologia apistica in malattie della covata e delle api adulte. La varroosi è fra i pochi punti di contatto diretto fra le due categorie, essendo il ciclo biologico del parassita svolto in parte sulle api adulte (fase foretica) e in parte nella covata (fase riproduttiva). In dettaglio, ciò vale solo per le femmine feconde poiché i maschi e le forme giovanili sono incapaci di vivere fra le api adulte.

Normalmente le api giovani veicolano le varroe nella covata durante l'accudimento delle larve, la cui recettività all'infestazione è limitata al quinto stadio, cioè al giorno prima dell'opercolatura. Esistono tuttavia differenze fra covata maschile e femminile. Infatti, l'infestazione della cella è guidata da semiochimici, la cui produzione intensa e prolungata rende le larve da fuco molto più attrattive. Il loro maggior periodo di opercolatura, inoltre, favorisce la fecondità delle varroe madri (circa 2,5 figlie adulte per varroa e per cella invece di 1,4). Sull'ospite originario le varroe possono riprodursi soltanto nella covata maschile e, pertanto, la preferenza per questa nell'ape mellifera va interpretata come residuo di quell'adattamento primitivo. Nelle api cerane, quindi, la riproduzione della varroa è affidata alla covata da fuco mentre in quelle mellifere, per la netta preponderanza, principalmente a quella di operaia.

Entrata nella cella la varroa si rifugia sotto la larva e si immerge nell'alimento larvale; in questa fase l'acaro respira grazie ai peritremiti, due tubuli estroflettibili normalmente ripiegati ai due lati della zona ventrale. Dopo l'opercolatura il parassita si alimenta di

emolinfa larvale ottenuta attraverso la perforazione del sottile tegumento. Un intenso metabolismo favorisce la maturazione delle uova, la prima delle quali viene deposta a circa 70 ore dall'opercolatura; le altre seguono in serie, a intervalli di circa 30 ore. L'unico figlio maschio proviene dal primo uovo ed è destinato ad accoppiarsi con le femmine divenute via via adulte e sessualmente mature. Il ciclo di sviluppo dura circa 6 giorni e comprende gli stadi giovanili intermedi di larva, protoninfa e deuteroninfa. Tuttavia il periodo di opercolatura limita lo sviluppo delle forme giovanili. Infatti, allo sfarfallamento dell'ape alcuni individui sono ancora immaturi e inadatti alla vita fuori dalla cella; questi, come il maschio, muoiono in breve tempo. Il ciclo biologico termina con una nuova fase foretica, di durata molto variabile, in cui i parassiti si disperdono fra le api. In questo periodo le varroe tendono a rifugiarsi fra gli scleriti addominali degli ospiti, attraverso le cui membrane di interconnessione possono raggiungere l'emolinfa, in attesa di essere nuovamente veicolati in una cella con larva matura.



**Foto I.1. Pupa di ape con varroe.**

Nel periodo di presenza della covata le popolazioni di varroa tendono a evolvere in modo esponenziale. Gli incrementi possono divenire incontrollabili già prima che l'apicoltore ne realizzi l'importanza. La reinfestazione, ossia l'importazione di acari da altre colonie, può aggravare la situazione. I danni della parassitosi sono solo in parte dovuti all'azione diretta della varroa. La comparsa di api deformi e disvitali, la mortalità di covata indipendentemente dallo stadio di sviluppo e l'esito fatale per la colonia sono soprattutto legati a virosi secondarie all'infestazione stessa.

Mancano metodi di eradicazione della varroa, per cui il controllo va affidato a interventi profilattici, da eseguire con rigore e tempestività e combinandoli in una efficace strategia annuale. In molti casi questa si basa su un trattamento estivo e uno autunno-invernale; interventi eventualmente eseguiti in altre fasi dell'anno apistico vanno considerati complementari e non sostitutivi.

Nel corso del tempo sono stati elaborati molti metodi di controllo, più o meno efficaci, invasivi, sicuri per operatore e prodotti dell'alveare, economici, semplici e così via. Impossibile addentrarsi in un argomento tanto complesso. Acaricidi di largo uso sono spesso divenuti inservibili per la riduzione di efficacia dovuta alla farmacoresistenza. L'apicoltura è fra i pochi allevamenti in cui l'approccio "biologico" si avvale di formulati acaricidi assai più efficaci, tollerati ed economici di quelli basati su sostanze cosiddette "di sintesi". Fra i primi spiccano per importanza Apilife Var®, Apiguard® e Thymovar, contenenti timolo incluso in vari mezzi di somministrazione, e Api-Bio-xal®, a base di acido ossalico.

Il timolo è una sostanza volatile e, come tale, la sua diffusione nell'alveare richiede una temperatura relativamente alta. Non è possibile dare indicazioni precise (altri fattori importanti entrano in gioco: eccipienti, temperatura interna, umidità, condizioni tecniche e così via) ma si tratta di prodotti da utilizzare in periodi caldi. Infatti, il rilascio di principio attivo può essere insufficiente nel periodo compreso fra autunno e primavera. Come indicato dai rispettivi produttori, le somministrazioni devono essere ripetute per coprire più cicli di opercolatura della covata, colpendo gli acari divenuti via via foretici con lo sfarfallamento delle api adulte.

Al contrario il principio attivo di Api-Bioxal® non è volatile e non ha particolari limitazioni d'impiego. Tuttavia la rapida cinetica e l'incapacità di superare l'opercolo rende la sostanza adatta al trattamento di varroe foretiche ma non di quelle riproduttive. In effetti, per molti anni questo composto è stato utilizzato esclusivamente nel trattamento invernale, raggiungendo un'efficacia di circa 95%.

Il metodo di somministrazione più vantaggioso è quello cosiddetto “per gocciolamento”, con cui si combinano efficacia acaricida, tollerabilità per le api, semplicità d'esecuzione e sicurezza per l'apicoltore. Cinque millilitri di soluzione per favo occupato dalle api vanno distribuiti con una siringa sopra ai favi, perpendicolarmente alla loro direzione. Molto meno opportuno è il metodo “della sublimazione”, basato sulla capacità dell'acido ossalico di passare direttamente dalla fase cristallina a quella gassosa dopo opportuno riscaldamento. È assai più complesso, espone l'apicoltore al rischio di contaminazione ed è potenzialmente meno efficace. Infatti, il principio attivo può degradare alle alte temperature, con conseguente diminuzione di efficacia del trattamento in funzione del tipo di riscaldamento applicato.

Negli ultimi anni si è diffuso l'impiego di Api-Bioxal® nel trattamento estivo della varroa. I parassiti vengono forzati alla fase foretica grazie a un blocco artificiale della deposizione ottenuto con il confinamento della regina per 25 giorni, tempo sufficiente allo sfarfallamento di tutta la covata. Il successivo trattamento con Api Bioxal® viene eseguito alla stregua di quello invernale e sviluppa un'efficacia acaricida generalmente superiore al 95%.

### Nosemosi (*Nosema ceranae*)

Molti apicoltori hanno esperienza diretta della nosemosi e la conoscono per l'abbondante diarrea con la quale le api colpite imbrattano l'interno e l'esterno degli alveari e per il frequente picco di gravità primaverile. Questa forma, si potrebbe dire tradizionale, è provocata da *Nosema apis*, un fungo unicellulare, ed è in fase di generale regressione anche in zone un tempo assai colpite, fra cui alcune dell'Italia settentrionale.

La nuova situazione è molto diversa. Da circa un decennio in Europa è stata accertata l'esistenza una nuova forma di nosemosi. Causata da un microrganismo in parte simile al precedente, *Nosema ceranae*, questa affezione è molto diversa e subdola in quanto priva di chiari segnali distintivi. Le due forme hanno così poco in comune da meritare nomi diversi: nosemosi di tipo A e di tipo C, dai nomi di specie dei due agenti causali.

*N. ceranae* è stato individuato per la prima volta nel 1994 in Asia, in *Apis cerana* da cui ha preso il nome, ma infezioni sperimentali condotte in laboratorio hanno presto dimostrato la capacità del fungo di colpire anche gli adulti di *A. mellifera*. In seguito il patogeno è stato rinvenuto in colonie di api mellifere allevate in quel continente. Il primo rinvenimento europeo risale al 2005 ed è avvenuto in Spagna.

Questo microrganismo è fra i patogeni di maggior prevalenza nel mondo; in zone a clima caldo è stato spesso associato a fenomeni di spopolamento e di collasso degli alveari. Motivi sconosciuti ne rendono controversa l'importanza in ambienti freddi. In effetti, in paesi mediterranei e nordici i ricercatori giungono spesso a conclusioni contrastanti, essendo esso infrequente e poco grave negli ambienti del centro e del nord Europa.

La disseminazione di *N. ceranae* avviene attraverso spore, le forme di resistenza agli agenti esterni. I meccanismi attraverso cui si verifica l'azione patogena non sono del tutto chiari ma, all'opposto di quanto avviene in *N. apis*, l'assenza di diarrea e di altre emissioni evidenti lascia supporre meccanismi d'infezione slegate dall'attività igienica.

A livello individuale il contagio avviene con l'ingestione delle spore, anche se in linea di principio non si possono escludere inoculi attraverso altre vie. Anche il ciclo biologico presenta lati oscuri. Organo elettivo è il ventricolo o mesointestino, mentre il coinvolgimento



di altri organi è stato ipotizzato ma mai dimostrato in concreto. Nell'ape singola l'infezione evolve in modo molto rapido. Segnali ancora sconosciuti provocano l'emissione di un lungo tubulo polare il quale, introdotto in una cellula epiteliale, permette la penetrazione dell'elemento vegetativo. Un'intensa moltiplicazione provoca l'invasione della cellula e la rapida formazione di numerose spore le quali, rotta la membrana, si riversano nel lume dove infettano altre cellule o sono emesse all'esterno. Attraverso l'epitelio ventricolare, danneggiato al di là delle possibilità di autorigenerazione, può avvenire l'introduzione di particelle virali responsabili di altre affezioni.

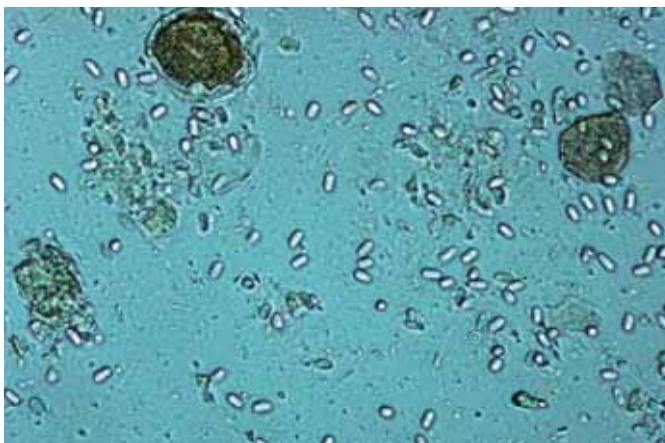


Foto 1.2. *Nosema ceranae*.

Nella colonia la malattia si presenta in genere in modo equivoco e poco riconoscibile a un esame esterno. Una diagnosi può essere fatta soltanto al microscopio ottico o, se è necessario distinguere fra le due specie di nosema, attraverso tecniche di biologia molecolare.

Il decorso della nosemosi di tipo C può essere molto lungo: dal momento dell'infezione all'esito finale possono trascorrere molti mesi o anche oltre un anno.

Le api colpite muoiono anzitempo lontano dall'alveare, secondo una dinamica non conosciuta nei dettagli e senza lasciare tracce davanti all'alveare. Il graduale impoverimento di api vecchie causa squilibri nei rapporti interni alla colonia: la superficie di covata è ricoperta dalle api in modo incompleto e la quantità di api giovani tende a prevalere. Queste ultime sono costrette ad assumere compiti esterni e fisiologicamente poco congeniali, mentre la colonia subisce uno spopolamento lento e aspecifico e la produttività diminuisce.

La malattia è in genere poco conosciuta. L'apicoltore può rendersi conto delle anomalie ma imputarle ad avversità ambientali, flusso nettario scadente, intossicazioni con insetticidi e così via. Quando l'ovideposizione diviene insufficiente a sopperire alla perdita di api la colonia collassa, di solito in presenza di scorte di miele, residui di covata e poche o nessuna ape neosfarfallata.

L'assenza della diarrea tipica della nosemosi di tipo A costringe a immaginare meccanismi di trasmissione peculiari alla forma C. Anche questo aspetto è chiarito in modo incompleto ma, forse, la trofallassi gioca un ruolo chiave, perlomeno nella trasmissione fra gli individui della stessa colonia. Vari fomite possono contribuire a diffondere le spore di *N. ceranae* nell'ambiente e fra le colonie: il polline raccolto dalle api, i favi, il materiale apistico, le borre rigurgitate da uccelli insettivori come i gruccioni. Anche apoidei selvatici come i bombi possono veicolare spore, rappresentando una fonte ambientale permanente di possibile contagio.

Il controllo è fra gli aspetti più problematici della malattia. Poiché mancano farmaci specifici, la lotta va condotta utilizzando misure igieniche generiche e accorgimenti tecnici basati su esperienze condotte su basi scientifiche. Fra questi, uno studio recente ha dimostrato una riduzione significativa della proporzione di api infette in campioni di api esterne e interne prelevati da colonie in cui la regina era stata rimossa e sostituita naturalmente. Prove di campo hanno inoltre dimostrato una riduzione nella prevalenza di api infette in colonie trattate in autunno per due volte con soluzioni di acido ossalico a debole concentrazione. Infine, prove di laboratorio e di campo hanno evidenziato significative riduzioni del numero di spore e della proporzione di individui colpiti in seguito alla somministrazione alle api di Api-Herb®, un integratore alimentare a base vegetale.

# Controllo della varroosi

## 2.1. Miglioramento dei sistemi esistenti di monitoraggio dell'infestazione da varroa: valutazione comparativa dell'affidabilità di metodiche diverse

Nikolay Dobrynin, Michele Mortarino, Mario Colombo,  
Francesca Romana Eördegh

### Premessa

**N**ella moderna gestione delle famiglie di api, è fondamentale eseguire la valutazione periodica dell'infestazione da *Varroa destructor*, al fine sia di monitorare la presenza e l'andamento della parassitosi nell'apiario, sia di orientare gli interventi di contrasto al parassita in presenza di soglie di infestazione potenzialmente pericolose e di misurarne l'efficacia. La verifica del grado di infestazione nelle famiglie d'api viene attualmente effettuata tramite diverse tecniche di monitoraggio miranti a quantificare il numero di varroe presenti, ciascuna delle quali presenta i rispettivi vantaggi e limiti in dipendenza dal tipo di approccio considerato. Ad esempio, si può effettuare la valutazione della mortalità naturale degli acari. In questo caso, il campionamento consiste nell'utilizzo di arnie con fondo cosiddetto antivarroa dotate di cassetto rimuovibile nella parte sottostante, cosparso con sostanze adesive quali vaselina o con l'ausilio di un foglio adesivo, atto a invischiare le varroe che si sono staccate dal corpo delle api per morte naturale o indebolimento, per consentirne il conteggio. Gli acari caduti nel cassetto del fondo antivarroa e trattenuti dal foglio adesivo vengono contati periodicamente nell'arco di un congruo periodo di tempo (da 3 a 7 giorni o anche più), calcolando quindi la media di caduta giornaliera (figura 2.1 e figura 2.2). La correlazione tra la mortalità naturale degli acari e il numero totale di varroe presenti nelle colonie è stato oggetto di studio da parte diversi Ricercatori ma con conclusioni diverse: alcuni Autori hanno trovato un buon rapporto lineare, a differenza di altri, e più in generale questo tipo di stima è ritenuto affidabile solo in presenza di un'adeguata quantità di covata e se l'infestazione è nelle fasi iniziali. Questa tecnica è comunque considerata una pratica facilmente applicabile, ed è adottata ormai da un largo numero di apicoltori.

Il metodo di valutazione con fondo anti-varroa e cassetto diagnostico può essere abbinato al trattamento con i comuni acaricidi utilizzati nella lotta alla varroa. Durante il periodo di applicazione di tali formulati, vengono contate le varroe uccise dal trattamento in atto. Questo metodo è utile per valutare l'entità di abbattimento degli acari da parte dei formulati utilizzati.

Gli altri metodi impiegati per la valutazione della parassitosi, prevedono ad esempio l'esame della covata opercolata tramite disopercolatura di un numero adeguato di celle e conta delle varroe rinvenute; l'esame delle varroe rinvenibili in un adeguato campione di api adulte raccolte sui favi centrali della famiglia, previa uccisione delle stesse; oppure sulle api vive tramite l'uso di polveri inerti che facilitino il distacco delle



**Figura 2.1. Posizionamento del cassetto diagnostico dotato di foglio adesivo per la valutazione della mortalità naturale della varroa.**



**Figura 2.2. Conteggio delle varroe cadute per mortalità naturale sul foglio adesivo.**

varroe. Questi metodi sono più o meno indaginosi e al pari del metodo di valutazione della mortalità naturale, presentano i rispettivi limiti e vantaggi. Inoltre, la frequenza con cui si può verificare il fenomeno della reinfestazione può inficiare il valore predittivo di qualsiasi metodologia di valutazione.

Nel corso del Progetto è stato realizzato un confronto in campo di alcuni fra questi sistemi di monitoraggio dell'infestazione, al fine di confrontarne il grado di corrispondenza e nella prospettiva di contribuire allo sviluppo di una metodica affidabile, e possibilmente di facile e rapida esecuzione, da parte degli apicoltori. La prova è stata condotta nel corso di due anni, al fine di ridurre l'incidenza di fenomeni scarsamente controllabili quali la reinfestazione delle colonie che possono influenzare il risultato di queste valutazioni. I risultati sono stati confrontati e interpretati riguardo al rispettivo valore predittivo, in funzione dell'andamento nel tempo dell'infestazione.

### Attività sperimentale

Al fine di ridurre l'errore potenziale dovuto a nuove infestazioni di acari tra le colonie, sia dall'esterno che dall'interno dell'apiario, la prova è stata condotta in apiari con minimo 10 colonie, relativamente isolati e in apparente assenza di colonie selvatiche nei pressi dell'apiario stesso; gli alveari sono stati posizionati in modo tale da ridurre il pericolo di deriva delle bottinatrici; è stata evitata la presenza di colonie deboli che potessero aumentare il pericolo di saccheggio. Le colonie erano alloggiate nello stesso tipo di arnia e dotate di regina, inoltre erano caratterizzate da forza ed estensione di covata sostanzialmente omogenee ed erano prive di sintomatologie riconducibili a parassitosi o patologie diverse dalla varroosi. Inoltre, sono state messi in atto accorgimenti per evitare sia la predazione di varroe morte da parte di formiche o altro, sia la presenza di impedimenti meccanici per assicurare che gli acari morti cadessero direttamente sul fondo antivarroa.

Le prove comparative hanno riguardato diversi metodi di valutazione dell'infestazione:

- conteggio del numero di femmine di varroa per 100 api adulte;
- percentuale di celle con larve di operaie o fuchi affetti da acari;
- mortalità naturale della varroa.

I relativi test sono stati condotti in simultanea nelle medesime famiglie di api in tre diversi periodi della stagione produttiva: a inizio stagione, (mese di aprile), a metà stagione (mese di luglio) e a fine stagione (mese di settembre). In dettaglio, sono stato messi a confronto i metodi di seguito descritti.

**Metodo 1. Valutazione sulle api adulte vive mediante osservazione in dispositivo diagnostico**

Circa 100 api adulte sono state raccolte dai favi centrali utilizzando un aspiratore e sono state posizionate in un dispositivo diagnostico. Tale dispositivo è costituito da una scatola 150×150 mm di plexiglass con un'altezza di 4 mm e coperchio a cerniera, nella quale una volta chiusa le api rimangono pressate e quindi ferme, così da poter essere contate e ispezionate conteggiando anche il numero di acari presenti (figura 2.3). Il numero di varroe rilevate è stato quindi diviso per il numero di api nella scatola e moltiplicato per 100 per ottenere il numero di acari per 100 api. Dopo il conteggio le api sono state rilasciate nella loro colonia. Questa procedura è stata replicata 4 volte per calcolare un valore medio affidabile.

**Metodo 2. Valutazione sulla covata viva**

La diagnosi in vivo sulla covata è stata effettuata considerando una superficie di 50 × 50 mm del favo, con covata femminile e maschile (quando presente) non ancora opercolata. Questa superficie, contenente approssimativamente 100 cellette di operaia o 80 di fuco è stata osservata in trasparenza ponendola verso una fonte di luce (figura 2.4). In questo modo è stato eseguito il conteggio degli acari e calcolata la media per 100 celle. La procedura è stata replicata 4 volte per calcolare un valore medio affidabile.

**Metodo 3. Valutazione sulle api adulte tramite l'uccisione delle stesse**

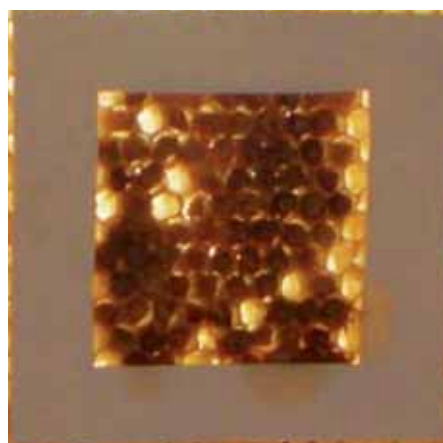
Approssimativamente 100 api operaie di una colonia sono state catturate dai favi centrali e scrollate su di un vassoio riempito con una soluzione di acqua calda (70-90°C) e soda. Previa vigorosa agitazione di almeno 3-5 minuti, si è provocato il distacco degli acari così da permetterne il conteggio e la valutazione della presenza su 100 api. La procedura è stata replicata 4 volte per calcolare un valore medio affidabile (figura 2.5).

**Metodo 4. Valutazione sulla covata tramite la disopercolatura della stessa**

Per poter individuare gli acari nella covata, su di un favo centrale, si è proceduto alla disopercolatura di 100 cellette con presenza di covata femminile o maschile, considerando sia la parte superiore del favo, sia la parte centrale del terzo più vicino all'ingresso dell'alveare. Le stesse cellette e le larve o pupe presenti, prelevate con una pinzetta, sono state esaminate per verificare la presenza di varroa e calcolare la percentuale di infestazione (figura 2.6). La procedura è stata replicata 4 volte per calcolare un valore medio affidabile.



**Figura 2.3. Dispositivo per il conteggio delle varroe sulle api vive immobilizzate.**

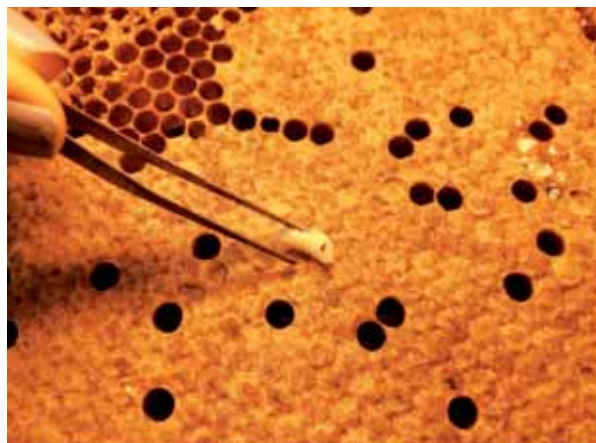


**Figura 2.4. Valutazione in vivo della infestazione della covata.**





**Figura 2.5. Valutazione della infestazione delle api adulte tramite uccisione delle stesse.**



**Figura 2.6. Valutazione della presenza di varroa nella covata opercolata tramite disopercolatura della stessa.**

#### **Metodo 5. Valutazione della mortalità naturale della varroa**

Sul fondo degli alveari sono stati posizionati fogli adesivi protetti da una rete a maglie di 3x4 mm, per evitare che gli acari caduti e non incollati potessero tornare sui favi. La distanza tra il foglio e la rete era di 1 cm, e la rete stessa è stata periodicamente controllata in modo che non venisse ostruita dalla propoli. Il numero di acari caduti sul foglio in ogni alveare interessato dalla prova è stato conteggiato dopo 7 giorni dall'aver provveduto alla pulizia del fondo e al posizionamento di un nuovo foglio adesivo, e negli stessi giorni in cui venivano testati gli altri 4 metodi. Il conteggio è stato effettuato sull'intero foglio adesivo. Il conteggio degli acari è stato effettuato a 10 ingrandimenti, con l'ausilio una lente. Si è proceduto quindi al calcolo del valore medio degli acari caduti in 24 ore. I dati di mortalità naturale degli acari sono quindi stati confrontati con i conteggi di varroa ottenuti nello stesso giorno con i metodi indicati precedentemente, allo scopo di correlare la mortalità naturale con il numero totale di acari realmente presenti nelle colonie (livello effettivo di infestazione).

#### **Metodo 6. Valutazione sulle api adulte vive mediante distacco delle varroe con zucchero a velo**

Dopo la conta effettuata con il metodo 1, le api sono state trasferite in un contenitore di plastica con un coperchio recante fori del diametro di 3 mm, atti a lasciar passare le varroe ma non le api. È stato quindi aggiunto un volume di zucchero a velo pari a due cucchiaini da tavola e il tutto è stato sottoposto ad agitazione manuale per due minuti. Quindi il contenitore è stato capovolto e scosso per permettere a più varroe possibile di attraversare i fori del coperchio ed essere raccolte su un sottostante vassoio per essere contate. Al termine del conteggio le api sono state restituite alla famiglia di provenienza.

### **Risultati primo anno**

Nel corso del primo anno della prova sono stati messi in atto e confrontati i metodi da 1 a 5. Tutti i dati sono stati processati tramite analisi statistiche, applicando *t*-di Student, analisi della correlazione e analisi della regressione.

#### **Confronto di significatività delle medie**

Il confronto di significatività del tasso medio di infestazione da varroa (%) nelle colonie sperimentali, ottenuto con metodi da 1 a 4, utilizzando la *t* di Student è ripor-

tato in tabella 2.1. Come si può vedere nella tabella, il tasso medio di infestazione (%) delle colonie ottenuto col metodo 1 in tutte le sperimentazioni, è stato pari a 3,0 e, con il metodo 3 è stato pari a 3,7. La differenza tra il valore medio ottenuto con il metodo 1 e il metodo 3 ha avuto una significatività pari a  $P < 0,05$  ( $t$  di Student). Il tasso medio di infestazione (%) delle colonie ottenuto col metodo 2 in tutte le misurazioni è stato pari a 3,2 e con il metodo 4 è stato pari a 4,1. La differenza tra il valore medio ottenuto con il metodo 2 e il metodo 4 ha mostrato una significatività pari a  $P < 0,01$  ( $t$  di Student).

### Correlazione e regressione

Per determinare il rapporto di dipendenza tra la mortalità naturale della varroa e il tasso di infestazione delle api adulte, sono stati calcolati i coefficienti di correlazione, di regressione e l'equazione di regressione.

I risultati delle analisi di correlazione e regressione dei dati di mortalità naturale della varroa e il tasso di infestazione delle api adulte nelle colonie sperimentali sono riportati nella tabella 2.2.

In base ai valori riportati in tabella 2.2, la correlazione tra il tasso di infestazione delle api adulte e la mortalità naturale dell'acaro è da considerarsi forte, come anche dimostrato dal valore del coefficiente di correlazione  $r = 0,74$  (significatività di  $P < 0,01$  calcolata con la  $t$  di Student). L'analisi di regressione mostra che il coefficiente di regressione ( $b_{yx}$ ) della mortalità naturale dell'acaro rispetto al tasso di infestazione delle api adulte è pari a 1,15. Il coefficiente di regressione mostra come quantitativamente, l'attributo Y (funzione) cambia in media al variare dell'attributo X (argomento). Di conseguenza, un aumento del tasso di infestazione delle api adulte dell'1%, corrisponde a un aumento di 1,15 acari/24 h. L'equazione della retta di regressione relativa alla mortalità naturale dell'acaro rispetto all'infestazione delle api adulte è espressa dalla formula  $Y = 1,15 X - 0,96$ .

### Calcolo del tasso di caduta e numero totale di acari

Il confronto tra la media stagionale della mortalità naturale di varroa e la media stagionale di infestazione riscontrata sulle api adulte, ci permette di calcolare il tasso di caduta e la quantità di acari presenti nella colonia. Considerando che la media delle colonie sottoposte alla valutazione si è sviluppata su 1,9 telaini all'inizio del-

**Tabella 2.1. Confronto di significatività del tasso medio di infestazione da varroa (%) nelle colonie sperimentali, ottenuto con i diversi metodi ( $t$  di Student).**

Significatività del tasso medio di infestazione da varroa (%) nelle colonie sperimentali, ottenuto con i diversi metodi ( $t$ di Student)				
Metodo 1	Metodo 3	Metodo 2	Metodo 4	Valore della $t$ di Student a 11 gradi di libertà
3,0	3,7	3,2	4,1	
$t = 3,07$		$t = 3,55$		$t_{05} = 2,20$
Significatività $P < 0,05$		Significatività $P < 0,01$		$t_{01} = 3,11$

**Tabella 2.2. Rapporto di dipendenza tra la mortalità naturale della varroa (n/24 ore) e il tasso di infestazione delle api adulte (%) nelle colonie sperimentali.**

Valore del coefficiente di correlazione, regressione e l'equazione di regressione della mortalità naturale della varroa (metodo 5) rispetto al tasso medio di infestazione delle api adulte (%) e loro significatività calcolata con la <i>t</i> di Student		
Coefficiente di correlazione	Coefficiente di regressione (n. acari/24h)	Valore della <i>t</i> di Student a 10 gradi di libertà
$r = 0,74$	$b_{yx} = 1,15$	
$t_r = 3,52$	$t_b = 3,58$	$t_{05} = 2,23$
Significatività $P < 0,01$	Significatività $P < 0,01$	$t_{01} = 3,17$
Equazione di regressione	$Y = 1,15 X - 0,96$	

la stagione, 12 a metà stagione (quando è stato massimo il flusso nettario) e 7,2 alla fine della stagione, la media stagionale è stata di circa 7,5 telaini. Si presume che ogni telaino contenga circa 3000 individui. Di conseguenza la “forza” stagionale delle colonie sperimentali si è assestata su circa 22.500 api. Come riportato in tabella 1, il tasso medio di infestazione delle api adulte calcolato con il metodo più preciso (metodo n. 3) è stato pari a 3,7%. Questo significa che su 22.500 api, 824 sono risultate infestate. Se si confrontano questi dati con la media stagionale di caduta delle varroe nelle 24 ore che è pari a 5,2 acari, la mortalità naturale di un acaro nelle 24 ore corrisponde alla presenza di circa 160 acari per colonia.

## Risultati secondo anno

Nel corso del secondo anno della prova sono stati messi in atto e confrontati il metodo 1 e il metodo 6, è stato quindi valutato anche il monitoraggio della varroa sulle api adulte vive mediante utilizzo di zucchero a velo confrontandolo con il monitoraggio della varroa mediante osservazione delle api vive nell'apposito dispositivo diagnostico. I dati raccolti sono stati processati tramite analisi statistica. Il confronto di significatività del tasso medio di infestazione da varroa (%) nelle colonie sperimentali, ottenuto con i due diversi metodi, utilizzando la *t* di Student è riportato in tabella 2.3. Come si può vedere nella tabella, il tasso medio di infestazione (%) delle colonie ottenuto col metodo 1 in tutti i momenti stagionali, è stato pari a 4,29 e, con il metodo 6 è stato pari a 7,24. Ne risulta che il metodo 6 è 1,68 volte più preciso del metodo 1. La differenza tra il valore medio ottenuto con il metodo 1 e il metodo 6 ha avuto una significatività pari a  $P < 0,001$  (*t* di Student).

## Conclusioni

Sulla base dell'esito della prova, si possono innanzi tutto formulare alcune considerazioni circa i vantaggi e gli svantaggi dei metodi che sono stati confrontati.

**Tabella 2.3. Confronto di significatività del tasso medio di infestazione da varroa (%) nelle colonie sperimentali, ottenuto con due diversi metodi (t di Student).**

Significatività del tasso medio di infestazione da varroa (%) nelle colonie sperimentali, ottenuto con due diversi metodi ( <i>t</i> di Student)		
Metodo 1	Metodo 6	Valore della <i>t</i> di Student a 7 gradi di libertà
4,29	7,24	
<i>t</i> = 6,64		<i>t</i> <sub>001</sub> = 5,41
Significatività P<0,001		

#### **Metodo 1. Valutazione sulle api adulte vive mediante osservazione in dispositivo diagnostico**

Per quanto riguarda i vantaggi, questo tipo di diagnosi è effettuata sulle api adulte per cui può essere condotta in ogni momento della stagione. Le api immobilizzate con il dispositivo diagnostico sono in grado di muovere le zampe, senza però allontanarsi, e ciò contribuisce a rendere accurato il conteggio sia delle api che delle varroe e a ottenere così una più precisa valutazione del grado di infestazione. Al termine del conteggio le api possono tornare nella colonia. Per quanto riguarda gli svantaggi, l'individuazione della presenza della varroa è complicata dal fatto che gli acari, rifuggendo la luce diurna, cercano di celarsi tra i segmenti del corpo dell'ape. Inoltre la varroa ha una colorazione giallognola che non sempre risulta facilmente distinguibile sull'ape.

#### **Metodo 2. Valutazione sulla covata viva**

Per quanto riguarda i vantaggi, questo metodo non richiede speciali dispositivi. La diagnosi è effettuata prima che la covata venga opercolata e questo fa sì che le api rimangano vive. Per quanto riguarda gli svantaggi, la diagnosi è effettuata sulla covata e quindi non può essere condotta in ogni momento della stagione. Il metodo richiede un acuto e allenato occhio da parte dell'esaminatore, e comunque non risulta eccessivamente accurato. Quindi questo metodo può essere utilizzato per la valutazione del tasso di infestazione solo dopo una accurata valutazione di questi limiti.

#### **Metodo 3. Valutazione sulle api adulte tramite l'uccisione delle stesse**

Per quanto riguarda i vantaggi, la diagnosi è condotta sulle api adulte per cui può essere condotta in ogni momento della stagione. Il metodo non richiede né trattamenti chimici né speciali dispositivi e può essere effettuato in condizioni di campo, con qualsiasi tipo di vassoio; a questo proposito, è comunque consigliabile operare in contenitori di vetro in modo da poter utilizzare acqua bollente che uccide le api più velocemente e fa in modo che gli acari cadano sul fondo istantaneamente. Inoltre, questo metodo risulta il più preciso sulle api adulte. Il maggior svantaggio del metodo è quello di essere distruttivo perché comporta la morte delle api catturate.

#### **Metodo 4. Valutazione sulla covata tramite la disopercolatura della stessa**

Per quanto riguarda i vantaggi, questo metodo risulta il più preciso per la diagnosi sulla covata, perché permette un conteggio diretto degli acari. Tutte le varroe sono confinate nelle celle, cosa che contribuisce a un più accurato conteggio e quindi una più precisa valutazione del grado di infestazione. Inoltre, questo metodo non richiede speciali dispositivi e può essere effettuato in condizioni di campo. Il principale svantaggio del metodo è legato al fatto che è un metodo distruttivo perché comporta la morte delle api in via di sviluppo. Inoltre, questo metodo risulta laborioso e comporta l'utilizzo di manodopera specializzata. Infine, la diagnosi è effettuata sulla covata e quindi non può essere condotta in ogni momento della stagione.



### Metodo 5. Valutazione della mortalità naturale della varroa

Per quanto riguarda i vantaggi, questo metodo è facilmente applicabile, non richiede dispositivi complicati, non disturba le famiglie e può essere condotto in ogni momento della stagione. La rete e il foglio adesivo fungono anche, indirettamente, da metodo passivo di controllo dell'acaro. A differenza dei metodi precedenti che richiedono il prelievo di campioni e la cui accuratezza può essere condizionata dalla metodologia del prelievo stesso, il metodo 5 è indiretto e non prevede un campionamento. Peraltro, essendo un metodo indiretto, può comportare anch'esso un certo grado di imprecisione, inoltre, questo metodo richiede più tempo dei precedenti, essendo necessarie più visite all'apiario per raccogliere i dati.

### Metodo 6. Valutazione sulle api adulte vive mediante distacco delle varroe con zucchero a velo

Per quanto riguarda i vantaggi, questo metodo è molto veloce e facilmente applicabile in condizioni di campo. Inoltre, essendo effettuato sulle api adulte, può essere condotto in ogni momento della stagione. L'uso di zucchero a velo non determina effetti negativi sulle api o sui prodotti dell'alveare, e le api vengono restituite vive alla famiglia. Il principale svantaggio del metodo è legato al fatto che non tutte le varroe si staccano dalle api e possono quindi essere contate, con conseguente sottostima dell'infestazione.

In conclusione, si possono formulare le seguenti considerazioni:

- 1) Tutti i metodi di valutazione del tasso di infestazione di varroa sulle colonie hanno i loro vantaggi e svantaggi. I metodi valutativi "in vivo" risparmiano le api ma sono meno precisi. I metodi che comportano l'uccisione di api o covata sono per contro i più precisi, ma ovviamente, più distruttivi per le api. Il metodo indiretto 5 è quello meno invasivo, ma il meno preciso rispetto a tutti gli altri. Può essere impiegato come metodo complementare a qualche altro.
- 2) In generale, il metodo 3 è risultato essere il più preciso per quanto riguarda la valutazione dell'infestazione delle api adulte (1,1 - 1,3 volte più preciso del metodo 1), mentre il metodo 4 è risultato essere il più preciso per quanto riguarda la valutazione dell'infestazione della covata (1,2 - 1,5 volte più del metodo 2).
- 3) Esiste una forte correlazione tra il tasso di infestazione delle api adulte e la mortalità naturale degli acari
- 4) La mortalità naturale espressa da 1 acaro caduto/24 h corrisponde alla presenza di circa 160 acari per colonia.

### Studio comparativo sul metodo diagnostico "dello zucchero a velo"

Il metodo impiegato generalmente per quantificare il livello d'infestazione da varroa delle colonie si basa sulla determinazione della mortalità naturale degli acari, cui può venire applicato un determinato coefficiente.

Negli ultimi tempi, tuttavia, è andato diffondendosi il cosiddetto metodo "dello zucchero a velo", in base al quale un campione di 500 api, misurato volumetricamente attraverso il riempimento di un contenitore, viene addizionato di zucchero a velo e agitato per distaccare e contare le varroe e metterle in relazione con il numero totale di parassiti dell'alveare di provenienza.

Per saggiarne l'efficacia, i due metodi sono stati applicati a 17 alveari nel luglio 2013. In ciascuno di essi sono state determinate anche le quantità di varroe totali, di api adulte e di celle di covata.

La correlazione fra la mortalità naturale di varroe e il grado d'infestazione delle colonie è stato in generale piuttosto alta ( $r = 0,877$ ), nonostante le elevate discrepanze a li-

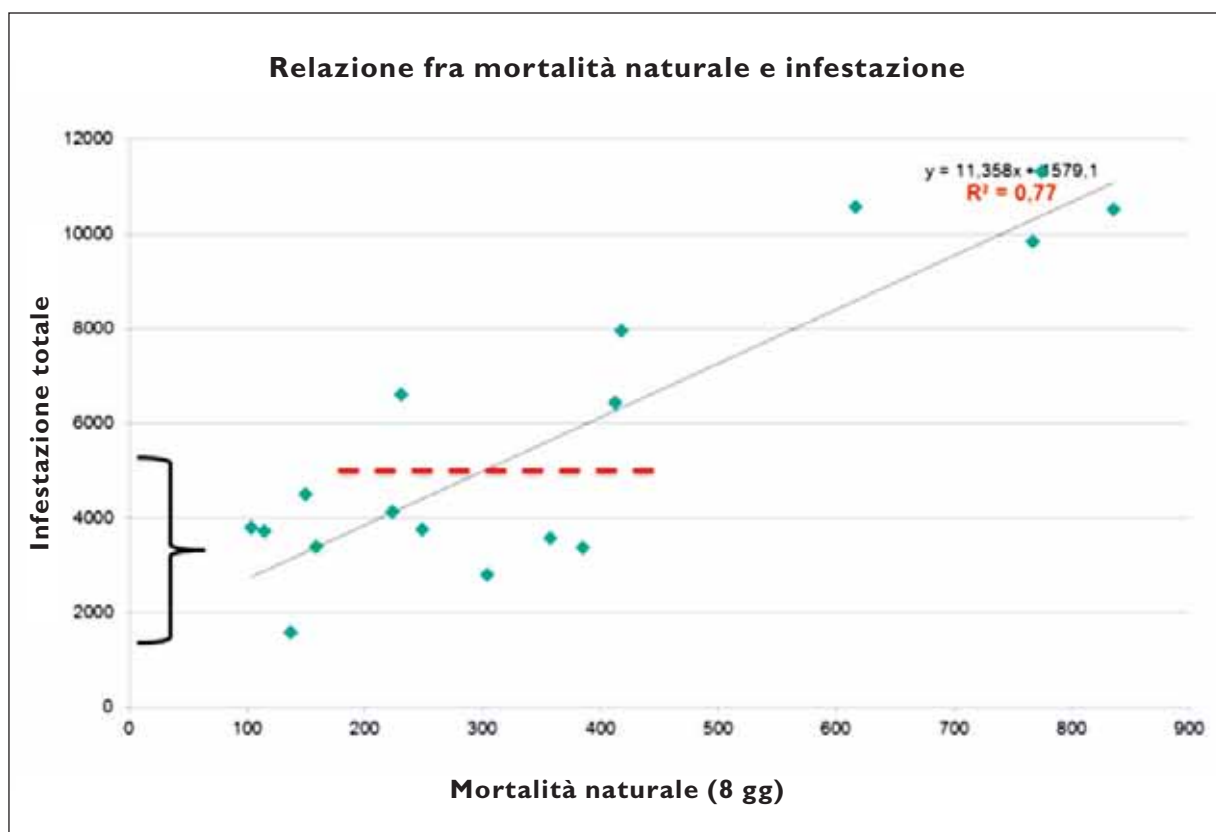


Figura 2.7. Caduta naturale (cumulativa di 8 giorni) e numero di acari totale della colonia. Dati individuali e retta di regressione. La linea tratteggiata corrisponde con un livello di 5.000 varroe.

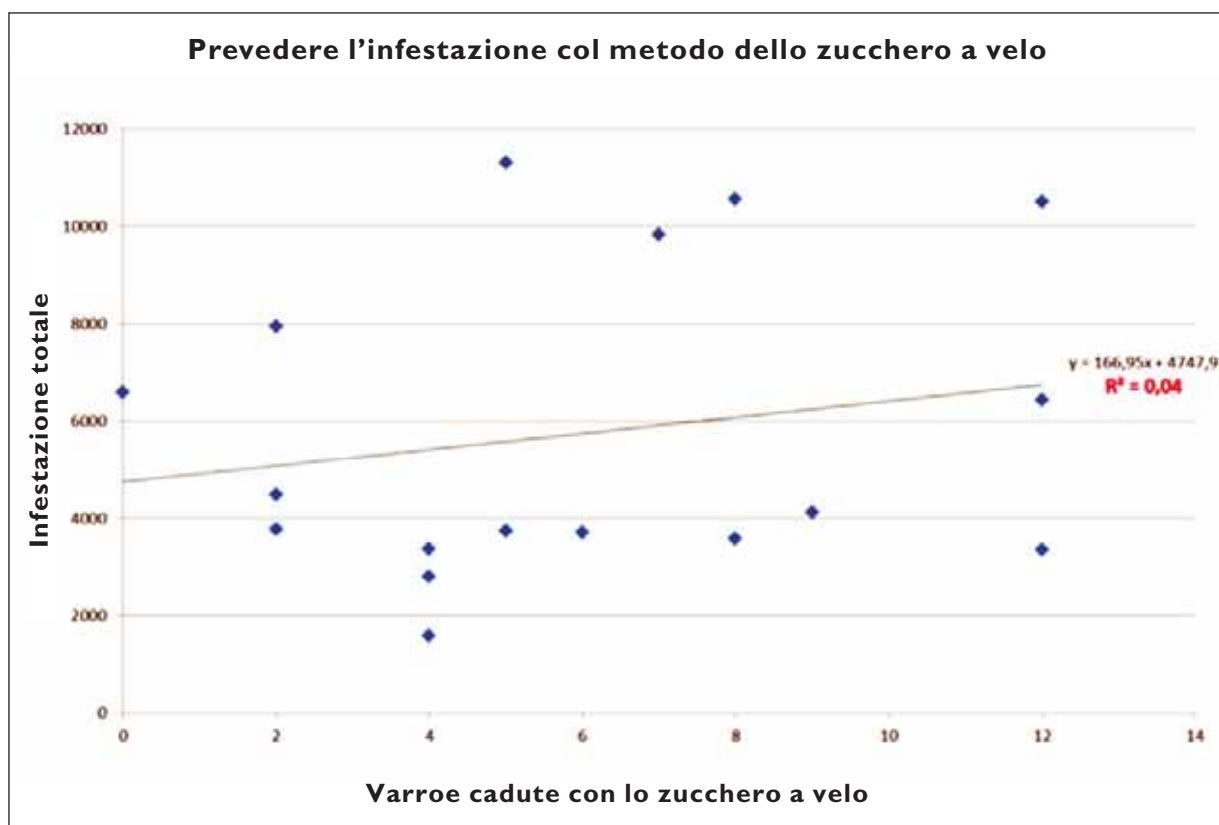
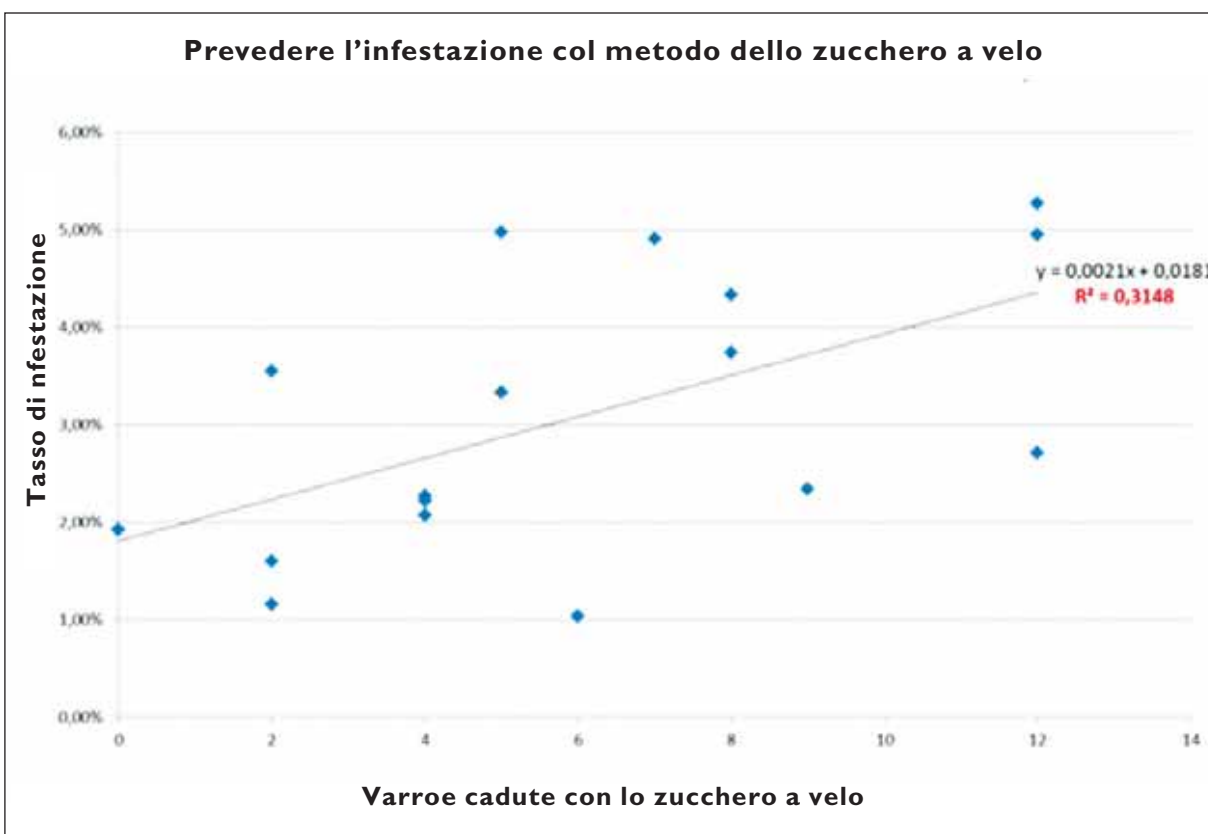


Figura 2.8. Affidabilità del metodo “dello zucchero a velo” nella previsione del livello d'infestazione totale della colonia.



**Figura 2.9. Affidabilità del metodo “dello zucchero a velo” nella previsione del livello d’infestazione totale della colonia.**

vello di singoli alveari (figura 2.7). Tuttavia, escludendo gli alveari con più di 5.000 varroe, limitando così le considerazioni a quelli con infestazioni più comuni, si nota una dispersione pressoché casuale dei punti, segnale di una correlazione molto bassa fra le due grandezze.

L’indagine sul metodo “dello zucchero a velo” ha messo in luce alcune importanti fonti d’errore.

La prima e più macroscopica è il forte divario fra il numero di api ritenute presenti nel campione (500) e quelle effettivamente campionate che, in questa verifica, sono state in media appena 169. Inoltre, l’aspersione del campione di api con zucchero a velo ha comportato la rimozione in media dell’80% circa delle varroe totali. La combinazione di queste fonti d’errore ha provocato una grave sovrastima e un aumento della variabilità del tasso d’infestazione calcolato nei campioni.

La disponibilità di strumenti di previsione adeguati potrebbe guidare la scelta del periodo d’intervento e permetterebbe di giudicare l’effetto di trattamenti eseguiti. Tuttavia le correlazioni fra tasso d’infestazione del campione, misurato secondo il metodo “dello zucchero a velo”, e il numero totale di varroe (figura 2.8) o il tasso d’infestazione generale della colonia (figura 2.9) sono molto deboli e insufficienti allo scopo.

I risultati di questa esperienza non confermano pertanto l’affidabilità dei due metodi saggiati per stimare indirettamente l’infestazione delle colonie. La mancanza di strumenti di previsione sufficientemente precisi è fra i motivi che suggeriscono l’adozione di concetti d’intervento contro la varroa basati su un calendario piuttosto che sul livello d’infestazione delle colonie.

## 2.2. Trattamenti farmacologici per il controllo di *Varroa destructor*

Michele Mortarino, Antonio Nanetti, Nicolò Corsi, Lorenzo Sesso

### Premessa

Attualmente il piano di controllo della varroa prevede l'esecuzione di un intervento estivo e di uno autunno-invernale. Lo scopo dell'intervento estivo, effettuato in presenza di covata, è quello di eliminare la gran parte delle varroe, consentendo così la sopravvivenza della colonia. Per questo motivo, una volta asportati i melari, è necessario intervenire con acaricidi che agiscono per un lungo periodo e in grado di abbattere gli acari man mano che fuoriescono dalle cellette. L'intervento autunnale, invece, deve colpire le varroe derivanti sia dalla riproduzione degli acari sopravvissuti al trattamento estivo, sia da eventuali reinfestazioni. Pertanto, in condizioni di assenza di covata e di ridotta attività delle api, si deve intervenire con una sostanza diversa che possieda un'azione rapida e abbia un sicuro effetto. I principi attivi utilizzati nella lotta alla varroa possono essere di origine allopatica (fluvalinate, amitraz) oppure naturale (acido ossalico, prodotti a base di timolo). I prodotti allopatici hanno il vantaggio di essere facilmente utilizzabili e avere un'efficacia relativamente costante ma hanno lo svantaggio di lasciare residui nelle matrici dell'alveare. Peraltro, nei confronti di questi prodotti sono stati riportati in letteratura diversi episodi di farmacoresistenza. I prodotti acaricidi di origine naturale hanno un basso impatto residuale sui prodotti dell'alveare e non sono stati finora coinvolti in acclarati fenomeni di farmacoresistenza. Lo svantaggio dei prodotti di origine naturale è di avere un'efficacia relativamente variabile, condizionata da fattori ambientali quali temperatura e umidità relativa (UR) dell'aria. Considerati i limiti che ancora oggi caratterizzano i prodotti farmacologici attualmente utilizzabili e le relative modalità di uso, l'attività del progetto è stata rivolta sia al perfezionamento di strategie farmacologiche correnti (acido ossalico - Api-Bioxal® con glicerolo come coformulante), sia alla sperimentazione di metodologie di controllo innovative e/o complementari alle attuali in uso, di pratica esecuzione, a basso impatto ambientale e alta efficacia (acido formico in gel Mite-Away Quick Strips®, estratto di Neem).

### Attività sperimentale

#### 2.2.1. Comparazione di efficacia fra acido ossalico in soluzione standard e acido ossalico contenente glicerolo

L'acido ossalico è un principio attivo di origine naturale largamente utilizzato in apicoltura per il controllo dell'infestazione da varroa. In forma pura, l'acido ossalico ha natura cristallina, e viene di solito somministrato alle api o tramite sublimazione, o tramite gocciolamento sotto forma di soluzione acquosa contenente sostanze che conferiscono all'acido ossalico una maggiore igroscopicità (quali il saccarosio), dato che all'interno dell'alveare, l'azione antivarroa è meglio garantita da depositi di acido ossalico all'interno di gocce di liquido rispetto a depositi della stessa molecola sotto forma essiccata. L'aumento di efficacia antivarroa dell'acido ossalico dovuta al coformulante saccarosio avviene solo in condizioni di umidità relativa comprese fra l'89% e il 69%. A questo proposito, va ricordato che il gra-

do di umidità relativa in corrispondenza dei favi occupati dalle api può essere inferiore alla soglia del 69%, in dipendenza da determinate condizioni meteorologiche e stagionali.

Su queste basi, è stato intrapreso uno studio allo scopo di verificare in condizioni di campo se l'impiego di glicerolo nella preparazione farmacologica di acido ossalico attualmente autorizzata in Italia per l'uso in apicoltura (Api-Bioxal®, Chemicals Life) somministrata per gocciolamento conferisca un effettivo vantaggio rispetto alla preparazione con saccarosio nel controllo della varroosi in apiario in condizioni di umidità relativa inferiori alla soglia del 69%. Infatti, in condizioni di laboratorio, quando il glicerolo è usato come coformulante al posto del saccarosio, rispetto al quale è dotato di maggiore igroscopicità, si ha una maggiore efficacia acaricida in condizioni di umidità relativa inferiori al 69%, e fino al 42%. Complessivamente sono state condotte sei diverse prove comparative in tre apiari situati in località diverse, sia in periodo invernale in assenza naturale di covata, sia in periodo estivo con blocco di covata artificialmente indotto.

Per le prove, sono stati utilizzate colonie di *Apis mellifera ligustica*, alloggiate in arnie del tipo Dadant Blatt da 10 favi, dotate di cassetto diagnostico mobile per il posizionamento del foglio adesivo utile a permettere il conteggio delle varroe cadute naturalmente e/o in seguito al trattamento. È stato preventivamente verificato che gli alveari non fossero manifestamente affetti da parassitosi o patologie diverse dalla varroosi, e che la loro forza (valutata in base al numero approssimativo di api, covata aperta e opercolata se presente, e dimensione delle scorte) fosse il più possibile omogenea, e che fosse presente una regina in buone condizioni di salute e di ovodeposizione estiva. In tutte le prove, gli alveari interessati sono stati divisi in due gruppi, di cui uno è stato trattato con Api-Bioxal® (Chemicals Laif, Vigonza, Padova) in soluzione di saccarosio preparata secondo le indicazioni riportate in etichetta dalla casa produttrice (AO-S), e l'altro è stato trattato con Api-Bioxal® in soluzione di glicerolo (AO-G), ottenuta miscelando 100 g del prodotto, 1 litro di acqua demineralizzata e 500 ml glicerolo. Il trattamento è stato operato per gocciolamento in ragione di 5 ml per ogni favo popolato di api.

Le tre prove invernali sono state effettuate in assenza naturale di covata. La prima prova invernale (prova 1) è stata effettuata presso l'apiario del Centro Zootecnico Didattico-Sperimentale (CZDS) di Lodi nell'arco di 65 giorni dal 27/12/2010 al 02/03/2011 (figura 2.10). La prova ha riguardato 8 alveari, di cui 4 trattati con ossalico in soluzione con saccarosio (AO-S) e 4 trattati con ossalico in soluzione con glicerolo (AO-G). La seconda prova invernale (prova 2) è stata effettuata in un apiario a Graffignana (LO) in contemporanea alla prova 1, e ha riguardato 18 alveari, di cui 9 trattati con AO-S e 9 trattati con AO-G. La terza prova invernale (prova 3) è stata svolta presso l'apiario del CZDS nell'arco di 50 giorni dal 05/01/12 al 23/02/12 e ha riguardato 8 alveari, di cui 4 trattati con AO-S e 4 trattati con AO-G.

Le prove estive sono state effettuate con blocco di covata artificialmente indotto prima del trattamento. La prima prova estiva (prova 4) è stata effettuata presso l'apiario del CZDS dal 09/08/11 al 12/10/11. La prova ha riguardato 8 alveari, di cui 4



**Figura 2.10. Apiario del Centro Zootecnico Didattico-Sperimentale di Lodi.**

trattati con ossalico in soluzione con saccarosio (AO-S) e 4 trattati con ossalico in soluzione con glicerolo (AO-G). La seconda prova estiva (prova 5) è stata effettuata in un apiario a Cagno (CO) dal 01/08/11 al 30/11/11 e ha riguardato 28 alveari, di cui 14 trattati con AO-S e 14 con AO-G. La terza prova estiva (prova 6) è stata svolta presso l'apiario del CZDS dal 23/07/12 al 04/10/12 e ha riguardato 12 alveari, di cui 6 trattati con AO-S e 6 trattati con AO-G. L'ingabbiamento della regina è stato realizzato in tutte le prove tramite gabbietta Var-control® (API-MO.BRU. Campodoro, Padova), e solo per la prova 5 si è ricorso anche all'utilizzo di gabbie GB® che permettono l'ovodeposizione nel favo ingabbiato (Apicoltura Giovanni Bianchi, Lomazzo, Como). Il confinamento dell'ape regina è stato mantenuto per un periodo di 24 giorni, seguito dalla liberazione della stessa, dalla distruzione del favo ingabbiato e dal trattamento con Api-Bioxal®. Qualche giorno dopo il trattamento, è stato effettuato il controllo della riaccettazione dell'ape regina da parte della colonia e della ripresa dell'attività di ovodeposizione.

Per tutte le prove, la valutazione dell'infestazione è stata realizzata ricorrendo alla metodica delle valutazioni della mortalità naturale abbinata al metodo della valutazione in seguito all'uso di acaricidi, tramite conteggio delle varroe cadute nel cassette diagnostico con periodicità variabile a seconda della prova, ma generalmente su base settimanale. In tutti gli alveari inclusi nelle prove, 21 giorni dopo il trattamento con Api-Bioxal®, è stato eseguito un trattamento abbattente chimico al fine di rendere possibile il calcolo percentuale di efficacia antivarroa, utilizzando per ciascun alveare due strisce di Apivar® (Laboratoires Biovè, Arques, Francia), contenente il principio attivo amitraz, e per la prova 3 anche due strisce di Apistan® (Vita Europe, LTD, Basingstoke, UK) contenente il principio attivo tau-fluvalinate, con le modalità previste dalle rispettive case produttrici.

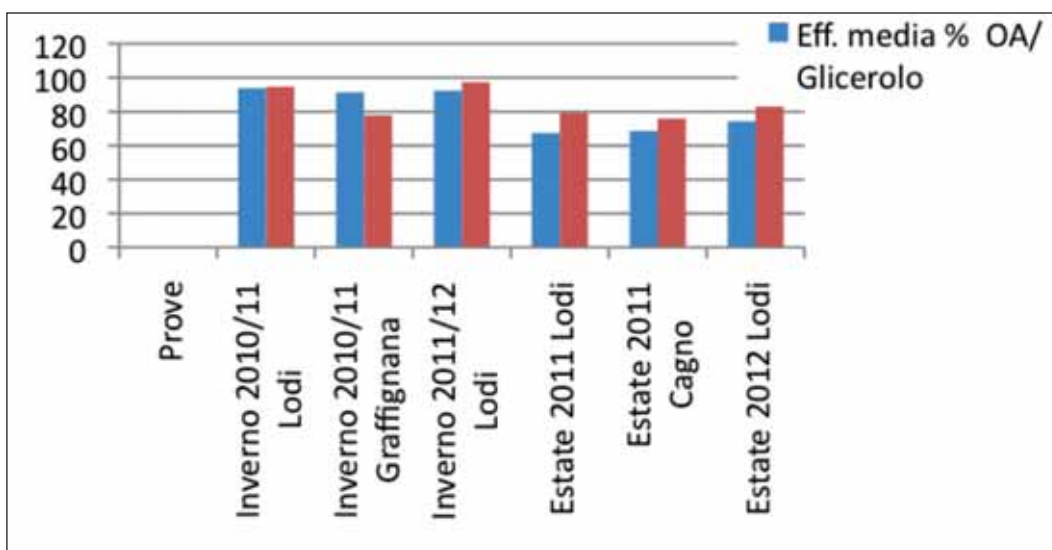
I valori di temperatura e umidità relativa all'esterno degli alveari e all'interno di alcuni di essi sono stati monitorati tramite appositi dataloggers (*EasyLog USB Data Loggers*, Lascar Electronics, Salisbury, UK). L'efficacia dei due gruppi di trattamento è stata confrontata mediante test non parametrico Mann-Whitneyunpaired.

In figura 2.11 sono riportati i valori dell'efficacia media % dell'Api-Bioxal® disciolto in soluzione con saccarosio e dell'efficacia media % dell'Api-Bioxal® disciolto in soluzione con glicerolo per le sei prove effettuate durante lo studio.

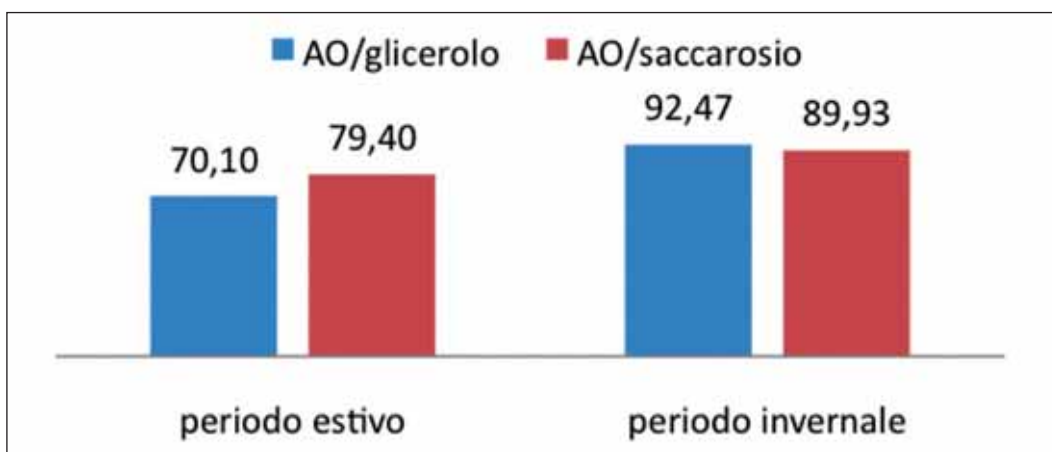
In figura 2.12, i dati di efficacia sono confrontati fra loro su base stagionale. L'analisi di significatività statistica dei dati relativi alle diverse prove non ha mostrato differenze significative a proposito dell'efficacia acaricida delle due diverse preparazioni. Dall'esame dei tracciati riportati a scopo esemplificativo in figura 2.13 e riguardanti la prova 6, si evince come le condizioni di umidità relativa registrate all'interno degli alveari durante il trattamento con Api-Bioxal® avrebbero dovuto favorire l'efficacia della preparazione con glicerolo rispetto a quella con saccarosio, dato che i valori di umidità relativa sono stati generalmente inferiori alla soglia del 69%.

Nel loro complesso, i risultati relativi all'impiego del glicerolo in apiario non hanno evidenziato particolari vantaggi rispetto al saccarosio, in questo non supportando le aspettative generate dalle osservazioni iniziali di laboratorio riportate in letteratura. Questo risultato è da considerarsi rappresentativo di quello che potrebbe essere osservato durante un impiego pratico in apicoltura, quantomeno in Lombardia, in quanto le prove sono state condotte in diverse condizioni microclimatiche. Per ipotizzare la ragione delle apparenti discrepanze fra queste esperienze di campo e la letteratura preesistente, va sottolineato che in condizioni di laboratorio i fattori di variabilità sono più controllabili che in condizioni di campo. Per esempio, l'efficacia antivarroa in laboratorio era cal-



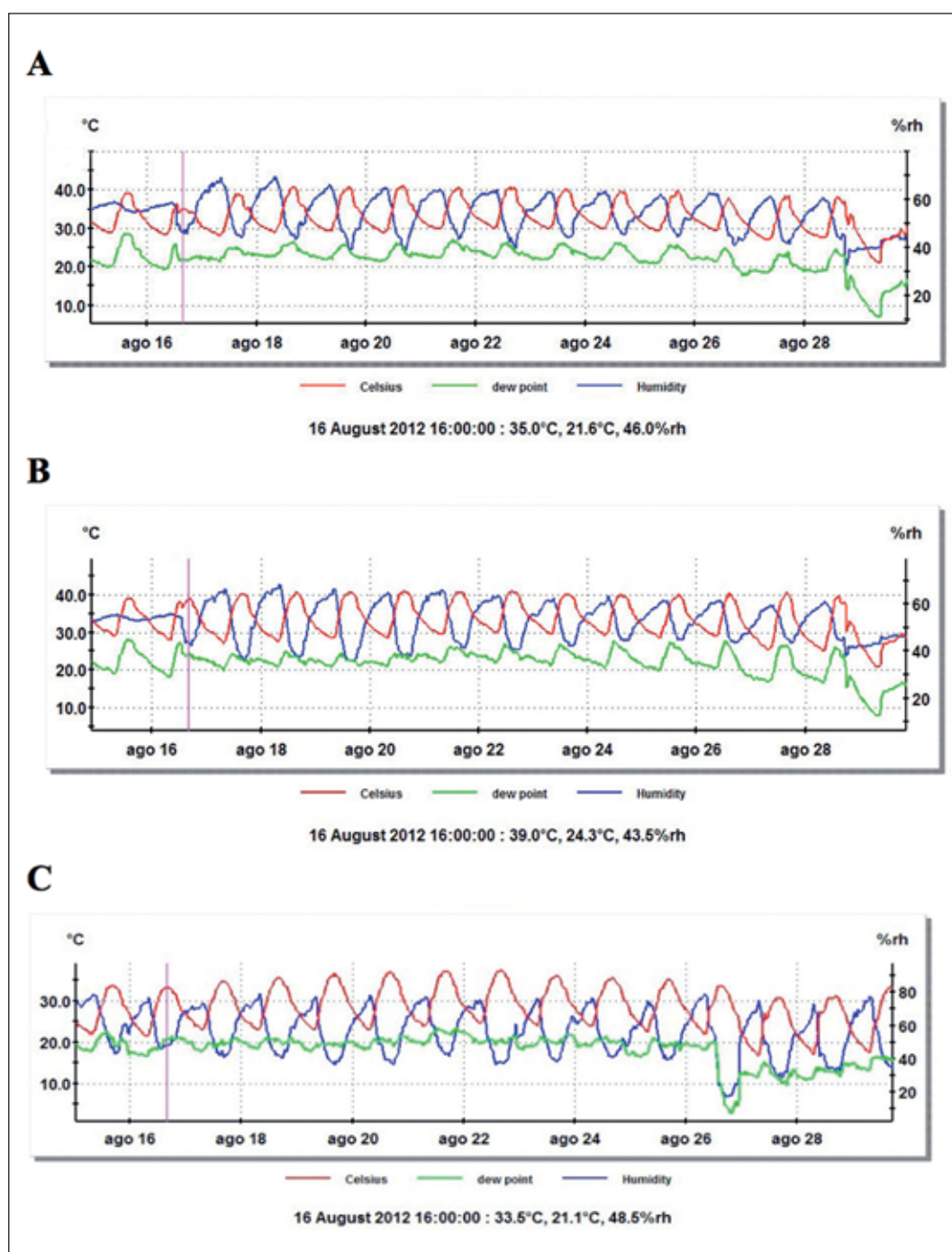


**Figura 2.11. Confronto fra l'efficacia media % dell' Api-Bioxal® con saccarosio e l'efficacia media % dell'Api-Bioxal® con glicerolo riscontrate in ciascuna delle sei prove.**



**Figura 2.12. Confronto fra l'efficacia media % dell' Api-Bioxal® con saccarosio e l'efficacia media % dell'Api-Bioxal® con glicerolo rispetto al periodo estivo e invernale.**

colata su un numero di varroe conosciuto (derivante da infestazione sperimentale delle api sottoposte al trattamento), in un periodo di durata definita e a temperatura costante. Al contrario, in condizioni di campo i trattamenti vengono applicati su carichi di varroa variabili e disomogenei a seconda dell'alveare. Inoltre, l'efficacia antivarroa in campo viene calcolata su un arco di tempo superiore (prima del trattamento chimico di controllo), a temperatura e umidità variabili, e in presenza di rischio di reinfestazione da api infestate provenienti da altri alveari, concreto soprattutto d'estate. A questo proposito, è noto che in condizioni di campo il fenomeno della reinfestazione è considerato uno dei maggiori ostacoli al completo contenimento della varroa, e contribuisce ad abbassare i valori di efficacia dei trattamenti con ossalico effettuati in estate rispetto a quelli effettuati in inverno, stagione in cui la reinfestazione è molto ridotta o nulla. In linea più generale, si può sottolineare che i valori di efficacia dell'Api-Bioxal® sgocciolato registrati nel presente studio sono sostanzialmente in linea con quelli noti in bibliografia per i rispettivi momenti stagionali. Come ulteriore considerazione a riguardo delle differenze fra gli studi di campo e l'esperimento in laboratorio, va menzionato che nello studio di laboratorio l'acido ossalico era stato utilizzato in forma di principio attivo puro. Al contrario, Api-Bioxal® non è composto solo da acido ossalico ma anche da coformulanti.



**Figura 2.13.** Riproduzione parziale dei tracciati di registrazione di dataloggers impiegati in concomitanza del periodo di trattamento con Api-Bioxal® nel corso della prova 6. I dataloggers erano collocati rispettivamente in un alveare trattato con Api-Bioxal® con saccarosio (tracciato A), in un alveare trattato con Api-Bioxal® con glicerolo (tracciato B), oppure nell'ambiente esterno durante la prova estiva 6 (tracciato C). I valori di efficacia % del trattamento con Api-Bioxal® sono stati pari, rispettivamente, all' 83,3% per l'alveare trattato con la preparazione contenente saccarosio e al 71,9% per l'alveare trattato con conla preparazione contenente glicerolo.

### 2.2.2. Uso di Api-Bioxal® nel trattamento invernale della varroosi

Api-Bioxal® (figura 2.14) contiene 0,886 g di acido ossalico biidrato per grammo. Il prodotto può essere utilizzato gocciolando soluzioni zuccherine nell'alveare o sublimandolo attraverso l'apertura di volo dell'arnia. In sintesi:



- Gocciolamento: sciogliere 35 g di Api-Bioxal® in 500 ml di sciroppo 1:1 preparato a parte e gocciolare dall'alto 5 ml di soluzione per favo popolato dalle api;
- Sublimazione: 2,3 g di Api-Bioxal® in un riscaldatore elettrico e introdurlo dall'apertura di volo fino a completa sublimazione.

In inverno 2010/11 il CRA-API ha condotto, nel quadro del progetto STRANOVA, una prova comparativa sui due metodi di somministrazione di Api-Bioxal® su 40 colonie prive di covata ripartite nei sei gruppi seguenti:

- Gruppo A: gocciolamento, dose di 5 ml/favo con api (10 alveari);
- Gruppo B: gocciolamento, sovradose di 15 ml/favo con api (10 alveari);
- Gruppo S: sublimazione, 2,3 g con riscaldatore Varro (10 alveari);
- Gruppo C: controllo non trattato (10 alveari);

Inizialmente i gruppi erano statisticamente omogenei per forza (media = 10.300 api; d.s. = 3327) e grado d'infestazione (479 varroe; d.s. = 447).

La figura 2.15 mostra lo sviluppo dell'efficacia acaricida media nel tempo. Gran parte della mortalità delle varroe si è verificata nella prima settimana, mentre attorno alla fine della seconda l'efficacia si era ormai stabilizzata su valori pressoché definitivi. L'efficacia finale è stata misurata al sedicesimo giorno; essa non è stata significativamente diversa nei gruppi trattati per gocciolamento (94,5%) e per sublimazione (92,9%), ma lo è stata in quello trattato con sovradose (98,8%) e nel controllo (5,3%).

Nei 16 giorni di trattamento sono state mantenute davanti agli alveari trappole per raccogliere le api morte espulse dalle compagne di nido. Nella figura 2.16 è riportata la mortalità delle api registrata nel periodo che, nel complesso, è stata significativamente maggiore negli alveari trattati con il triplo della dose indicata dal produttore (360 api)



Figura 2.14. Busta di Api-Bioxal® da 35 grammi.

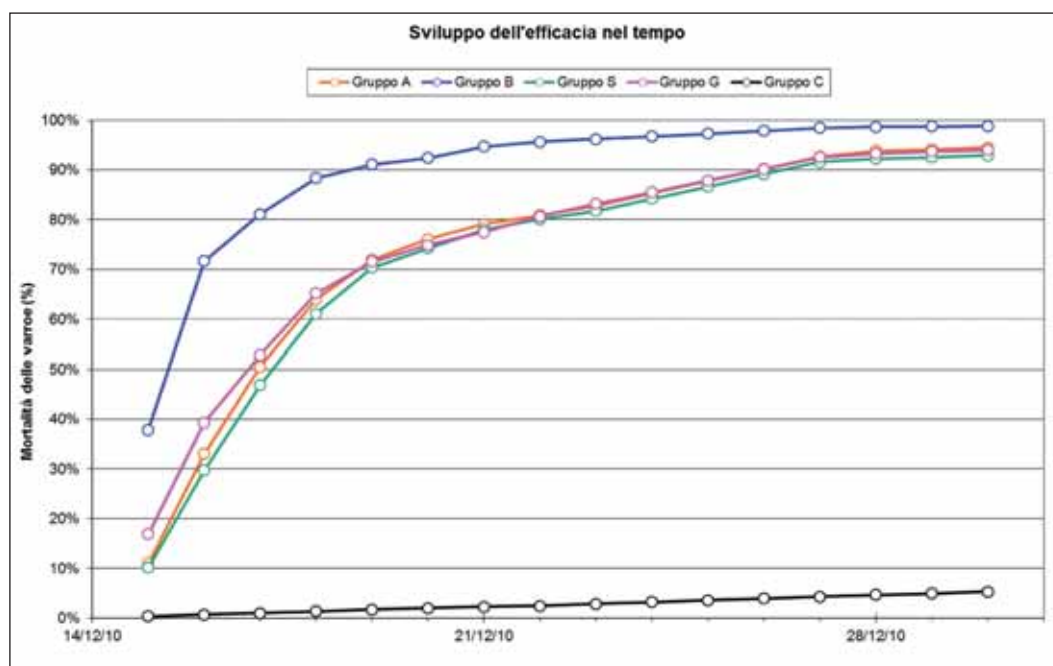
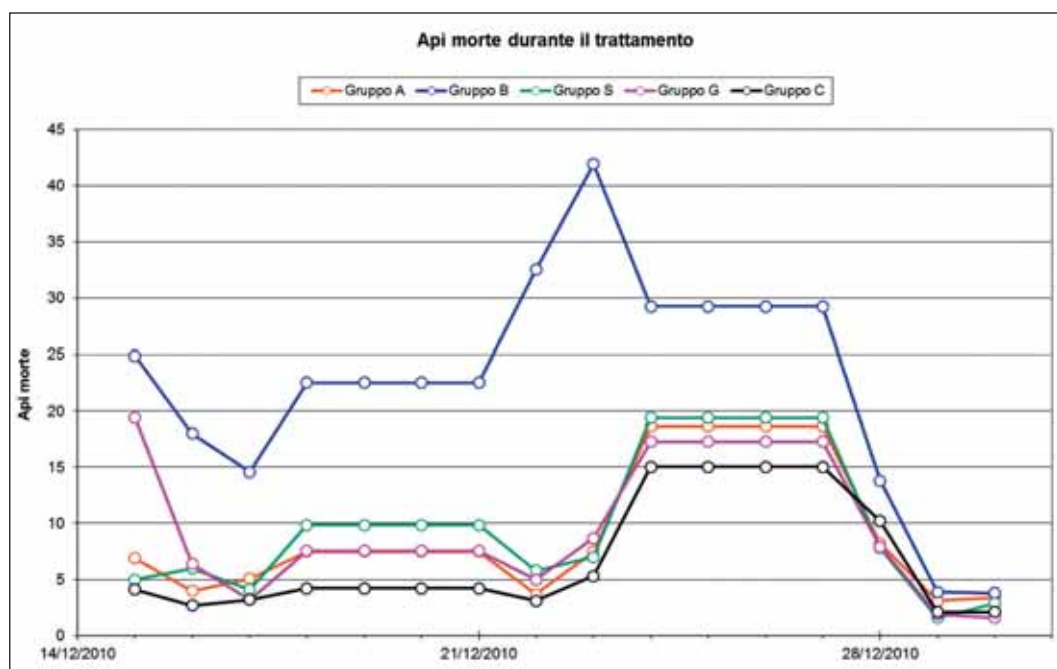


Figura 2.15. Efficacia cumulativa dei trattamenti con Api-Bioxal®.



**Figura 2.16. Mortalità giornaliera di api nella prova di confronto fra il metodo del gocciolamento e quello della sublimazione.**

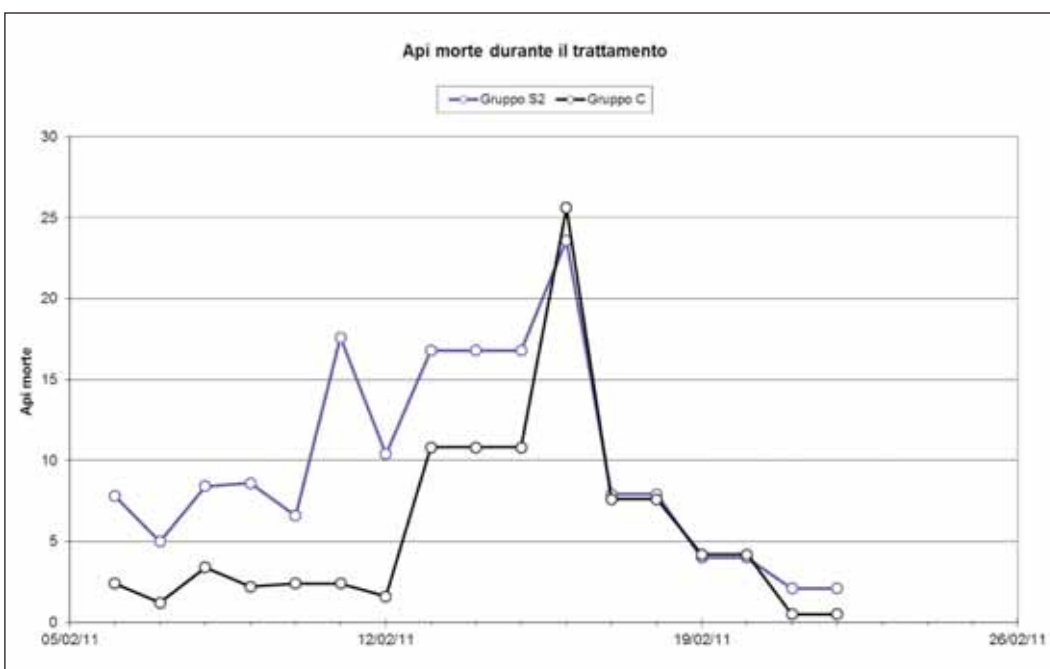
rispetto a quella degli altri gruppi (in media 138 api). Il trattamento con dose eccessiva non solo ha provocato effetti negativi acuti sugli alveari trattati, ma anche di lungo termine. Infatti al primo controllo post-invernale questi alveari erano più deboli in modo evidente e significativo (3.650 api) rispetto agli altri gruppi (A: 5.950; S: 7.925; C: 7.865).

Le soluzioni di Api-Bioxal® preparate secondo le indicazioni del produttore ricopiano strettamente quelle di soluzioni utilizzate prima della registrazione del prodotto su cui esiste ampia letteratura scientifica e divulgativa. I risultati qui riportati in forma sintetica sono in linea con la maggior parte delle conoscenze già acquisite su questa sostanza e confermano una volta di più la correttezza delle dosi e delle concentrazioni proposte. La scarsa tollerabilità di dosi eccessive distribuite per gocciolamento e la sostanziale equivalenza del metodo del gocciolamento e di quello della sublimazione sui piani di efficacia e tollerabilità sono questioni ormai ben sviscerate, che qui trovano la necessaria conferma per il prodotto registrato.

Le prove sulla sublimazione di Api-Bioxal® sono proseguite per approfondire aspetti di tollerabilità.

A questo scopo, un apiario di dieci colonie è stato suddiviso in due gruppi di cinque. Agli alveari di uno di essi è stata applicata una dose di Api-Bioxal® doppia rispetto a quella indicata, mentre l'altro ha avuto funzione di controllo non trattato.

La figura 2.17 riporta l'andamento della mortalità delle api rilevata con una trappola esterna in 17 giorni di osservazioni. La mortalità complessiva non è stata significativamente diversa fra il gruppo trattato (166 api) e il controllo non trattato (98 api). Tuttavia gli andamenti paiono inizialmente ben separati, per cui non è improbabile che la mancata significatività della differenza si debba più alla ridotta numerosità del confronto piuttosto che ad una reale perfetta tollerabilità a livello individuale. L'influenza a lungo termine del trattamento con una sovradosa somministrata per sublimazione è stata valutata confrontando le condizioni delle colonie all'uscita dall'inverno. La loro forza media (6.725 api) e la quantità media di covata allevata (5.025 celle) erano simili nei due gruppi e non significativamente differenti.



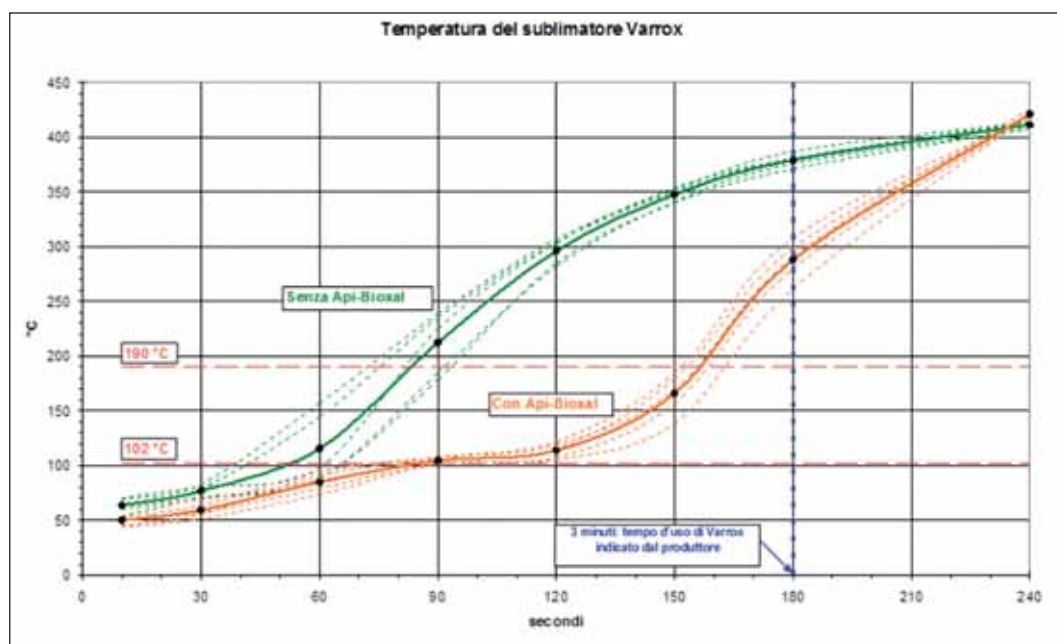
**Figura 2.17. Mortalità giornaliera di api nella prova di sovradosaggio per sublimazione.**

Il sovradosaggio somministrato per sublimazione è stato meno drastico di quello applicato per gocciolamento nella prova precedente (il doppio invece che il triplo); ciò rende inappropriate le comparazioni sulla tollerabilità di sovradosi distribuite nell'una o nell'altra maniera. Ciononostante questa esperienza afferma, in buona sostanza, che eventuali errori di dosaggio difficilmente possono tradursi in effetti negativi sensibili per la colonia.

In base alle esperienze descritte, gli aspetti più importanti ai fini del controllo delle infestazioni da varroa - efficacia e tollerabilità - non forniscono elementi decisivi per preferire l'una o l'altra tecnica di somministrazione dell'Api-Bioxal®. Criteri guida per i trattamenti invernali saranno quindi diversi da quelli esaminati finora: valutazioni economiche, aspetti pratici, difficoltà operative e così via. Fra questi, vale la pena ricordare che la formulazione di Api-Bioxal® comprende coformulanti non in grado di sublimare assieme al principio attivo. Durante il riscaldamento questi composti subiscono una degradazione termica con formazione di un residuo carbonioso nel sublimatore (figura 2.18), che un'esperienza svolta a corollario ha quantificato in circa 0,11 g per dose sublimata. Questo accumulo, che deve essere rimosso di volta in volta, aggiunge difficoltà operative alla già indaginosa somministrazione per sublimazione. Questi trattamenti sono generalmente eseguiti con sublimatori assai diversi fra loro, molti dei quali costruiti in modo approssimativo e distribuiti senza le necessarie garanzie di affidabilità. Costruttori e utilizzatori paiono dimenticare spesso la particolare instabilità termica dell'acido ossalico che, se riscaldato eccessivamente, può degradare in gran parte a composti privi di azione acaricida. D'altra parte, esperienze esterne al progetto STRANOVA indicano che l'efficacia dei trattamenti può variare notevolmente in funzione delle caratteristiche costruttive del sublimatore.



**Figura 2.18. Carbonizzazione dei coformulanti di Api-Bioxal® nel sublimatore.**



**Figura 2.19. Riscaldamento della capsula del sublimatore Varrox.**

Per questo motivo si è aggiunta alle prove una verifica sul funzionamento del sublimatore Varrox®, usato in queste prove e punto di riferimento per la costruzione di modelli successivi. In varie repliche, l'apparecchio è stato alimentato per un tempo pre-stabilito, con capsula contenente o meno Api-Bioxal®. La figura 2.19 mostra l'aumento graduale di temperatura nella capsula contenente il prodotto rispetto a quella vuota. La fase critica del passaggio di stato, che si ha fra 100 e 190 °C, viene superata lentamente, in oltre un minuto, ma comunque entro i tre minuti dall'accensione indicati dal produttore per completare il processo.

L'elevata efficacia dei trattamenti eseguiti per sublimazione registrata in queste prove è stata ottenuta utilizzando un apparecchio sublimatore in grado di riscaldare in prodotto con la gradualità riportata. Verifiche analoghe andrebbero eseguite su altri sublimatori, prima di impiegarli nel controllo delle infestazioni degli alveari.

### **2.2.3. Tollerabilità ed efficacia antivarroa dell'acido formico in gel (Mite-Away-Quick Strips®) in assenza naturale di covata**

L'acido formico è un acaricida organico che agisce per evaporazione, caratterizzato da efficacia media o elevata e da alcune problematiche legate alla tollerabilità da parte delle api in dipendenza soprattutto dalle condizioni ambientali di utilizzo, e non ultimo alla sicurezza da parte dell'operatore. In anni recenti è stata autorizzata all'uso apistico in alcuni Paesi europei ed extraeuropei una formulazione di acido formico adsorbito in una matrice di gel (Mite-Away-Quick Strips®, MAQS®), caratterizzata da un lento rilascio del principio attivo in modo da attenuare le problematiche sopracitate. In vista di una possibile registrazione del prodotto anche in Italia, nell'ambito del progetto STRANOVA sono state previste anche alcune prove da condurre con il MAQS® nelle nostre condizioni climatiche. In questa sede viene illustrata una prova condotta nell'ambito di una sperimentazione più ampia organizzata dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Lazio e Toscana previa apposita autorizzazione del Ministero della salute ai sensi del DM 12 novembre 2011 ("Buone pratiche di sperimentazione clinica dei medicinali veterinari sugli animali").

La prova è stata condotta presso l'apiario didattico-sperimentale del Centro Zootecnico Didattico-Sperimentale (CZDS) di Lodi. Sono state utilizzate colonie di *Apis mellifera ligustica*, alloggiate in arnie del tipo DadantBlatt da 10 favi, dotate di fondo a rete con cassetto diagnostico mobile. È stato preventivamente verificato che le colonie non manifestassero sintomatologie clinicamente rilevabili. La prova è stata effettuata dal 23/11/12 al 07/01/13. La prova ha riguardato 8 alveari, di cui 4 trattati con MAQS® e 4 controlli. Preventivamente, è stata verificata l'omogeneità delle colonie tramite il metodo dei sestì, stimando il numero di api adulte e la quantità di scorte, e verificando l'assenza di covata, attesa considerando la stagione tardo-autunnale. Negli alveari del gruppo di trattamento, privi di melario data la stagione, sono state posizionate tre strisce di MAQS® per un totale di 20 giorni. Il periodo di trattamento è stato prolungato rispetto alla durata standard di sette giorni, a causa delle basse temperature che si sono verificate durante la prova, per consentire la completa evaporazione del principio attivo. Durante il periodo di trattamento, è stata effettuata la conta delle varroe cadute naturalmente (nel gruppo di controllo) o a seguito del trattamento con acido formico, ed è stata valutata in tutte le famiglie la mortalità delle api adulte tramite l'impiego di gabbie underbasket. Al ventesimo giorno di trattamento le strisce sono state rimosse ed è stata ripetuta la valutazione delle famiglie tramite il metodo dei sestì. Lo stesso giorno è stato eseguito in tutti gli alveari un trattamento acaricida di controllo con un prodotto a base di acido ossalico gocciolato secondo le indicazioni del produttore (Api-Bioxal® Chemicals Laif, Vigonza, Padova). Dopo altri 15 giorni, durante i quali è stata effettuata la conta delle varroe cadute a seguito del trattamento con acido ossalico, la prova è terminata. La valutazione di efficacia del trattamento è stata realizzata ricorrendo alla metodica della valutazione della mortalità naturale degli acari e di quella dovuta al trattamento con acido formico, abbinata al metodo della valutazione della mortalità indotta da acaricida (acido ossalico). Inoltre, durante tutta la prova la temperatura esterna e l'umidità relativa sono state monitorate mediante datalogger (EasyLog USB Data Loggers, Lascar Electronics). L'efficacia dei due gruppi di trattamento è stata confrontata mediante test non parametrico Mann-Whitney unpaired mediante il programma SPSS Statistics v19.

Durante il periodo di trattamento, la temperatura si è mantenuta fra i 14 °C e i -7°C, con una media di 5 °C. La mortalità assoluta (intesa come numero di api adulte morte) osservata negli alveari trattati con acido formico rispetto ai controlli non trattati è riportata in tabella 2.4. Si può osservare, in linea generale, che la mortalità indotta dall'acido formico nelle condizioni di questa prova si discosta solo parzialmente da quella osservabile in assenza di trattamento. Questo dato rappresenta un elemento incoraggiante per quanto riguarda la sostanziale tollerabilità di questo prodotto quando utilizzato in condizioni di evaporazione più lenta e prolungata nel tempo rispetto al normale utilizzo alle temperature consigliate dal produttore. L'andamento della popolazione di api e dell'entità delle scorte nei due gruppi sperimentali è riportato in figura 2.20.

La caduta di varroa che è stata osservata nei 18 giorni di trattamento con MAQS™, rispetto ai controlli, e nei successivi giorni dopo il trattamento con acido ossalico (effettuato al giorno 18), è riportata in figura 2.21. L'efficacia acaricida relativa dell'acido formico per ciascun alveare e come media  $\pm$  DS nei due gruppi della prova è riportata in tabella 2.5, con una differenza statisticamente significativa fra i due gruppi sperimentali ( $p < 0,05$ ).

In figura 2.22 è riportato il confronto grafico fra le medie dell'efficacia nei due gruppi sperimentali. I risultati suggeriscono che in condizioni di utilizzo tardo-autunnali, il prodotto fornisce una soddisfacente efficacia acaricida anche in assenza di covata.

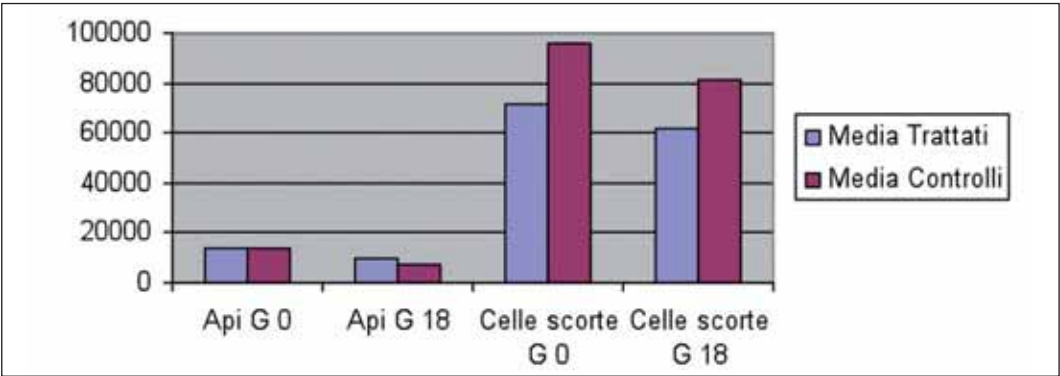


**Tabella 2.4. Mortalità di api adulte osservata nei due gruppi sperimentali durante il periodo di trattamento con MAQS®.**

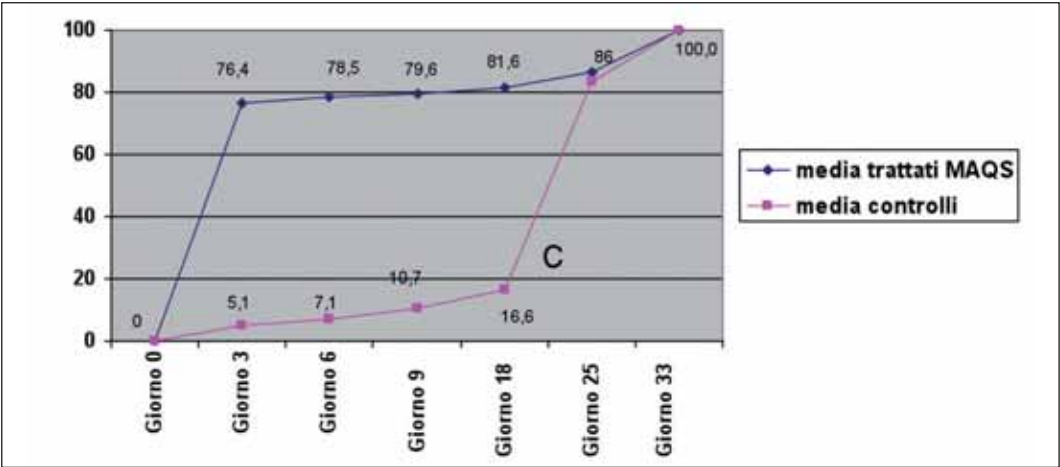
TRATTATI	MORTALITÀ	CONTROLLI	MORTALITÀ
Trattato 1	87	Controllo 1	86
Trattato 2	95	Controllo 2	87
Trattato 3	201	Controllo 3	241
Trattato 4	258	Controllo 4	130
Totale api	641	Totale api	544

**Tabella 2.5. Efficacia acaricida nei diversi alveari, ed espressa come media e deviazione standard nei due gruppi di trattamento.**

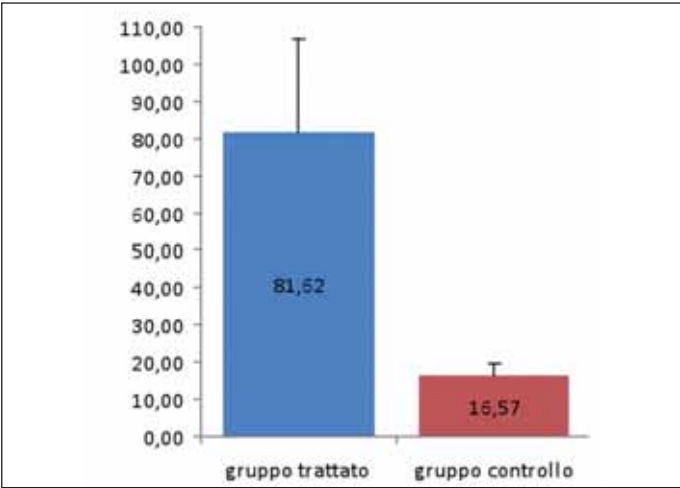
TRATTATI	EFFICACIA %	CONTROLLI	EFFICACIA %
Trattato 1	97,56	Controllo 1	15,52
Trattato 2	44,34	Controllo 2	13,25
Trattato 3	89,00	Controllo 3	16,67
Trattato 4	95,57	Controllo 4	20,83
Media ± DS	81,62 ± 25,12	Media ± DS	16,57 ± 3,18



**Figura 2.20. Entità della popolazione di api e delle scorte nei due gruppi sperimentali, all'inizio (G 0) e alla fine (G 18) della prova.**



**Figura 2.21. Curva della caduta di varroa nei due gruppi sperimentali espressa in valori percentuali cumulativi.**



**Figura 2.22. Rappresentazione grafica dei valori dell'efficacia % media e deviazione standard del trattamento con MAQS® + ingabbiamento e dell'efficacia % media e deviazione standard del solo ingabbiamento.**

#### 2.2.4. Tollerabilità ed efficacia dell'estratto di Neem come coadiuvante del trattamento acaricida tramite blocco di covata e acido ossalico (Api-Bioxal®)

L'albero del Neem (*Azadirachta indica*) fornisce diversi prodotti naturali che vengono tradizionalmente usati nella medicina popolare, e in qualche caso anche nella medicina convenzionale, come coadiuvanti nel trattamento di diverse parassitosi degli animali. In letteratura esistono diverse informazioni relative all'efficacia di prodotti a base di Neem nei confronti della varroa, generalmente in condizioni di laboratorio. D'altra parte, attualmente manca una appropriata validazione di procedure di impiego che siano praticabili in condizioni di campo. Nell'ambito del progetto STRANOVA, è stata effettuata una prova preliminare di sicurezza ed efficacia di un prodotto naturale a base di olio di Neem (*A. indica*), in abbinamento al blocco di covata indotto tramite ingabbigliamento della regina e al trattamento antivarroa con acido ossalico (Api-Bioxal®, Chemicals Laif). La prova è stata effettuata dal 24/07/13 (giorno 0) al 02/09/13 (giorno 40). La prova ha riguardato 12 alveari, di cui 6 recanti il favo di ingabbigliamento della regina pretrattato con estratto di Neem, e 6 controlli. Prima dell'inizio della prova, è stata verificata l'omogeneità delle colonie tramite il metodo dei sestii, stimando il numero di api adulte, la superficie occupata dalle uova fresche, dalla covata fresca e dalla covata opercolata, e la quantità di scorte. Al giorno 0, la regina è stata collocata su un favo vuoto già costruito, che per il gruppo Neem è stato nebulizzato tramite spray, da ciascun lato, con 16 ml di preparazione commerciale di estratto di Neem RP03™ diluito nella proporzione di 1:4 (*A. indica*) come raffigurato in figura 2.23.

Le regine sono state quindi ingabbiate in gabbie per favo Giovanni Bianchi per 21 giorni. Durante il periodo di trattamento, la mortalità delle api adulte è stata valutata in tutte le famiglie tramite l'impiego di gabbie under basket. Al giorno 21 della prova le regine sono state liberate, e i relativi favi di ingabbigliamento sono stati prelevati per il successivo conteggio delle celle di covata opercolata e delle varroe in esse contenute. In occasione della liberazione delle regine è stata ripetuta la valutazione delle famiglie tramite il metodo dei sestii. Dopo ulteriori 5 giorni (giorno 26) è stato eseguito in tutti gli alveari un trattamento acaricida di controllo con un prodotto a base di acido ossalico gocciolato secondo le indicazioni del produttore (Api-Bioxal®, Chemicals Laif). Dopo ulteriori nove giorni (giorno 59) la prova è stata terminata. Per tutta la durata della prova, è stata monitorata la mortalità degli acari, dapprima naturale e poi dovuta al trattamento con acido ossalico, mediante esame periodico dei fogli diagnostici nei cassettei e conta delle relative varroe.

Per quanto riguarda i dati di tollerabilità, la mortalità assoluta (intesa come numero di api adulte morte) osservata negli alveari trattati con estratto di Neem rispetto ai controlli non trattati è riportata in tabella 2.6. L'andamento della popolazione di api e dell'entità delle scorte nei due gruppi sperimentali durante la prova è riportato in figura 2.24.

L'effetto precoce sulla deposizione delle regine dopo l'ingabbigliamento, indicato dal numero di celle di covata opercolata riscontrate su ciascun favo prelevato al Giorno 21, è riportato in tabella 2.7.



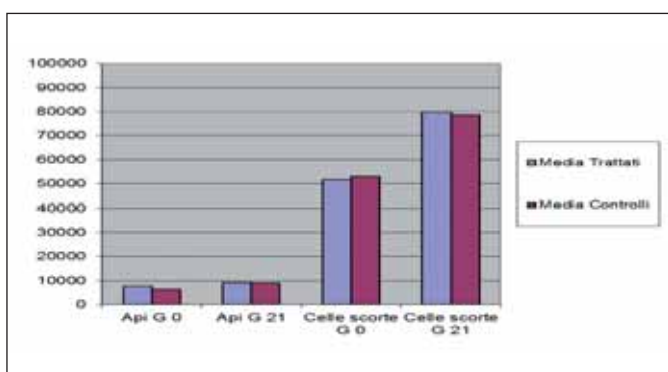
**Figura 2.23.** Nebulizzazione tramite spray del favo costruito con la soluzione di olio di Neem.

**Tabella 2.6. Mortalità di api adulte osservata nei due gruppi sperimentali durante il periodo di trattamento con estratto di Neem (periodo di osservazione: dal G 0 al G 21).**

TRATTATI	MORTALITÀ	CONTROLLI	MORTALITÀ
Trattato 1	134	Controllo 1	261
Trattato 2	155	Controllo 2	129
Trattato 3	175	Controllo 3	143
Trattato 4	122	Controllo 4	126
Trattato 5	219	Controllo 5	237
Trattato 6	241	Controllo 6	110
Media alveare	174	Media alveare	168
Media alveare/giorno	8,3	Media alveare/giorno	8,0

**Tabella 2.7. Numero di celle di covata opercolata riscontrate sui favi di ingabbigliamento nei diversi alveari al G 21.**

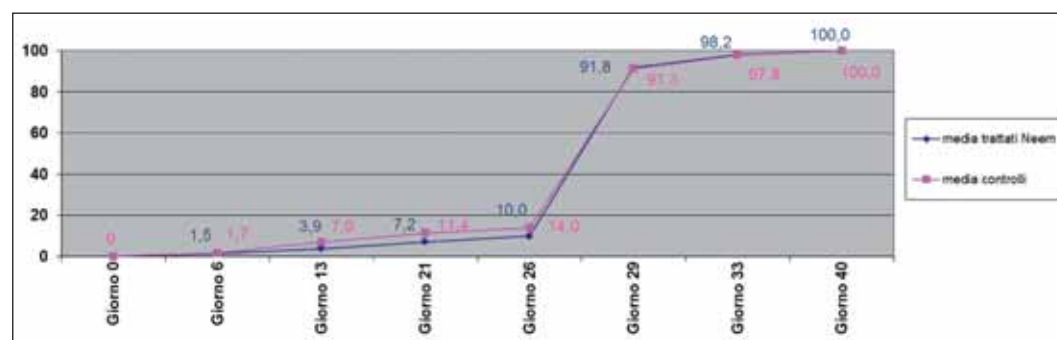
TRATTATI	N° celle	CONTROLLI	N° celle
Trattato 1	3.101	Controllo 1	4.830
Trattato 2	3.924	Controllo 2	4.275
Trattato 3	3.630	Controllo 3	5.502
Trattato 4	3.684	Controllo 4	2.894
Trattato 5	4.986	Controllo 5	617
Trattato 6	6.043	Controllo 6	5.753
Media	4.228	Media	3.979



**Figura 2.24. Entità della popolazione di api e delle scorte nei due gruppi sperimentali, all'inizio della prova (G 0) e alla fine del periodo di ingabbigliamento (G 21).**

Per quanto riguarda i dati di efficacia, in figura 2.25 è riportato l'andamento della caduta di varroa nei due gruppi in tutto l'arco della prova (durante il trattamento con estratto di Neem per i 21 giorni di ingabbigliamento delle regine, poi in 5 giorni di intervallo fino al trattamento antivarroa con Api-Bioxal® (acido ossalico) effettuato al giorno 26 e fino al giorno 40). È stato necessario escludere da questa valutazione una famiglia trattata con Neem (alveare Trattato 4) che è stata soggetta a saccheggio e spopolamento a partire dal giorno 33. Il numero totale di varroe cadute nell'arco della prova è stato compreso per i Trattati, fra 1.258 (alveare Trattato 1) e 482 (alveare Trattato 2), mentre per i Controlli, fra 2.151 (alveare Controllo 1) e 320 (alveare Controllo 4). Nella tabella 2.8 è riportata l'efficacia acaricida relativa dell'acido ossalico (Api-Bioxal®), per ciascun alveare nei due gruppi della prova.

Questi risultati suggeriscono che durante il pretrattamento con estratto di Neem si osserva una diminuita caduta naturale di varroa, indice quindi di una minore infestazione dell'alveare, e complessivamente viene aumentata l'efficacia del successivo trattamento con acido ossalico.



**Figura 2.25. Efficacia acaricida dell'acido ossalico (Api-Bioxal®) nei diversi alveari, ed espressa come media $\pm$ DevSt nei due gruppi di trattamento con olio di Neem**



**Tabella 2.8. Efficacia acaricida dell'acido ossalico (Api-Bioxal®) nei diversi alveari, ed espressa come media  $\pm$  DevSt nei due gruppi di trattamento con olio di Neem.**

TRATTATI	EFFICACIA %	CONTROLLI	EFFICACIA %
Trattato 1	82,7	Controllo 1	75,1
Trattato 2	95,6	Controllo 2	93,2
Trattato 3	89,5	Controllo 3	85,7
Trattato 4	Escluso dalla prova	Controllo 4	91,3
Trattato 5	90,1	Controllo 5	90,0
Trattato 6	92,0	Controllo 6	81,0
Media $\pm$ DevSt Trattati	90,0 $\pm$ 4,7	Media $\pm$ DevSt Controlli	86,0 $\pm$ 6,9

**Tabella 2.9. Intensità di infestazione delle celle di covata recettiva nei diversi alveari, espressa sia come n. di varroe/cella sia come rapporto fra varroe nelle celle del favo e varroe in fase foretica.**

TRATTATI	Varroe/cella	Varroe favo/foretiche	CONTROLLI	Varroe/cella	Varroe favo/foretiche
Trattato 1	0,1335	0,39	Controllo 1	0,3205	0,93
Trattato 2	0,0204	0,17	Controllo 2	0,0225	0,24
Trattato 3	0,0223	0,13	Controllo 3	0,1445	1,50
Trattato 4	0,0825	N.D.	Controllo 4	0,0062	0,06
Trattato 5	0,0674	0,75	Controllo 5	0,1248	0,24
Trattato 6	0,0493	0,34	Controllo 6	0,0593	0,80
Media	0,063	0,36	Media	0,113	0,63

In tabella 2.9 sono infine riportati i dati di infestazione delle celle di covata nei due gruppi di trattamento, sia in rapporto al numero delle celle di covata recettiva (cioè opercolata) esaminate nel favo di ingabbiamento prelevato al giorno 21, sia in rapporto alle varroe in fase foretica (cioè esterne alle celle di covata) rilevate dal giorno 21 dopo la fine del trattamento con estratto di Neem). Il numero di celle per ciascun favo sottoposte a disopercolatura e successivo lavaggio per la ricerca delle varroe è riportato nella precedente tabella 2. Per quanto riguarda l'alveare Trattato 4, non essendo disponibile il dato reale delle varroe foretiche in quanto soggetta a saccheggio e spopolamento a partire dal giorno 33, non è stato possibile ricavare il rapporto con le varroe reperite nel corrispondente favo. Questi risultati suggeriscono un'apprezzabile riduzione del grado di infestazione della covata in seguito al trattamento con estratto di Neem con le presenti modalità.

## Conclusioni

Il complesso delle attività condotte e i relativi risultati consentono di formulare le seguenti considerazioni:

- 1) la preparazione di Api-Bioxal® con glicerolo non sembra dimostrare, in condizioni di campo, un'efficacia antivarroa significativamente diversa rispetto alla preparazione di Api-Bioxal® con saccarosio. A spiegazione di tale risultato, si potrebbe ipotizzare che l'Api-Bioxal®, il quale prevede la presenza di coformulanti oltre che di acido ossalico, sia meno sensibile alle condizioni di umidità relativa rispetto all'acido ossalico in quanto tale. Le risultanze dello studio sono comunque da considerarsi non definitive, data la potenziale enorme variabilità delle condizioni di infestazione e ambientali che si possono verificare in campo, e che non sono in genere prevedibili a priori. Per supportare, o escludere, in maniera definitiva eventuali vantaggi derivanti dall'uso in campo di glicerolo, sarebbero necessari ulteriori studi condotti in apiari e condizioni ambientali sensibilmente diverse rispetto a quelle che hanno caratterizzato l'attività progettuale.
- 2) L'utilizzo di acido formico in gel (MAQS®) nelle condizioni autunnali ha consentito di verificare un'ottima tollerabilità da parte delle api in concomitanza a una notevole efficacia. Questa indicazione scaturita dall'attività del progetto è particolarmente utile considerando che il binomio tollerabilità-efficacia dei prodotti a base di acido formico in periodo estivo non è sempre soddisfacente, in relazione alla difficoltà di controllo dell'evaporazione del principio attivo in concomitanza ad alte temperature.
- 3) Si può ritenere quantomeno in via preliminare che il trattamento con estratto di Neem alle modalità impiegate non induca particolari effetti negativi alle famiglie, e possa costituire un valido coadiuvante per il trattamento antivarroa con Api-Bioxal®. Per confermare queste prime indicazioni, sarebbe importante proseguire con nuove sperimentazioni, ad esempio aumentando la concentrazione del prodotto e/o valutando l'efficacia di differenti vie di somministrazione.

## 2.3. Metodologie meccaniche: il blocco di covata

Michele Mortarino, Antonio Nanetti, Nicolò Corsi, Lorenzo Sesso

### Prova comparativa di due gabbie per il blocco di covata estivo

#### Premessa

La tecnica apistica denominata “blocco di covata”, operata come strategia di contenimento della varroosi nel periodo estivo, sta prendendo sempre più piede tra gli apicoltori lombardi con una grande varietà di tipologie di gabbia impiegate per la clausura della regina e variazioni riguardanti le tempistiche di ingabbiamento delle stesse. Si sono affermate due modalità fondamentali per realizzare il blocco di covata: la prima consiste nell’impedire totalmente alla regina di deporre, la seconda consente la deposizione solamente in un’area circoscritta dell’alveare, per esempio su di un solo favo. Il blocco artificiale della covata si basa sul fatto che, confinando la regina in apposite strutture di varia foggia e dimensione, se ne impedisce la deposizione. Si ottiene così una colonia priva di covata opercolata, in questo modo si interrompe il ciclo riproduttivo della varroa, intimamente sincronizzato con quello delle api e si espongono gli acari ai trattamenti acaricidi, che altrimenti non sarebbero raggiunti dai principi attivi a causa dell’opercolo delle cellette in cui si annidano. Lo scopo della sperimentazione è stato quello di verificare quale delle due strategie di ingabbiamento potesse offrire maggiori garanzie di successo, in termini di efficacia nel controllo della varroosi e benessere delle famiglie d’api in particolare le regine.

Tra le numerosissime gabbie utilizzate dagli apicoltori per questo scopo, e che si trovano in commercio sono state prese in esame le seguenti:

- Var-Control® di materiale plastico, viene inserita tramite apposite staffe al listello superiore di un telaio da nido, non permette alcuna deposizione di uova durante il periodo di clausura della regina.
- GB® costituita da due elementi speculari in lamiera zincata che vengono utilizzati per racchiudere un normale favo da nido sul quale la regina può deporre durante il confino. Entrambe consentono il passaggio delle operaie essendo costituite da griglie escludi-regina, affinché possano accudirla.

#### Materiali e metodi

La sperimentazione è stata condotta presso due apiari situati in provincia di Como nel 2011 e Milano nel 2012, costituiti da colonie di *Apis mellifera* L., allevate in alveari Dadant-Blatt da 10 favi, per un totale di 30 alveari.

Nei mesi di luglio e agosto sono stati scelti gli alveari uniformi per quantità di api, covata e scorte, tramite il metodo dei sestii. Sette giorni prima dell’inizio della prova sono stati inseriti in tutti gli alveari i fogli adesivi nel cassetto anti-varroa e sono stati mantenuti in loco, sostituendoli in caso di necessità, per tutto il periodo della sperimentazione al fine di valutare la caduta indotta da mortalità naturale degli acari, e quella dovuta ai trattamenti acaricidi. Il protocollo sperimentale adottato ha previsto la suddivisione di entrambi gli apiari in due gruppi: nel primo, denominato VC, è stato praticato il blocco di covata inserendo l’ape regina nella gabbietta Var-Control® posizionata ritagliando una sezione di favo da nido, collocato al centro della colonia. Nel secondo gruppo, denominato GB, sono state ingabbiate

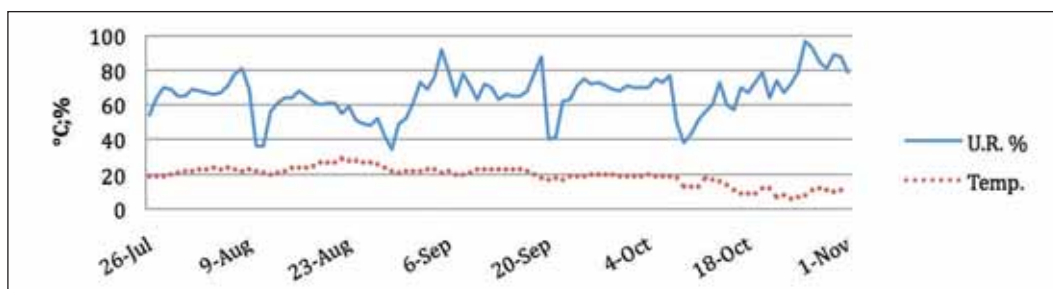
le regine su di un favo da nido racchiuso nella gabbia GB® e inserito nella colonia tra i favi centrali. Per tale operazione è stato scelto un favo della stessa famiglia in cui era presente covata di differente età, cioè con presenza di uova, larve di pochi giorni e altre prossime all'opercolatura, ma anche covata opercolata e prossima allo sfarfallamento. Questo perché la regina doveva avere a disposizione spazio, seppur limitato, per continuare la deposizione, che è stato ottenuto appunto grazie alla scalarità degli sfarfallamenti. Solo nell'apiario comasco durante la sperimentazione del 2011 era presente anche un terzo gruppo denominato TNT, costituito da 4 alveari testimone ai quali non è stato praticato il blocco di covata e che non hanno ricevuto nessun trattamento acaricida se non alla fine della prova.

Il giorno 0 sono state ingabbiate tutte le regine dei gruppi VC e GB, le quali sono state mantenute in clausura per 21 giorni. Per evitare reinfestazioni, dagli alveari del gruppo GB, prima di eseguire il trattamento acaricida, sono stati eliminati i favi contenenti covata opercolata in cui la regina ha potuto deporre durante il periodo di confinamento. In questi favi infatti, si supponeva di trovare un numero molto elevato di varroe, in quanto attratte dall'unica covata presente nell'alveare. Tali favi sono stati conservati in laboratorio in congelatore, in attesa di verificare il numero di acari presenti. Il giorno 24, constatata l'assenza di covata maschile opercolata, è stato eseguito il trattamento acaricida con Api-Bioxal® preparato secondo le modalità riportate in etichetta. È stato somministrato tramite siringa in ragione di 5 ml di soluzione per favo popolato da api secondo il metodo del gocciolamento. In tale data sono stati inseriti nuovamente i fogli adesivi nel cassetto anti-varroa al fine di trattenere gli acari caduti in seguito al trattamento. Le varroe abbattute sono state contate a cadenza giornaliera per i primi 6 giorni dalla somministrazione di Api-Bioxal®, successivamente a intervalli più ampi per un periodo complessivo di 13 giorni. Dopo tale lasso di tempo il numero di acari caduti si è ridotto notevolmente, fino quasi ad azzerarsi, si è quindi eseguito il trattamento di controllo con Apivar® e Apistan® somministrando due strisce di ciascun formulato per alveare in tutte le colonie appartenenti a entrambi i gruppi sperimentali (compreso il gruppo TNT dell'apiario comasco nel 2011). La conta delle varroe morte in seguito al trattamento di controllo, sempre conteggiando gli acari rinvenuti sui fogli adesivi, è proseguita per 42 giorni.

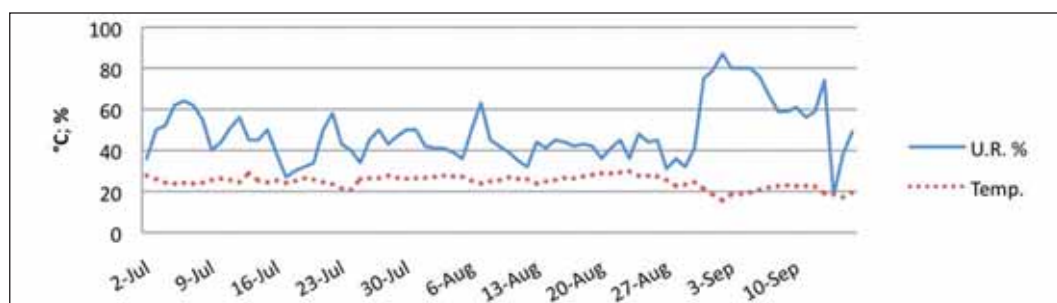
Dopo un mese dalla liberazione delle regine si è provveduto a rilevare nuovamente la quantità di covata in ciascun alveare con le modalità precedentemente descritte.

Negli alveari del gruppo GB, il favo estratto dalla gabbia è stato ispezionato in laboratorio con l'aiuto di una lente di ingrandimento e di una pinzetta. Sono state disopercolate una ad una tutte le celle su entrambi i lati, dopo ripetuti lavaggi e filtrazioni con opportuni filtri sono state contate tutte le varroe presenti.

Durante lo svolgimento della sperimentazione sono stati monitorati alcuni parametri ambientali quali temperatura e umidità relativa nei pressi degli apiari (figura 2.25 e figura 2.26).



**Figura 2.25. Parametri climatici nei pressi dell'apiario comasco durante la sperimentazione del 2011.**



**Figura 2.26. Parametri climatici nei pressi dell'apiario milanese durante la sperimentazione del 2012.**

### Risultati

Il numero di varroe rinvenute sui fogli adesivi cadute in seguito al trattamento con Api-Bioxal®, quelle abbattute dal trattamento di controllo con Apivar® e quelle estratte dai favi ingabbiati del gruppo GB sono state utilizzate per calcolare l'efficacia acaricida tramite la formula seguente:

$$\text{Efficacia \%} = \frac{V_{\text{trat}}}{V_{\text{trat}} + V_{\text{control}}} \cdot 100$$

dove:

$V_{\text{trat}}$  = varroe uccise dall'acaricida testato

$V_{\text{control}}$  = varroe uccise dal trattamento di controllo

### • Como 2011

È stata utilizzata l'analisi della varianza per misure ripetute per studiare l'effetto di alcuni fattori sul numero di varroe cadute nel tempo. I valori relativi al numero di varroe sono stati trasformati in logaritmo per rispettare l'assunto di normalità della distribuzione. È stato quindi adattato un modello misto che conteneva i fattori fissi della gabbia, della soluzione, del tempo e dell'interazione tra tempo e soluzione. Per valutare le misure ripetute è stata utilizzata una struttura della co-

varianza di tipo autoregressivo. Per questa analisi è stata utilizzata la procedura MIXED del programma SAS (2008).

È stato valutato l'effetto del tipo di gabbia sulla variabilità dell'efficacia mediante analisi della varianza utilizzando un modello fisso mediante la PROC GLM del package statistico SAS.

L'efficacia acaricida non è risultata influenzata in modo significativo ( $P > 0,05$ ) dal tipo di gabbia. Nella tabella 2.10 sono riportate le medie stimate dei fattori considerati.

A seguito della conta delle varroe estratte dai favi asportati degli alveari del gruppo GB, è stato riscontrato un elevatissimo numero di acari, a titolo di esempio è stata rinvenuta una larva di ape infestata da 13 varroe. Mediamente sono sta-

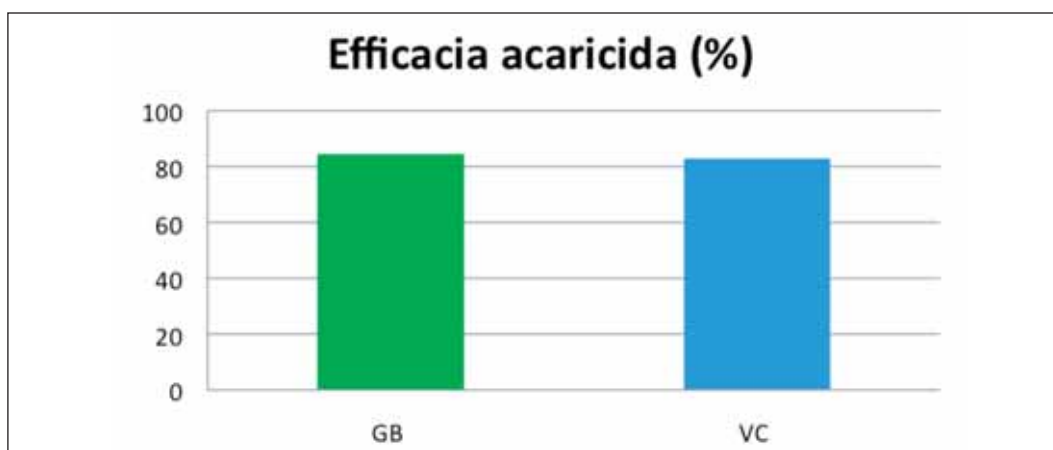
**Tabella 2.10. Efficacia acaricida: medie stimate ed errore standard.**

Gabbia	Media stimata ± Errore standard
GB	84,47 ± 2,66
VC	82,91 ± 2,66

**Tabella 2.11. Numero di varroe cadute in media al giorno nei gruppi GB e VC in seguito al trattamento con Api-Bioxal®.**

Gabbia	Media stimata ± Errore standard
GB	14,03 ± 1,19 <sup>a</sup>
VC	21,63 ± 1,18 <sup>b</sup>

Lettere diverse indicano medie che differiscono significativamente ( $P < 0,05$ ).



**Figura 2.27. Efficacia acaricida espressa come media per gruppo.**

te rinvenute 1.037 varroe per favo, con un minimo di 231 e un massimo di 4.263. Durante lo svolgimento della sperimentazione non è stata registrata la perdita di nessun alveare. Solamente alla fine del mese di novembre è stato riscontrato il decesso di 1 alveare con sintomi riconducibili alla varroosi: la colonia n° 4 appartenente al gruppo TNT. Per quanto riguarda l'accettazione delle regine è da segnalare che solo in un alveare del gruppo GB stata è riscontrata orfanità dopo il periodo di ingabbiamento.

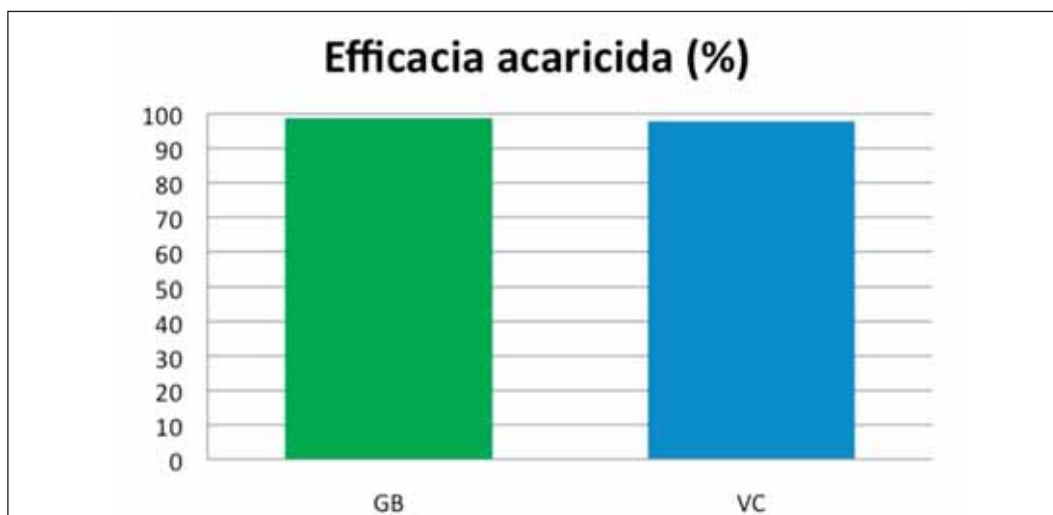
#### • Milano 2012

L'efficacia media delle gabbie è stata confrontata mediante il test di Student utilizzando il *package* statistico SAS.

I risultati dell'efficacia acaricida espressi come percentuale media per gruppi sono  $98,73 \pm 0,98$  per il gruppo GB e  $97,92 \pm 1,67$  per il gruppo VC (figura 2.28). L'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative tra i gruppi  $t = 0,08$ , GL = 10,  $P = 0,33$ .

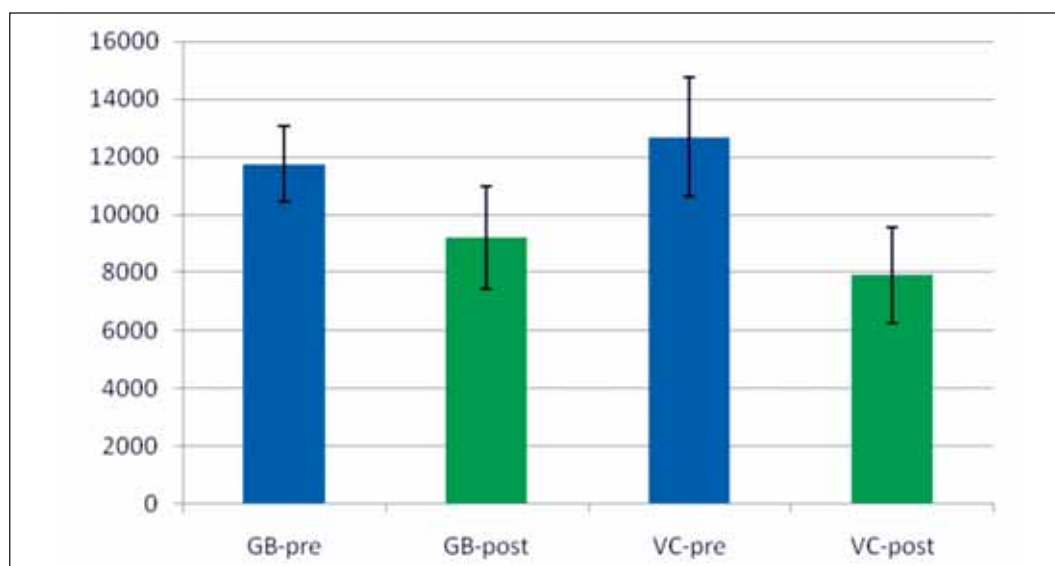
Prima dell'inizio della prova i due gruppi di alveari erano uniformi per quanto riguarda la forza delle famiglie, infatti la valutazione dell'estensione di covata ( $\text{cm}^2/\text{alveare}$ ) all'analisi statistica non ha mostrato differenze significative  $t = 2,52$ ; GL = 5;  $P = 0,33$ .

Anche alla seconda valutazione di estensione della covata, eseguita un mese dopo la liberazione delle regine non sono state riscontrate differenze statisticamente significative  $t = 1,14$ ; GL = 5;  $P = 0,88$ .



**Figura 2.28. Efficacia percentuale espressa come media per gruppo.**





**Figura 2.29. Forza delle famiglie. Quantità di covata espressa come cm<sup>2</sup>/alveare prima (istogrammi blu) del blocco di covata e un mese dopo (istogrammi verdi).**

Dal grafico in figura 2.29 possiamo osservare che l'estensione della covata rilevata prima della chiusura delle regine (istogrammi blu) i due gruppi erano uniformi in termini di superficie di covata. Si è partiti dunque da una situazione omogenea; dopo un mese dalla liberazione delle regine (istogrammi verdi) la quantità di covata è simile nei due gruppi, fatto validato dall'analisi statistica. Si può quindi affermare che l'utilizzo delle due tipologie di gabbia prese in esame, la GB® e la Var-Control®, nelle condizioni descritte, hanno avuto uguale effetto sulla ripresa della deposizione. La quantità di covata dopo un mese dalla liberazione ovviamente è inferiore a quella presente nelle colonie prima del blocco di covata, fatto del tutto normale se si considerano due aspetti: il primo è che il rilievo post trattamento è stato eseguito dopo un mese dalla ripresa della deposizione, quindi dopo un periodo di assenza totale di covata, le regine hanno avuto solo 30 giorni di tempo per ripopolare il nido mentre nel pre trattamento si partiva da una situazione di covata estesa su più favi, tipica del periodo stagionale in cui si è svolta la prova di campo. Il secondo aspetto, riguarda il calo naturale di deposizione che si verifica in tarda estate, quando negli alveari la quantità di covata regredisce notevolmente a causa del rallentamento dell'attività della regina, che porterà alla totale assenza di covata in inverno.

Durante i 21 giorni di confinamento della regine il numero medio di varroe cadute nei due gruppi di alveari (GB = 789,0 e VC = 168,8) è statisticamente significativo per  $P < 0,01$  ( $t = 1,53$ ;  $P = 0,0028$ ).

Al momento della liberazione tutte le regine erano presenti nelle rispettive gabbie, apparentemente in buono stato di salute, senza segni di sofferenza evidenti. Al termine della sperimentazione, dopo la fine dei trattamenti di controllo, tutti gli alveari presentavano la propria regina in grado di deporre una quantità di covata mediamente simile nei due gruppi. La conta delle varroe estratte dai favi asportati dagli alveari del gruppo GB, anche in questo caso ha evidenziato un elevatissimo numero di acari: mediamente sono state rinvenute 1.161 varroe per favo, con un minimo di 480 e un massimo di 1.747.

### Conclusioni

La sperimentazione ha permesso di chiarire alcuni aspetti della tecnica "blocco di covata" come trattamento tampone estivo contro la varroa. Innanzi tutto, è necessario sottolineare la buona efficacia del metodo abbinato al trattamento acaricida con Api-Bioxal® che, se

eseguito correttamente, rispettando scrupolosamente le tempistiche per la liberazione delle regine e la somministrazione del formulato, sono in grado di assicurare un idoneo decremento del livello di infestazione da varroa al fine di poter giungere al trattamento invernale in assenza naturale di covata con le famiglie in buono stato di salute. Rispetto alla sperimentazione condotta a Como nel 2011, è stata riscontrata un'efficacia maggiore nella prova milanese del 2012. È opportuno sottolineare che la tempistica di ingabbiamento, il tipo di gabbia, e l'acaricida utilizzato sono stati i medesimi. Molte potrebbero essere le cause di questa differenza: la collocazione geografica dell'apiario, così come la gestione dello stesso da parte dell'apicoltore (anche se entrambi professionisti e che da qualche anno utilizzano il blocco di covata), ma un fattore che in qualche modo può aver inciso sul risultato finale è che nella prova svolta ad agosto 2011 erano presenti anche 4 alveari testimone. Essi infatti non hanno ricevuto alcun acaricida fino al momento della somministrazione del cosiddetto trattamento di controllo con Apivar® e Apistan® contemporaneamente alle altre colonie interessate dalla prova di campo. Nella sperimentazione svolta a Milano nel 2012 i testimoni non trattati erano assenti. La presenza di famiglie d'api non trattate contro la varroa può essere una pericolosa fonte di reinfestazione anche per gli alveari gestiti in modo corretto. Si ribadisce ancora una volta l'importanza di trattare contemporaneamente tutti gli alveari dello stesso apiario al fine di evitare pericolose reinfestazioni che possono vanificare le strategie di contenimento della varroosi.

Dalla sperimentazione è emerso che entrambe le gabbie sono ugualmente idonee all'utilizzo corrente in quanto non pregiudicano la riaccettazione delle regine dopo la loro liberazione. Solo una regina, su 7 ingabbiate nel 2011 nell'apiario comasco è deceduta durante il periodo di clausura (gruppo GB), nella prova condotta nel 2012 nell'apiario milanese tutte le regine sono state riaccettate e hanno ripreso normalmente la deposizione. Di conseguenza sia che la regina abbia potuto deporre durante il periodo di confinamento (gruppo GB), sia che abbia cessato completamente la deposizione (gruppo VC), questo pare che non abbia avuto alcun effetto negativo sulle colonie, ciò è dimostrato dal fatto che gli alveari di entrambi i gruppi presentavano una quantità di covata a un mese dalla liberazione del tutto simile tra loro.

Dato l'elevato numero di varroe riscontrato nei favi racchiusi nella gabbia GB®, mediamente più di 1.000 acari/favo (ma con punte di oltre 4000 varroe), si sconsiglia di utilizzarli per formare nuclei in quanto l'infestazione è tale da non consentire in alcun modo alle famiglie neo formate di svilupparsi adeguatamente. Infatti l'attività trofica dei parassiti e le virosi da essi veicolate causano gravi danni alle api durante la sviluppo post embrionale dando origine a individui poco vigorosi e deformati. Per questo tali favi devono essere necessariamente allontanati dall'apiario ed eliminati.

Il metodo dell'ingabbiamento si è dimostrato facilmente praticabile anche se richiede una certa manualità che tuttavia è possibile acquisire con la pratica. È una strategia consigliabile a tutti gli apicoltori, anche neofiti. L'apicoltore può scegliere se utilizzare la Var-Control® o la GB® in base alla propria abilità manipolativa delle api. Chi ha buona dimestichezza può orientarsi sulla Var-Control®, che richiede un po' di esperienza per afferrare la regina delicatamente e confinarla al suo interno. Chi non ha confidenza potrebbe optare per la gabbia GB®, che consente, una volta individuata la regina, di ingabbiare delicatamente l'intero favo su cui essa si trova senza doverla necessariamente prendere in mano. Per facilitare l'operazione di individuazione delle regine risulta conveniente la pratica della marcatura che consente inoltre di risalire all'età delle regine stesse.

Si consiglia, per ingabbiare la regina con la gabbia GB®, di utilizzare favi in cui sia presente covata di età differente. In questo modo la covata sfarfallerà in modo scalare, liberando poco a poco le cellette in cui la regina potrà deporre nuovamente.

## 2.4. Soluzioni innovative: studio di espressione genica sul comportamento igienico dell'*Apis mellifera*

Caterina Cambuli, Andrea Galli

**L**a varroosi, provocata dall'acaro parassita *Varroa destructor*, è uno dei maggiori problemi nei paesi ad apicoltura evoluta. In Italia, dati recenti hanno evidenziato che questa parassitosi continua a rappresentare un fattore di elevata mortalità e comporta serie conseguenze economiche sia per i danni diretti sia per l'indebolimento della colonia con conseguente maggiore suscettibilità ad altre malattie.

I trattamenti farmacologici necessari a contenere l'incidenza del parassita incidono sui costi di produzione e non sono sempre efficaci, con conseguenti perdite economiche rilevanti per l'apicoltore; inoltre, l'uso ripetuto di acaricidi può comportare la comparsa di ceppi resistenti ai prodotti più comuni, problematica già evidenziata in diversi Paesi europei. Tali aspetti rendono fondamentale la ricerca di altre strade, parallele alla ricerca farmacologica, che consentano di ridurre l'impatto economico di questo parassita.

Una risorsa importante è data dalla selezione genetica di famiglie maggiormente resistenti all'acaro e l'individuazione di marcatori genetici che possano accelerare la selezione di una popolazione di api che riesca a convivere con il parassita.

La ricerca, sviluppata dall'Istituto Sperimentale Italiano "Lazzaro Spallanzani", parte da queste premesse e ha lo scopo di accrescere le conoscenze sugli aspetti genetici associati alla resistenza alla *Varroa* al fine di ottenere dei risultati applicativi per il miglioramento genetico delle api e accrescere le conoscenze di caratteristiche associate, anche indirettamente, alla resistenza alle patologie delle api, quali il comportamento igienico.

Lo scenario attuale, con la sequenza completa del genoma di *Apis mellifera* depositata e le innovative tecnologie che consentono di effettuare *sequencing* e *genotyping* a costi notevolmente ridotti rispetto al passato, permette di ipotizzare l'acquisizione di nuove informazioni sul genoma dell'ape e di utilizzare tali conoscenze genetiche nella selezione.

La base concettuale per fare selezione in una popolazione è data dalla presenza di variabilità nell'espressione di un determinato carattere, infatti, esistono delle differenze nella capacità delle api di tollerare l'acaro e alcune famiglie riescono a subire meno danni, rispetto ad altre, in presenza del parassita. Questa capacità è dovuta a un insieme complesso di fattori, gestionali, ambientali e genetici che rendono difficile il trasferimento e la ripetibilità negli anni di queste caratteristiche di resistenza.

Gli studi sulla genetica delle api rappresentano una strada possibile per superare queste difficoltà. Nella ricerca di marcatori genetici associati a un determinato carattere, è importante individuare una caratteristica di interesse osservabile e misurabile definita genericamente fenotipo.

L'approfondimento delle conoscenze riguardanti gli aspetti genetici ha lo scopo di individuare le informazioni associabili a un determinato fenotipo in modo da poter realmente utilizzare questa informazione nella selezione.

La ricerca sviluppata nel progetto STRANOVA si focalizza sul caratterizzare, dal punto di vista genetico, il comportamento igienico della colonia, uno degli aspetti associati alla capacità di tollerare diverse patologie delle api, compresa la varroa. In particolare, ai fini della ricerca, interessa un aspetto di questo comportamento, che consiste nella capacità delle api di individuare anomalie nelle celle di covata e nel rimuoverne il contenuto.

La misura del comportamento igienico è di interesse per gli apicoltori afferenti all'Albo degli Allevatori di Api Regine, di conseguenza evidenziare marcatori genetici associabili a questo fenotipo consente di accrescere le potenzialità della selezione.

Considerando la particolarità del "sistema colonia" che caratterizza l'apicoltura e la complessità che ne deriva nella selezione, gli studi genetici sul comportamento igienico offrono delle potenzialità interessanti, aspetto confermato dai numerosi studi a livello internazionale condotti sull'argomento.

Il modello sperimentale proposto nel progetto STRANOVA si integra con la tendenza della ricerca internazionale volta ad accrescere le conoscenze delle basi genetiche del comportamento igienico e contribuisce alla caratterizzazione molecolare di questo comportamento al fine di consentirne l'applicazione a tutela della nostra apicoltura nazionale.

### **Modello sperimentale della ricerca**

La finalità principale dell'attività di ricerca è tesa a studiare l'espressione genica coinvolta nel comportamento di rimozione, precisamente il momento in cui le api svolgono l'azione di rimuovere la covata morta.

Un ulteriore livello di confronto si proponeva di evidenziare eventuali differenze, di questo comportamento, tra alveari che presentavano un comportamento igienico elevato (famiglie Plus varianti) rispetto ad alveari che mostravano una bassa tendenza al comportamento igienico (famiglie Minus varianti). Conseguentemente il campionamento prevedeva il prelievo di soggetti rimuoventi e soggetti non rimuoventi, possibilmente in alveari Plus e Minus varianti.

### **Valutazione del comportamento igienico**

Il CRA-API, unità di ricerca Apicoltura e Bachicoltura, di Reggio Emilia, ha eseguito il test per la valutazione del comportamento igienico con azoto liquido.

I test sono stati eseguiti in 20 arnie sperimentali, ripetuti nei mesi di maggio, giugno e luglio del 2011 e in 31 arnie nei mesi di maggio e giugno del 2012.

Il test ha previsto un trattamento con azoto liquido di un'area circoscritta del telaino (figure 2.30 e 2.31) in cui era presente la covata.

La percentuale di rimozione è stata calcolata come rapporto tra il numero di celle rimosse a ventiquattro ore dal trattamento con azoto liquido rispetto al numero di celle di covata complessive presenti nell'area trattata (tabella 2.11).

**Tabella 2.11. Risultati del test del comportamento igienico nel 2011.**

Alveare	Test	Rimozione	RimAS	Alveare	Test	Rimozione	RimAS
118	1	0,44	0,46	750	1	0,88	1,08
118	2	0,66	0,72	750	2	0,50	0,52
118	3	0,88	1,08	750	3	0,36	0,37
150	1	0,82	0,96	758	1	0,90	1,12
150	2	0,79	0,91	758	2	0,73	0,82
150	3	0,42	0,44	758	3	0,63	0,68
701	1	0,94	1,22	760	1	1,00	1,57
701	2	0,84	1,00	760	2	0,64	0,69
701	3	0,51	0,53	760	3	0,63	0,68
705	1	0,36	0,37	770	1	0,84	1,00
705	2	0,47	0,49	770	2	0,81	0,95
705	3	0,62	0,67	770	3	0,92	1,18
711	1	0,78	0,89	786	1	0,88	1,08
711	2	0,53	0,56	786	2	0,28	0,28
711	3	0,30	0,30	786	3	0,67	0,73
715	1	0,86	1,04	787	1	0,16	0,16
715	2	0,40	0,41	787	2	0,50	0,53
715	3	0,87	1,06	787	3	0,62	0,67
717	1	0,92	1,17	814	1	0,96	1,29
717	2	0,84	1,00	814	2	0,54	0,58
717	3	0,65	0,71	814	3	0,67	0,74
720	1	-	-	829	1	0,92	1,17
720	2	0,88	1,08	829	2	0,36	0,37
720	3	0,48	0,51	829	3	0,75	0,85
730	1	0,92	1,17	831	1	0,98	1,37
730	2	0,89	1,10	831	2	0,70	0,77
730	3	1,00	1,57	831	3	0,74	0,83
735	1	0,84	1,00	832	1	0,18	0,18
735	2	0,65	0,71	832	2	0,39	0,40
735	3	0,88	1,07	832	3	0,47	0,49

### Analisi Statistica comportamento igienico

Al fine di evidenziare alveari con alto e basso comportamento igienico (Plus e Minus varianti), sui dati ottenuti (tabella 2.11), è stata eseguita l'elaborazione statistica. Dalle analisi effettuate non è stato possibile identificare due gruppi di alveari Plus e Minus varianti per il comportamento igienico, ma soltanto un alveare Plus variante per il comportamento igienico nel primo anno, due alveari nel secondo anno e un solo alveare Minus variante.

Tali risultati possono rappresentare una base per selezionare famiglie Plus varianti per il comportamento igienico, ma non possono essere utilizzate per il confronto nello studio di espressione genica che avrebbe richiesto la presenza di minimo tre alveari Plus varianti e tre Minus varianti.





**Figura 2.30. Area trattata con azoto liquido.**



**Foto 2.31. Campionamento presso CRA-API.**

### Campionamento ai fini dello studio di espressione

Il campionamento ha previsto il prelievo di soggetti attivi nell'azione di rimozione confrontati con soggetti che non svolgono alcuna azione. L'ape prelevata, ai fini dello studio di espressione genica, è un insetto che svolge l'azione di rimuovere il contenuto della cella e continua a eseguire il comportamento per circa 10 secondi, si verifica inoltre che all'interno sia effettivamente presente covata morta. Le api di controllo, osservate per 10 secondi, non hanno svolto alcuna azione. I campioni sono stati immediatamente immersi in azoto liquido, ai fini di assicurare un'alta qualità dell'RNA estratto, indispensabile per le analisi. Ogni campionamento ha previsto i prelievi da 5 alveari e per ogni alveare sono state prelevate almeno 5 api nell'azione di rimuovere e 5 api di controllo (figure 2.32 e 2.33).

### Risultati studio di espressione genica

Lo studio di espressione genica è stato effettuato con HiSeq 2000 Illumina®, fra le più innovative tecnologie a disposizione del mercato che permette il sequenziamento dell'RNA e ha rivoluzionato l'esplorazione dell'espressione genica, infatti consente un vasto profiling e una profonda indagine del trascrittoma.

L'allineamento delle sequenze di *Apis mellifera* ottenute ha consentito l'individuazione di 119 small RNA e il sequenziamento di oltre 10.000 geni, le sequenze sono state allineate sul genoma di riferimento di *Apis mellifera*.

Complessivamente sono stati individuati 43 geni con differenze di espressione, nella famiglia, che in fase di campionamento era in piena attività nello svolgimento del comportamento oggetto di studio e sono stati individuati geni differenzialmente espressi statisticamente significativi con "FDR p-value correction" minore di 0,05.

Tra i geni individuati nello studio di espressione genica, finalizzato a caratterizzare gli aspetti molecolari del comportamento igienico, risulta particolarmente interessante il



**Figura 2.32. Telaino.**



**Figura 2.33. Presenza di covata morta.**

gene “Obp6” che appartiene alla famiglia di geni OBP *Odorant Binding Protein* proteine che hanno la funzione di interagire in modo selettivo con qualsiasi sostanza in grado di stimolare il senso dell'olfatto. I geni della classe OBP possono essere coinvolti nell'olfatto, nel gusto, e sono genericamente coinvolti nel trasporto di molecole idrofobiche. Inoltre, queste proteine possono funzionare come vettori generali in altri processi molecolari e sono suscettibili di essere coinvolti in funzioni fisiologiche più ampie. Sono risultati espressi in modo differenziale, geni appartenenti alla classe delle TROPONINE proteine coinvolte nei processi del metabolismo muscolare. Un altro gene interessante è il gene “Carboxylesterase” che codifica per una proteina trovata espressa nelle antenne delle api associata a differenti funzioni del ciclo di vita dell'ape.

La sua espressione differenziale può essere indicativa del comportamento osservato o associato alla fase del ciclo vitale delle api che svolgono questo comportamento (*Per approfondimenti sui risultati leggere la Relazione tecnica del Progetto STRANOVA pubblicata sul sito [www.agricoltura.regione.lombardia.it](http://www.agricoltura.regione.lombardia.it)*).

## Conclusioni

La prova sperimentale ha consentito di evidenziare geni differenzialmente espressi associati al comportamento igienico e di accrescere la comprensione delle basi molecolari associate ad un comportamento delle api importante per suo contributo alla resistenza dell'alveare. Inoltre, i geni risultati differenzialmente espressi, presentano delle mutazioni puntiformi depositate che possono essere utilizzate come marcatori genetici per studiare ulteriormente il comportamento igienico. Le mutazioni presenti nei geni individuati nell'esperimento possono essere utilizzate per costruire un chip mirato, gestito con la tecnologia Open Array, disponibile presso l'Istituto Spallanzani, che consente la gestione di un elevato numero di campioni e può essere un utile strumento per l'individuazione di marcatori associati ad un migliore comportamento igienico in ampi screening sul territorio.

Il contributo applicativo per il settore apistico consiste nel poter disporre di uno strumento tecnologico che possa essere utilizzato per la valutazione delle api regine allevate sulla base di specifici piani di selezione e fecondate in appropriate stazioni di fecondazione. L'utilizzo del chip dovrà prevedere una validazione preliminare in campo con il coinvolgimento di allevatori di api regine afferenti ad associazioni istituzionali riconosciute. La validazione permetterà di verificare l'associazione tra l'attitudine al comportamento igienico e le mutazioni del chip progettato sulla base dei geni individuati nella presente ricerca. Una volta stabilita l'associazione è possibile testare geneticamente gli allevamenti di api regine che attuano piani di selezione controllati e utilizzare il chip per rendere più efficiente la selezione di linee genetiche per il miglioramento dell'attitudine al comportamento igienico. Il chip potrà essere utilizzato come ulteriore strumento che si aggiunge agli attuali metodi di valutazione standardizzati migliorando l'accuratezza della selezione. La verifica della presenza di determinati marcatori genetici direttamente sulle famiglie utilizzate nell'allevamento di api regine permetterà di avere maggiori garanzie sul trasferimento dei caratteri di interesse. L'applicazione della genomica nella selezione è già avviata nelle specie d'interesse zootecnico, lo studio delle modalità di applicazione di tali strumenti nel settore apistico faranno parte delle valutazioni per le strategie future del settore. I modelli applicativi della genomica dovranno necessariamente tenere conto della specificità del settore apistico, dei molteplici caratteri d'interesse economico per l'apicoltura, della complessità dell'alveare e delle sue interazioni con l'ambiente. Le applicazioni tecnologiche in ambito genomico potranno dare un contributo applicativo tramite il miglioramento delle tecniche di selezione al fine di preservare caratteristiche specifiche dell'*Apis mellifera ligustica* fondamentali per il settore apistico nazionale.

# Aumento della conoscenza sulla diffusione di *Nosema ceranae* in Lombardia.

## Monitoraggio di *Nosema ceranae* e *N. apis* nel territorio lombardo

Michele Mortarino

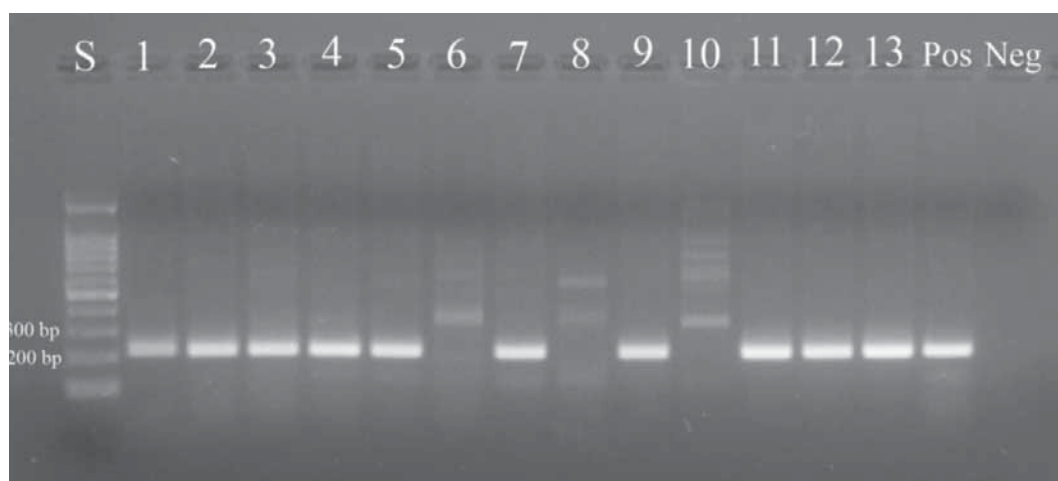
Uno degli obiettivi che il progetto STRANOVA si proponeva di investigare era la presenza e la diffusione di *Nosema ceranae* e di *Nosema apis* nel territorio lombardo. L'importanza di discriminare la specie causativa dell'infezione è in relazione al diverso quadro patologico indotto dai due microsporidi, e può suggerire interventi gestionali mirati. A tutt'oggi, l'approccio molecolare rappresenta il mezzo più affidabile, pur con i limiti riferibili alle diverse tecniche in uso, per raggiungere una determinazione di specie a partire da un numero limitato di api raccolte durante il campionamento. In particolare, le metodiche di indagine molecolare tramite PCR assicurano una più elevata sensibilità rispetto alla classica procedura di analisi microscopica. È peraltro da rilevare che le diverse tecniche molecolari attualmente in uso possono presentare alcuni limiti peculiari alle tecniche stesse, come l'indaginosità, o il costo elevato, o una determinazione solo di tipo qualitativo, o una specificità non sempre assoluta, e così via, in base al tipo di metodologia o alle condizioni di effettuazione delle analisi. Per questa ragione, il progetto ha mirato, oltre che a effettuare un'indagine epidemiologica sul territorio, anche alla messa a punto di un protocollo innovativo molecolare per la determinazione di specie di *Nosema* nelle api infette, caratterizzato da elevata rapidità e alto potere discriminativo.

### Indagine epidemiologica

L'indagine è stata condotta su una serie di 152 campionamenti effettuati in apiari del territorio lombardo a cura dei tecnici delle associazioni apistiche partecipanti nell'arco dei tre anni del progetto. Il numero dei campionamenti effettuati per ciascuna provincia e per ciascun apiario nel corso del triennio è risultato alquanto diversificato, da un minimo di 7 a un massimo di 54 campionamenti per provincia e da un minimo di 1 a un massimo di 11 campionamenti per apiario, in ragione della copertura territoriale e della frequenza di accesso alle diverse località da parte del personale tecnico delle Associazioni partner incaricato del prelievo. L'attività analitica dei campioni di api prelevati dai tecnici delle Associazioni apistiche è stata condotta in laboratorio tramite estrazione del DNA delle api seguita da tecnica molecolare (PCR convenzionale specie-specifica) per l'evidenziazione del parassita eventualmente presente e, in tal caso, della specie di appartenenza (*N. ceranae* o *N. apis*). In particolare, la fase di estrazione del DNA è stata eseguita secondo una procedura operativa ricavata sintetizzando le indicazioni rinvenibili in letteratura. Sui DNA estratti è stata quindi effettuata l'analisi di ricerca per *Nosema* mediante PCR specie-specifica il cui protocollo si è basato sulla pubblicazione di Martin-Hernandez et al., 2007, con alcune modifiche. La PCR

è stata eseguita rispettivamente con la coppia di *primers* 218MITOC-FOR e 218MITOC-FOR specifica per *N. ceranae* (banda attesa 218 bp), e con la coppia di primers 321APIR-FOR e 321APIR/REV specifica per *N. apis* (banda attesa 321 bp). La reazione è stata condotta con il protocollo termico descritto in Martin-Hernandez 2007, modificando la temperatura di annealing a 62 °C e uniformando il tempo di elongation a 30 secondi per ciascun ciclo. Ciascun campione di api raccolto nell'ambito del Progetto è stato analizzato separatamente per la ricerca delle due specie di *Nosema* tramite la rispettiva PCR specie-specifica. Nella figura 4.1 è riportato a titolo esemplificativo il risultato della PCR per *N. ceranae* condotta su 13 campioni di api (figura 3.1).

I risultati delle analisi relative alla positività per *N. ceranae*, classificati per provincia rilevante e per numero di apiari campionati, sono riportati nella tabella 4.1, da cui si evince che anche la positività a *N. ceranae* ha mostrato differenze in ragione dell'area geografica e del numero di campioni prelevati, presumibilmente in base all'andamento fluttuante dell'infezione lungo il corso dell'anno e all'effetto delle condizioni microclimatiche. In definitiva, i valori complessivi di positività dei campioni (64%) e de-

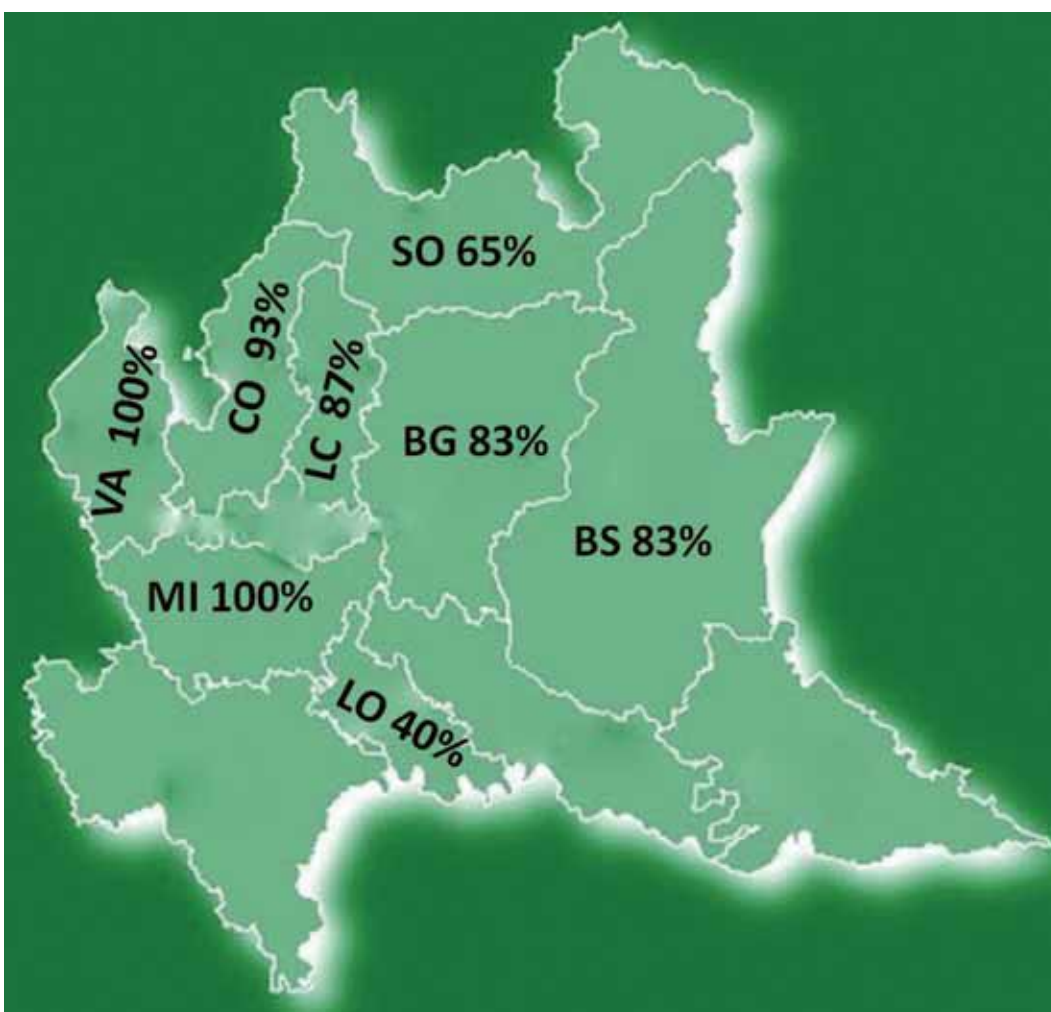


**Figura 3.1. Esempio di PCR specifica per *Nosema ceranae* condotta su campioni provenienti da 13 apiari; l'analisi risulta positiva rispettivamente nei campioni 1-5, 7, 9, 11-13 (S=100bp standard; Pos=controllo positivo; Neg=controllo negativo).**

**Tabella 3.1. Risultati dell'analisi molecolare per *Nosema ceranae* condotta in apiari delle diverse province lombarde.**

Provincia	Campioni	Campioni positivi (%)	Apiari	Apiari positivi (%)
Bergamo	6	5 (83%)	6	5 (83%)
Brescia	54	19 (35%)	18	15 (83%)
Como	19	16 (84%)	14	13 (93%)
Lecco	8	7 (87%)	8	7 (87%)
Lodi	7	4 (57%)	5	2 (40%)
Milano	12	12 (100%)	9	9 (100%)
Sondrio	22	15 (68%)	20	13 (65%)
Varese	19	17 (89%)	15	15 (100)
Altre province	5	3 (60%)	4	2 (50%)
<b>Tutte</b>	<b>152</b>	<b>98 (64%)</b>	<b>99</b>	<b>81 (82%)</b>





**Figura 3.2. Percentuale di apiari positivi a *Nosema ceranae* nelle province lombarde (nella figura sono indicate unicamente le Province con un numero sufficientemente elevato di campionamenti).**

gli apiari (82%) risultano abbastanza in linea con quanto noto a proposito dell'epidemiologia di questo parassita nelle zone endemiche (tabella 3.1 e figura 3.2).

Tutti i campioni analizzati nel corso del progetto sono invece risultati negativi per *N. apis*. Le risultanze dell'analisi condotta sui campioni raccolti nel territorio confermano quindi la diffusa presenza di *N. ceranae* nella maggioranza degli apiari lombardi testati nel corso del progetto, similmente a quanto rilevato in analoghe indagini condotte nel territorio nazionale ed estero, e parimenti la apparente assenza di *N. apis*.

Il livello di prevalenza da *N. ceranae* risulta più elevato se si considera il dato relativo agli apiari rispetto al dato relativo ai campionamenti, e questo può essere messo in relazione a un andamento altalenante dell'infezione in dipendenza dal momento stagionale, e inoltre alla disomogenea distribuzione del parassita nelle api dell'alveare, che possono portare alla negatività di un singolo campione rispetto al reale stato di positività dell'alveare.

Infatti, una buona parte degli apiari che sono stati campionati ripetutamente nel corso dell'indagine hanno mostrato un'alternanza di risultati positivi e di risultati negativi.

È infatti noto dalla letteratura che per rilevare costantemente lo stato di positività di un apiario sarebbe necessario ripetere il campionamento numerose volte durante l'anno, prelevando ogni volta un elevato numero di api, procedura peraltro poco compatibile con la pratica di campo.



## Sviluppo di una nuova metodologia di analisi molecolare basata su HRMA accoppiata a PCR *real time*

Per adottare misure di contenimento che siano efficaci e durevoli nel tempo, è necessario effettuare una precisa valutazione dell'incidenza delle diverse specie di *Nosema* negli apiari di un dato territorio.

A questo scopo è importante sviluppare delle metodiche d'identificazione certa del parassita che siano anche in grado di fornire informazioni relative all'entità dell'infezione. È noto che le attuali metodologie di indagine microscopica non sono in grado di identificare la specie di *Nosema* presente in un campione di api. Esistono a questo scopo diverse tecniche di biologia molecolare basate sull'amplificazione differenziale, simultanea o meno, del materiale genetico di *N. apis* e di *N. ceranae*, su cui basare il riconoscimento di specie ed eventualmente la quantificazione del parassita.

Le tecniche esistenti presentano comunque alcune limitazioni riguardo la specificità, la velocità di analisi, o il costo.

Nell'ambito del progetto STRANOVA ci si è quindi posti l'obiettivo di sviluppare una metodica molecolare per operare il riconoscimento di specie fra *N. apis* e *N. ceranae* in modo sensibile, specifico, veloce ed economico rispetto alle tecniche molecolari attualmente in uso.

A questo riguardo, è stato messo a punto un protocollo basato su *High Resolution Melting Analysis* (HRMA) accoppiata alla PCR *real time*.

Si tratta di una moderna tecnologia molecolare sempre più utilizzata, fra l'altro, per l'identificazione e l'attribuzione di specie quando altre tecniche di uso più comune non presentino sufficiente potere discriminativo, oppure necessitino di procedure piuttosto lunghe e costose.

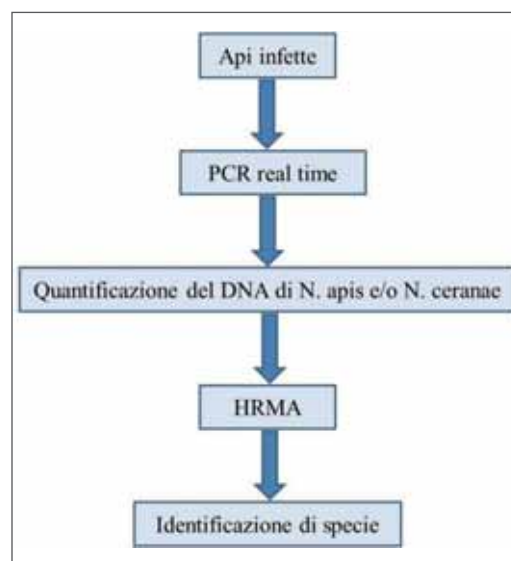
Questa tecnica presenta svariati vantaggi: possiede un'elevata sensibilità e specificità, è di facile utilizzo ed è molto flessibile.

Il riconoscimento di specie si realizza mediante il profilo HRMA dei prodotti di amplificazione della PCR *real time*, ottenuti tramite una coppia di *primers* in grado di amplificare una sequenza di DNA presente in tutte le specie bersaglio (*Nosema* sp.) con minime differenze interspecifiche, le quali conferiscono un diverso andamento al profilo di HRMA in base alla specie di appartenenza. In quanto basata su un'amplificazione mediante PCR *real time*, questa tecnica non è solamente in grado di rilevare specificamente la presenza di DNA di *N. apis* o di *N. ceranae*, ma è anche in grado di misurare la quantità del patogeno presente nel campione di api.

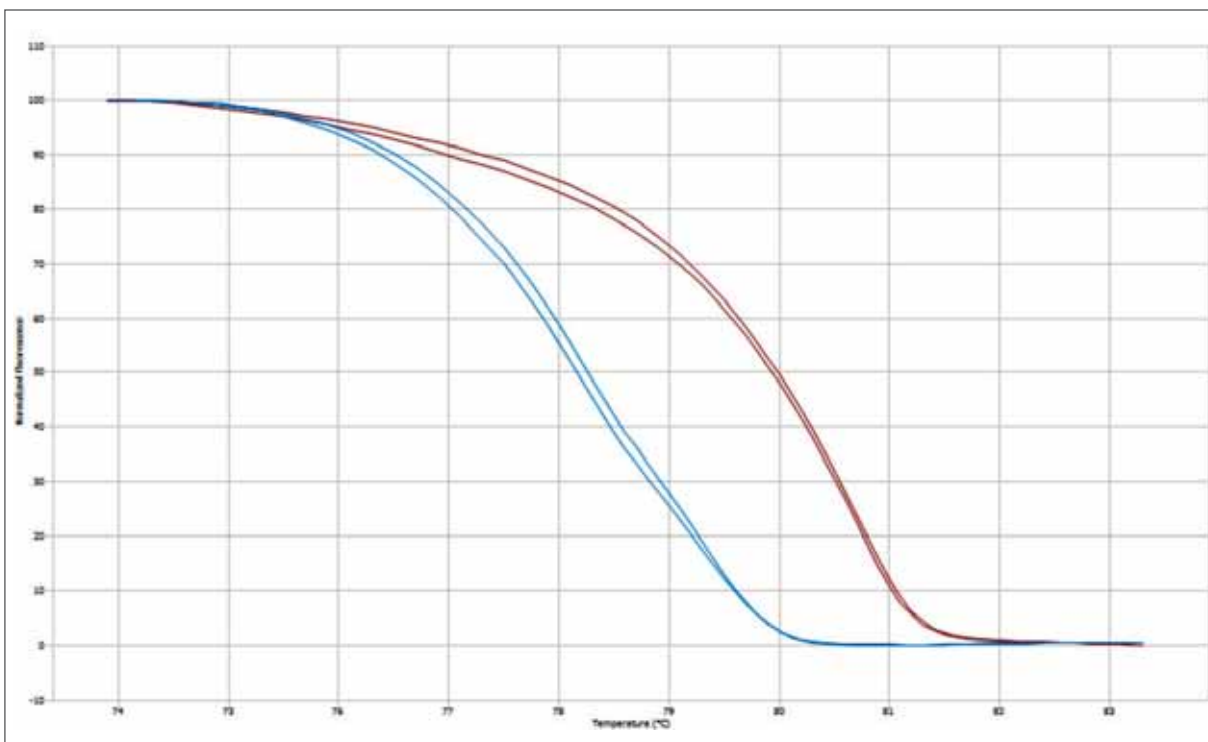
Lo schema di funzionamento dell'analisi è rappresentato in figura 3.3.

In figura 3.4, è rappresentato un esempio del potere discriminativo del metodo HRMA accoppiato a PCR *real time* nei confronti delle due specie di *Nosema* a partire da campioni di api di campo.

In conclusione, nell'ambito del progetto STRANOVA è quindi stata messa a punto un'indagine biomolecolare basata sul-



**Figura 3.3. Schema dell'analisi tramite HRMA accoppiata a PCR *real time* per l'identificazione e quantificazione della specie di *Nosema*.**



**Figura 3.4. Esempio di profilo di amplificazione del DNA di *N. ceranae* (curve blu) e di *N. apis* (curve rosse) ottenuti a partire da api infette tramite la metodologia HRMA accoppiata a PCR *real time*.**

la tecnica di *High Resolution Melting Analysis* accoppiata alla PCR *real time*, utilizzabile per il monitoraggio parassitologico di *Nosema* spp. Il progetto ha portato allo sviluppo di una metodica integrata che permette, una volta pienamente validata, di ottenere informazioni di tipo non solo qualitativo ma anche quantitativo, essendo accoppiata alla PCR *real time*.

Questo innovativo protocollo per la diagnosi molecolare di *Nosema* potrà quindi essere utilizzato sia per determinare la presenza del parassita, discriminando accuratamente tra le infezioni da *N. apis* e da *N. ceranae*, sia per valutare il grado d'infezione delle api in esame. Essendo altamente sensibile, il metodo rileva la presenza del microsporidio anche quando vi è una bassa carica dello stesso.

Questa caratteristica potrebbe essere particolarmente utile nella lotta contro la nosemiasi perchè la patologia risulta di difficile diagnosi, soprattutto nelle sue fasi iniziali. I sintomi infatti possono comparire solamente quando l'infezione assume un grado di gravità tale da provocare danni di elevata entità. La messa a punto di questa tecnica potrà permettere quindi di effettuare una diagnosi di patologia univoca, rapida e accurata che potrà essere messa a disposizione della ricerca e degli operatori apistici, consentendo di conseguenza l'attuazione di corrette azioni di prevenzione e di sanificazione.

L'innovativa tecnica biomolecolare *real time* PCR-HRMA potrà quindi essere utilizzata sul territorio per effettuare in futuro ulteriori indagini epidemiologiche relative a *N. apis* e *N. ceranae*, permettendo in questo modo di monitorare in modo più semplice ed efficace la presenza e la distribuzione di tali organismi all'interno degli apiari colpiti dalla parassitosi.

# Vademecum per gli apicoltori

Mario Colombo, Nicolò Corsi, Antonio Nanetti,  
Michele Mortarino, Lorenzo Sesso

**L**a sopravvivenza delle colonie d'api, in Italia e in Europa, è attualmente subordinata al controllo della varroosi mediante tecniche biomeccaniche e trattamenti acaricidi. Dall'introduzione del parassita in Europa la conoscenza della varroosi si è alquanto estesa, portando a sostanziali miglioramenti nelle tecniche di controllo. Inizialmente il trattamento della varroosi si limitava all'uso di sostanze di sintesi, attualmente si è giunti a un approccio integrato prevedendo anche l'uso di tecniche biomeccaniche quali il blocco o l'asportazione della covata, l'uso di molecole di origine organica quali l'acido ossalico e il timolo. Il controllo di *Varroa destructor* non deve essere inteso come una mera applicazione di un prodotto acaricida ma deve intendersi come una vera e propria strategia d'intervento che comprende diverse misure di controllo, impiegate dall'apicoltore parallelamente all'attività produttiva. Questo approccio integrato per la limitazione della varroosi prevede quindi un monitoraggio della popolazione di acari, l'uso di tecniche biomeccaniche e l'intervento appropriato con farmaci.

56

## Monitoraggio dell'infestazione e concetti d'intervento

Il numero d'acari di una colonia d'api è il risultato di tre elementi: la dinamica della popolazione del parassita, dell'ape e il controllo attuato dall'apicoltore. Elevati livelli d'infestazione senza interventi di contenimento portano quasi inevitabilmente alla perdita delle colonie. Numerosi fattori possono incrementare le popolazioni di *Varroa* a livelli tanto elevati da divenire ingestibili, quali la farmaco-resistenza agli acaricidi, le reinfestazioni e l'errata esecuzione di trattamenti. Non disponendo di strumenti adatti a una corretta lettura dei livelli d'infestazione, la scelta della strategia d'intervento è condizionata dal fatto che non si dispone di strumenti adatti a una corretta lettura dei livelli di infestazione. In effetti, l'attendibilità dei metodi diagnostici proposti non è confermata dalle verifiche sperimentali. In particolare, il "metodo dello zucchero a velo" (campionamento di api adulte, aggiunta di zucchero a velo, agitazione e conta delle varroe recuperate) non permette di prevedere né il livello d'infestazione di una colonia, né il suo tasso d'infestazione. Il più tradizionale "metodo della mortalità naturale" (raccolta e conteggio delle varroe cadute naturalmente sul fondo dell'arnia per 7-10 giorni), invece, può mettere in luce infestazioni molto elevate, ma non raggiunge la precisione necessaria per una corretta quantificazione del numero di acari presenti. Sulla base delle risultanze del progetto, mancando un riscontro di sufficiente affidabilità dei metodi di quantificazione saggiati, si raccomanda di non tenere conto di concetti d'intervento basati sulla quantificazione preventiva del grado d'infestazione, ma d'intervenire sulla base di un calendario di trattamento che tenga in considerazione i fattori biologici, tecnici e ambientali locali. Tale calendario, inoltre, deve prevedere la flessibilità sufficiente a far fronte a infestazioni elevate che si rendano manifestamente evidenti in anticipo rispetto al normale andamento (ad esempio, in base alla osservazione di un'elevata caduta naturale).

## Farmaci per il controllo di *Varroa destructor*

I farmaci per il controllo della varroosi, attualmente autorizzati e in commercio in Italia, sono Apistan®, Apivar®, ApilifeVar®, Apiguard®, Thymovar®, Api-Bioxal®, MAQS®. Tutti i prodotti, a eccezione dei primi due, sono utilizzabili in apicoltura biologica. I dati di efficacia sottoriportati per ciascun prodotto sono tratti dalla bibliografia disponibile e generalmente possono essere influenzati in base alle condizioni interne ed esterne alla colonia.

### APISTAN®

**Principio attivo:** fluvalinate in strisce plastiche da 8 g.

Apistan® è un formulato in strisce plastiche a base di fluvalinate. Due strisce vengono poste fra i favi del nido 3-4 e 7-8 e rimosse dopo 42 giorni di trattamento. L'efficacia acaricida del prodotto è del 95-99% sebbene ove vi siano forme di farmaco resistenza l'efficacia scenda al 30-50%.

La resistenza di *V. destructor* al fluvalinate è stata ampiamente segnalata dapprima in Lombardia (1991) poi in tutta Europa e negli Stati Uniti d'America.

Il fluvalinate è una sostanza non volatile, stabile ed essendo lipofila si accumula progressivamente nella cera.

### APIVAR®

**Principio attivo:** amitraz in strisce plastiche 500 mg/striscia.

Apivar® è un formulato in strisce plastiche a base di amitraz. Due strisce vengono poste tra i favi del nido, per 42 giorni. L'efficacia acaricida del prodotto è variabile tra il 70% e il 99%.

Non si registrano in Italia fenomeni di resistenza di *V. destructor*.

Amitraz è un composto lipofilo che rapidamente degrada in altri metaboliti.

### APILIFEVAR®

**Principio attivo:** timolo (76%), eucaliptolo (16,4%), mentolo (3,8%), canfora (3,8%), 20 g di principi attivi/tavoletta

ApilifeVar® è un prodotto che si presenta sotto forma di una tavoletta di Oasis®. Va somministrato spezzando la tavoletta in 3-4 porzioni, ognuna delle quali va posta sopra ai favi, alla periferia ma lontano dalla zona della covata. Richiudere l'arnia e lasciare agire per 7-10 giorni. Ripetere il trattamento illustrato per 3-4 volte, seguendo le stesse indicazioni. Rimuovere gli eventuali residui alla fine del ciclo completo di trattamenti. Va usato dopo il periodo di raccolta, dopo aver tolto i melari dalle arnie.

Effettuare il primo trattamento prelevando dalla bustina una tavoletta, spezzarla in 3-4 parti, aprire l'alveare sollevando il coperchio del nido e posizionare i pezzi ai quattro angoli sopra i listelli porta favi, lontano dalla covata posta al centro dell'arnia. Richiudere l'alveare e lasciare agire per 7-10 giorni. Ripetere il trattamento illustrato per un totale di 3-4 volte consecutive, seguendo le stesse indicazioni ed usando una tavoletta per trattamento. Rimuovere gli eventuali residui alla fine del ciclo completo di trattamenti. Effettuare il ciclo di trattamenti dopo il periodo di raccolta del miele, dopo aver tolto i melari dagli alveari.

L'efficacia di ApilifeVar® è compresa tra il 70% e il 90%.

Non sono attualmente segnalati fenomeni di farmacoresistenza.

I dosaggi prescritti danno luogo a valori molto bassi di contaminazione della cera e del miele. Il timolo non viene rimosso dalla cera con la fusione, ma i valori si riducono rapidamente dopo lo stoccaggio dei fogli cerei.

### ■ APIGUARD®

**Principio attivo:** timolo, 12,5 g per vaschetta da 50 g.

Apiguard® è una formulazione in gel a base di timolo da utilizzare a temperature superiori ai 15 °C. Una vaschetta da 50 g di prodotto deve essere posta sui favi, poi sostituita con una seconda vaschetta dopo 14 giorni.

I valori di efficacia acaricida del prodotto oscillano dal 68% al 98%. Come tutti i prodotti a base di timolo l'efficacia è parzialmente influenzata dalla temperatura ambientale.

Non si registrano segnalazioni di farmacoresistenza.

La contaminazione di miele e cera, risulta essere trascurabile.

### ■ THYMOVAR®

**Principio attivo:** timolo, è un preparato in strisce contenenti 15 g di timolo.

Thymovar® è un prodotto in strisce a base di timolo da utilizzare a temperatura comprese tra i 15 °C e 30 °C. Condurre il trattamento in due applicazioni consecutive per 3-4 settimane l'una. Utilizzare tre mezze strisce sulla parte superiore dei telaini fino alla fine del trattamento. Nelle zone molto calde mettere mezza striscia nel pomeriggio, per far abituare le api al timolo, dopo due giorni aggiungere le altre due mezze strisce. Ventilare abbondantemente. Posizionare le strisce vicine ma non a diretto contatto con la covata (distanza consigliata di 4 cm).

I valori di efficacia del prodotto oscillano da 85% a 97%. Come tutti i prodotti a base di timolo l'efficacia è influenzata dalla temperatura ambientale.

Non si registrano segnalazioni di farmacoresistenza a questo prodotto.

### ■ API-BIOXAL®

**Principio attivo:** acido ossalico biidrato 0,886 g per grammo di prodotto

L'uso dell'acido ossalico nella controllo della varroosi è da tempo noto.

Api-bioxal® è un farmaco utilizzabile mediante gocciolamento o sublimazione per il controllo di *Varroa destructor* in assenza di covata.

L'efficacia di Api-bioxal®, in assenza di covata, è superiore al 90% con risultati del 99%.

L'uso di Api-bioxal® è ottimale durante il periodo estivo, in assenza di covata indotta con tecnica biomeccanica, o invernale durante l'assenza naturale della covata.

L'uso mediante gocciolamento prevede lo scioglimento del prodotto in una soluzione zuccherina (saccarosio/acqua 1:1 p/p) e la somministrazione di 5 ml per ogni favo popolato d'api.

Si consiglia di non ripetere a breve distanza temporale le somministrazioni del prodotto per gocciolamento.

L'uso mediante sublimazione prevede di utilizzare dispositivi, solitamente elettrici, che somministrano 2,3 g del prodotto all'interno delle colonie.

Non si segnalano resistenze al principio attivo e contaminazioni di cera o miele secondo le posologie indicate.

### ■ MAQS®

**Principio attivo:** acido formico 68,2 g/striscia

Il prodotto MAQS® è stato oggetto di sperimentazione del progetto STRANOVA, ha ricevuto l'autorizzazione all'immissione in commercio in corso di scrittura del presente quaderno.

Il prodotto si presenta sotto forma di strisce da posizionare in numero di due sopra i favi del nido. Rimuovere il prodotto dopo 7 giorni.

Non si registrano fenomeni di resistenza all'acido formico.



La sostanza attiva non tende ad accumularsi nella cera, in cui produce residui generalmente transitori e di entità modesta.

## Controllo integrato della varroosi

Il controllo delle popolazioni di *V. destructor* va condotto secondo un piano di lotta integrata, ossia di un approccio combinato comprendente sostanze chimiche diverse e interventi tecnici. Questa strategia deve basarsi su un trattamento estivo e uno autunno-invernale. L'approccio integrato può realizzarsi su scala annuale – alternando interventi differenti nei vari periodi dell'anno, secondo le caratteristiche dei farmaci disponibili – e su scala più ridotta – combinando metodi diversi per definire un determinato intervento.

### Trattamento estivo

Le popolazioni di acari raggiungono in estate livelli molto elevati. D'altronde, la grande quantità di covata sottrae molte varroe all'azione acaricida delle sostanze somministrate. La difficoltà di realizzare interventi acaricidi estivi adeguatamente efficaci ha stimolato la messa a punto di metodi d'intervento basati sulla combinazione fra blocco artificiale della covata e interventi chimici, normalmente utilizzati per i trattamenti invernali.

Il metodo più importante ed efficace di questo tipo consiste nel confinamento della regina in una gabbia in modo da impedire l'ovideposizione per il tempo sufficiente allo sfarfallamento di tutta la covata, compresa quella da fuco. Dopo 25 giorni viene liberata la regina ed eseguito un intervento farmacologico di elevata e rapida efficacia. Fra i farmaci registrati in Italia, queste caratteristiche si ritrovano in Api-bioxal®, che viene quindi distribuito con la tecnica del gocciolamento.

Ne consegue un'efficacia fra il 95 e il 99%.

In alternativa si può eliminare la covata, dividendo la colonia in due sciami artificiali – uno costituito da sola covata e api che l'accudiscono, e l'altro di api adulte con regina, da trattare entrambi con Api-bioxal® separatamente. Al di là dell'indaginosità, questa tecnica comporta una forte alterazione degli equilibri interni della colonia che, specialmente nelle regioni settentrionali, può tradursi in elevate mortalità invernali, soprattutto se è condotta tardivamente.

I formulati in strisce Apistan® e Apivar® hanno spesso dimostrato limiti di efficacia, anche legati a fenomeni più o meno estesi di farmacoresistenza, mentre le prestazioni dei prodotti a base di timolo possono essere influenzate da condizioni interne ed esterne alla colonia.

### Trattamento autunno-invernale

Il secondo intervento dell'anno va eseguito in autunno-inverno, nel periodo di minima presenza o assenza di covata. La scarsità di covata favorisce l'efficacia dei prodotti acaricidi, la scelta dei quali è opportuno sia di nuovo rivolta ad Api-bioxal®. Come riporta il Quaderno della Ricerca, il Progetto STRANOVA si è occupato diffusamente di questo tipo d'intervento. L'efficacia registrata è stata del 93-95%, mentre non si sono verificati fenomeni negativi evidenti a carico delle colonie. Le risultanze del Progetto relative all'efficacia e alla tollerabilità di altri prodotti quali, ad esempio, MAQS®, pur promettenti, richiedono ulteriori conferme prima di fornire indicazioni specifiche per un uso generalizzato nel territorio lombardo.

### Metodi biotecnici

Alcuni interventi tecnici di natura apistica possono essere realizzati per contenere lo sviluppo delle popolazioni di varroa. Fra questi, l'asportazione di covata maschile, in

cui di solito è concentrata una quantità proporzionalmente elevata di parassiti, e la formazione di nuclei. Si osserva tuttavia che per la loro limitata efficacia questi vanno considerati alla stregua di interventi complementari e non sostitutivi dei trattamenti estivi e invernali suindicati.

## **Protocolli possibili nella lotta a *Varroa destructor* nel territorio lombardo**

### ***Indicazioni generali***

L'obiettivo comune, di tutti i protocolli d'intervento consigliabili, è di mantenere il livello d'infestazione delle colonie al di sotto della soglia di danno. È opportuno non superare durante tutta la stagione apistica la soglia di 3.000 acari. Per mantenere vive e produttive le colonie è importante iniziare la stagione apistica con un numero di acari per colonia inferiore a 50 e non oltrepassare la soglia di 200 acari dopo il trattamento estivo.

Le problematiche che possono rendere complesso il controllo della varroosi possono essere:

- Fenomeni di farmacoresistenza alle molecole acaricide in uso;
- Scarso coordinamento dei trattamenti acaricidi in un ambito territoriale che porta a fenomeni di reinfestazione di colonie già trattate;
- Modalità d'uso dei farmaci per la cura della varroosi non rispettate.

Il primo passo verso un corretto approccio di queste problematiche dovrebbe essere il monitoraggio dell'infestazione, per poi intraprendere le più opportune tecniche di controllo della varroosi. Considerando però i limiti evidenziati nell'ambito del progetto, si deve tenere presente che l'affidabilità del monitoraggio dell'infestazione, indipendentemente dalla tecnica utilizzata, è in realtà influenzata da molte variabili e risulta generalmente insufficiente. Come indicazione generale, vanno comunque considerati con attenzione i livelli di mortalità naturale dell'ordine di alcune decine di varroe al giorno, che in genere corrispondono a livelli d'infestazione molto elevati e che, in base alle risultanze del progetto, costituiscono l'unico parametro di relativa affidabilità.

### ***Periodo primaverile***

È consigliabile effettuare il monitoraggio dell'infestazione tramite valutazione della mortalità naturale. In caso che questa tecnica evidenzii una mortalità giornaliera di almeno 10 varroe, da questa situazione potrebbero derivare livelli di infestazione estivi difficilmente controllabili. In tale evenienza, può essere opportuno procedere con l'asportazione della covata da fuco. Si consiglia di rimuovere almeno almeno due volte.

### ***Periodo estivo***

Verso la fine di giugno è consigliabile monitorare l'infestazione delle colonie, sempre tramite valutazione della mortalità naturale. Nel caso in cui questa tecnica evidenzii una mortalità giornaliera dell'ordine di alcune decine di acari, questa potrebbe corrispondere a un livello di infestazione molto elevato che necessita di un intervento immediato con le modalità già descritte per il trattamento estivo.

### ***Periodo autunnale***

In zone con alta densità di colonie o caratterizzate da scarso coordinamento territoriale dei trattamenti, occorre considerare il rischio di reinfestazione. In tali condizioni, è possibile utilizzare il prodotto Apivar® anticipando così il trattamento invernale. In assenza di covata e di trattamenti concomitanti, è consigliabile trattare tutte le colonie con Api-bioxal® secondo modalità e posologie indicate dal produttore.

## Prodotti del Progetto

### Articoli pubblicati su riviste nazionali e internazionali

- AA.VV. (gruppo di lavoro STRANOVA) (2011) - Varroa e Nosema: l'avvio del progetto STRANOVA. APINFORMA, novembre/dicembre 2010: 4-5.
- Colombo M. (2011) - Progetto STRANOVA. APITALIA, 1/2011: 8-10.
- Colombo M., Eordegh F.R., Dobrynin N.D. (2011) - STRANOVA the new international (European) research project on the protection of bees from varroa and nosematosis. - Pchelovodstvo (Beekeeping), 6: 24-26.
- Dobrynin N.D., Colombo M., Eordegh F.R., (2011) - Comparative testing of different methods for evaluation of Varroa destructor infestation of honey bee colonies - J. Ent. Acar. Res. Ser. II, 43 (3): 323-330. <http://www.jear.it>
- Mortarino M., Colombo M. (2013) - Aggiornamenti sanitari in apicoltura: un workshop nel segno del Progetto STRANOVA, Apitalia, (3): 17-21.
- Dobrynin N.D., Colombo M., Eordegh F.R., (2013) - A comparative study of diagnostic methods for detection of Varroa destructor infestation level in honey bee (*Apis mellifera*) colonies - Acarina (21) 1:3-16; ISSN 0132-8077.
- Galli A., Cambuli C. "Uno studio genetico sul comportamento igienico nel progetto STRANOVA" - <http://www.progettostranova.it>.
- Brochure illustrativa progetto e richiesta segnalazioni resistenza agli acaricidi di varroa.

### Articoli pubblicati su atti di convegni internazionali

- Mortarino M., Corsi N., Sesso L., Legnani F., Eordegh F.R., Crotta M., Colombo M. (2012) "Comparative field study of oxalic acid in glycerol and sucrose aqueous solutions for varroa control" - Eurbee 5 edizione 2012, 5<sup>th</sup> European Conference of Apidologie, Halle an der Saale (D), P10.6: 274. [http://www.eurbee.org/Files/EurBee5\\_Abstracts.pdf](http://www.eurbee.org/Files/EurBee5_Abstracts.pdf)
- Dobrynin N.D., Colombo M., Eordegh F.R., "Examination of the accuracy of different methods for Varroa destructor population estimation in honeybee hives" Proceeding of International Conference On Pollinator Biology, Health And Policy (14-17 August 2013) Pennsylvania State University, USA: 99.

### Articoli pubblicati su atti di convegni nazionali

- Granato A., Mutinelli F., Falcaro C., Gioia G., Albonico F., Colombo M., Corsi N., Sesso L., Mortarino M. (2012) - "Preliminary investigation of Nosema spp. infection in honeybee apiaries in Northern Italy" - XXVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Parassitologia (SOIPA) 26-29 giugno, Alghero (SS): 114. <http://www.soipa.it/images/documenti/attialghero.pdf>.
- Loiacono M., Albonico F., Guidi A., Cersini A., Formato G., Corsi N., Colombo M., Mortarino M. (2014) - "High Resolution Melting Analysis coupled to real time PCR for detection and quantification of Nosema ceranae and Nosema apis in honey bees" XXVIII Congresso

Nazionale della Società Italiana di Parassitologia (SOIPA) 24-27 giugno, Roma P07.5 : 330. <http://www.soipa.it/images/documenti/attisoipa2014.pdf>.

### Poster

- "Preliminary investigation of Nosema spp. infection in honeybee apiaries in Northern Italy" XVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Parassitologia (SOIPA) - Alghero (SS) 26-29 giugno 2012. (Granato A., Mutinelli F., Falcaro C., Gioia G., Albonico F., Colombo M., Corsi N., Sesso L., Mortarino M.).
- "Comparative field study of oxalic acid in glycerol and sucrose aqueous solutions for varroa control", Eurbee 5 edizione 2012, 5<sup>th</sup> European Conference of Apidologie, Halle an der Saale (D), (Mortarino M., Corsi N., Sesso L., Legnani F., Eordegh F.R., Crotta M., Colombo M.).
- "Examination of the accuracy of different methods for Varroa destructor population estimation in honeybee hives" - International Conference On Pollinator Biology, Health And Policy (14-17 August 2013) Pennsylvania State University, USA.
- "High Resolution Melting Analysis coupled to real time PCR for detection and quantification of Nosema ceranae and Nosema apis in honey bees" XVIII Congresso Nazionale della Società Italiana di Parassitologia (SOIPA) (24-27 giugno 2014, Roma).

### Poster per convegno finale

- Nanetti A., Russano S., Cabbri R. - "Stima dell'infestazione da varroa col 'metodo dello zucchero a velo'.
- Dobrynin N.D., Colombo M., Eördegh F.R. - "Examination of the accuracy of different methods for Varroa destructor population estimation in honeybee hives".
- Colombo M., Corsi N., Eördegh F.R. - "Prova comparativa di due gabbie per il blocco di covata estivo".

### Eventi, Incontri divulgativi finali/giornate di studio organizzati per presentazione risultati

- Workshop [http://www.veterinaria.unimi.it/Facolta/1785\\_ITA\\_HTML.html](http://www.veterinaria.unimi.it/Facolta/1785_ITA_HTML.html)
- Convegno apistico "Risultati del progetto regionale STRANOVA": nuove strategie di controllo della varroa, Villa Recalcati, Varese 7 febbraio 2014.
- Seminario di aggiornamento tecnico e professionale per le aziende realizzato ai sensi del Reg. CE 1234/2007 Regione Lombardia - "Il Progetto STRANOVA" Sala riunioni Api Sondrio Società Cooperativa (SO) 21 febbraio 2014;
- Convegno apistico "Varroa: ricerca e prove in campo a servizio degli apicoltori" - Museo di Scienza, Brescia 28 febbraio 2014.
- Convegno finale previsto per presentazione risultati dei tre anni di ricerca presso Fondazione Centro Lombardo per l'Incremento della Floro-Orto-Frutticoltura - Scuola di Minoprio (CO) 17 ottobre 2014.

**Comunicazioni orali o in forma di poster in corsi di aggiornamento, incontri tecnici, convegni**

Nicolò Corsi - Convegno nazionale "Api e Apicoltura: le sfide del futuro" - Il Progetto STRANOVA. Senato della Repubblica, Roma, 25 febbraio 2011.

Michele Mortarino - "Il Progetto STRANOVA" Convegno nazionale Apimell 2011 - Piacenza 5 marzo 2011.

Michele Mortarino - seminario d'aggiornamento tecnico "Il controllo biotecnologico della varroasi": sperimentazione effettuata nell'ambito del Progetto STRANOVA, Varese. 8 marzo 2011.

Lorenzo Sesso - Sesto incontro di aggiornamento professionale per le Aziende Apistiche - "Le nuove frontiere della ricerca nella lotta alla varroa", il Progetto STRANOVA. Sala conferenze della comunità Montana Valtellina di Sondrio (SO) 22 marzo 2011; <https://www.youtube.com/watch?v=xeEXVDCNh0&index=13&list=PL85D9OVYPCQJfNLWJ6hE8PhSjMSJQhXeE>.

Antonio Nanetti - "Attualità sulla varroosi - Nuove strategie di controllo e uso improprio delle molecole antivarroa". Evento formativo "Problematiche sanitarie di attualità in apicoltura", 20 ottobre 2011, Ist. Zooprofilattico Sperim. Lombardia ed Emilia-Romagna, Brescia.

Nicolò Corsi - "Progetto STRANOVA: ricerca di nuove strategie di trattamento delle patologie apistiche" Incontro indetto da APACL Como presso la sede AVIS 5 novembre 2011, Como.

Antonio Nanetti - Approfondimento sulle malattie delle api. 5 novembre 2011 Castelfranco Emilia.

Lorenzo Sesso - Intervento a cura dell'Apa Varese al seminario a titolo "Biologia e patogenicità di *Varroa destructor* Anderson e Trueman, metodi di controllo, malattie della covata". Organizzato dalla Comunità montana valli del Verbano, 16 novembre 2011, Laveno Mombello.

Antonio Nanetti - "Attualità sulla varroosi - Nuove strategie di controllo e uso improprio delle molecole antivarroa". Evento formativo "Problematiche sanitarie di attualità in apicoltura", Ist. Zooprofilattico Sperim. Lombardia ed Emilia-Romagna, Sezione di Modena, 2 dicembre 2011.

Antonio Nanetti - "Aggiornamenti sul controllo della varroa". Seminario dell'Associazione Produttori Apistici della Provincia di Varese: "Varroatosi e nosemiasi", 18 febbraio 2012 Varese.

Antonio Nanetti - "Sperimentazioni in atto all'interno del Progetto STRANOVA: stato attuale della ricerca". Seminario dell'Associazione Produttori Apistici della Provincia di Varese: "Varroatosi e nosemiasi", 18 febbraio 2012 Varese.

Antonio Nanetti - Recenti esperienze sul controllo della varroa. Relazione ad assemblea dell'Associazione Apicoltori Felsinei, 25 febbraio 2012, Zola Predosa (BO), (CRA-Api).

Antonio Nanetti - La varroosi e il suo controllo. Lezione all'evento formativo per veterinari della Società Italiana di Medicina Veterinaria Preventiva: "Impianto normativo comuni-

tario; prospettive e criticità nei vari settori produttivi", 27 febbraio-3 marzo Folgaria (TN).

Nicolò Corsi - "Aggiornamento del Progetto STRANOVA: prove a confronto fra ossalico in soluzione con glicerolo e saccarosio"; "Apicoltura: quale futuro?". ANII - Apimell 2012, 3 marzo 2012, Piacenza.

Antonio Nanetti - Stato dell'arte nella gestione di varroa e *Nosema ceranae*. Lezione al Corso organizzato dall'Azienda USL di Imola: "La produzione del miele: aspetti sanitari e normativi", 10 marzo 2012 Imola (BO).

Antonio Nanetti - New methods for an efficient control of varroa mite infestations. Intervento al Professional seminar of Slovenian Beekeepers' Association on "Aspects of bee health and safe honey bee products". 7 marzo 2012 Celje (Slovenia).

Antonio Nanetti - Varroosi (*Varroa destructor*) Biologia, rapporto ospite/parassita, controllo. Lezione al "Corso di aggiornamento in patologia dell'alveare" del Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura - Unità di ricerca di apicoltura e bachicoltura (CRA-API), 21 marzo 2012, Bologna.

Antonio Nanetti - Il controllo della varroosi. Lezione al Corso master di secondo livello dell'Università di Pisa: "Patologia apistica ed apidologia generale", 24 marzo 2012 Pisa.

Nicolò Corsi - "Lotta alla varroa: primi risultati prove estive 2012" - Agrinatura, 29 Aprile 2012, Erba (CO).

Antonio Nanetti - Novità sui trattamenti contro la varroa. Alma Mater Studiorum: Le api dalle molte virtù, 25 maggio 2012, Ozzano dell'Emilia.

Granato A., Mutinelli F., Falcaro C., Gioia G., Albonico F., Colombo M., Corsi N., Sesso L., Mortarino M. - Preliminary investigation of *Nosema* spp. infection in honeybee apiaries in Northern Italy, XXVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Parassitologia (SOIPA) 26-29 giugno 2012 Alghero (SS).

Mortarino M., Corsi N., Sesso L., Legnani F., Eördégh F.R., Crotta M., Colombo M. - Comparative field study of oxalic acid in glycerol and sucrose aqueous solutions for varroa control, Eurbee 5 edizione 2012, 5<sup>th</sup> European Conference of Apidologie, 3-7 settembre 2012 Halle an der Saale (D).

Mortarino M., Colombo M., Corsi N., Nanetti A. - Workshop dal titolo "Aggiornamenti sanitari in apicoltura" 21 settembre 2012, Lodi.

Antonio Nanetti - "Control de varroa con ácido oxálico en combinación con la interrupción artificial de la puesta de cría". Il Congreso Ibérico de Apicultura, 18-20 ottobre 2013, Guadalajara.

Nicolò Corsi - "Le tecniche di lotta biomeccanica alla varroasi: nuove acquisizioni dal progetto STRANOVA. Incontro presso APA Varese - 11 novembre 2012 Tradate.

Nicolò Corsi - "Lotta alla varroa: blocco di covata e acido ossalico. Sperimentazione nell'ambito del progetto STRANOVA" a cura di APACL, 15 Febbraio 2013, Gravedona (CO).

- Antonio Nanetti - Corso base per esperti apistici della Regione Veneto. Malattie dell'alveare "Varroosi e Nosemosi" 16 febbraio 2013 Padova.
- Antonio Nanetti - Approfondimento tecnico divulgativo rivolto agli apicoltori biologici, "Vecchie e nuove malattie delle api: varroosi e nosemosi" 21 febbraio 2013 Spilamberto (MO).
- Francesco Legnani - "Lotta alla varroa: blocco di covata e acido ossalico. Sperimentazione nell'ambito del progetto STRANOVA" a cura di APACL, 22 febbraio 2013, Cagno (CO).
- Antonio Nanetti - Convegno dell'associazione apicoltori di Rimini e Montefeltro "Varroasi: stato delle conoscenze e organizzazione del piano di lotta" 23 febbraio 2013, Rimini.
- Antonio Nanetti - "Attività del CRA-Api all'interno del Progetto STRANOVA" - in: Progettiamo l'Apicoltura del futuro. Patologie dell'alveare, Inquinamento ambientale, Antibiotici, commercializzazione. Ecco le sfide del Terzo millennio che non siamo ancora riusciti a risolvere - Apimell 2013, 2 Marzo 2013 Piacenza Expo;
- Antonio Nanetti - Corso per esperti apistici "Varroosi" 11-15 marzo 2013, Bologna.
- Antonio Nanetti - Convegno APAT "Vecchie e nuove malattie delle api: varroa e nosema" 28 aprile 2013, Treviso.
- Antonio Nanetti - "Trattamenti in apicoltura", Corso Il superorganismo ape: biologia e patologie: Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie UNIBO 6 maggio 2013, Bologna.
- Antonio Nanetti - Nuove acquisizioni sulle malattie parassitarie delle api. Azione formativa Le nuove frontiere dell'apicoltura 15 giugno 2013, Pescantina (VR).
- Dobrynin N.D., Colombo M., Eördegh F.R. - "Examination of the accuracy of different methods for *Varroa destructor* population estimation in honeybee hives" International Conference On Pollinator Biology, Health And Policy (14-17 August 2013) Pennsylvania State University, USA.
- Antonio Nanetti - "New methods for effective varroa control", Apimondia Beekeeping Congress in Banja Luka: "New methods for effective varroa control", Banja Luka (Republika Srpska), 1-4 November 2013.
- Antonio Nanetti - "Varroosi", Corso per esperti apistici: "Varroosi", 8 novembre 2013 Collesano (PA).
- Antonio Nanetti - "Varroosi", Corso di patologia delle api Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura CRA-API Unità di Ricerca di Apicoltura e Bachicoltura, 18-21 novembre 2013, Bologna.
- Loiacono M., Albonico F., Guidi A., Cersini A., Formato G., Corsi N., Colombo M., Mortarino M. - "High Resolution Melting Analysis coupled to real time PCR for detection and quantification of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees" XXVIII Congresso Nazionale della Società Italiana di Parassitologia (SOIPA) 24-27 giugno 2014, Roma. <http://www.soipa.it/images/documenti/attisoipa2014.pdf>.

Link: <http://www.progettostranova.it>.

## Bibliografia consultata

### VARROA

- AA.VV. Coordination in Europe of integrated control of Varroa mites in honey bee colonies - Appendix VI, Final Technical Report for the period from 98-01-01 to 99-12-31.
- Bacandritsos N., Nanetti A., Papanastasiou I., Saitanis C. 2005 - Studio comparativo su sei formulati contenenti timolo nel controllo di *Varroa destructor* (Anderson & Truman) in Grecia. *Apoidea* 3(2):126-133.
- Baggio A., Arculeo P., Nanetti A., Mutinelli F., Marinelli E. 2004 - Field trials with different thymol-based products for the control of varroosis. *American Bee Journal* 144(5): 395-400.
- Besana A.M., Baracani G., Nanetti A. 2008 - Evaluation of oxalic acid treatments in summer against *Varroa destructor*. *Proc. 3rd European Conference of Apidology*, Belfast, 8-11 September 2008: 8.
- Bogdanov S. 2006 - Contaminants of bee products. *Apidologie*, 37 (1): 1-18.
- Bowen-Walker P.L., Gun A. 2001 - The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 101: 207-217.
- Branco M.R., Kidd N.A.C., Pickard R. 2006 - A comparative evaluation of sampling methods for *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) population estimation, *Apidologie* 37: 452-461.
- Bressan G., Macrì S., Nanetti A. 2012 - Api-Bioxal, a new drug for the control of varroa mite. *Proc. 5th European Conference of Apidology*, Halle (Saale), 1-3 Sept. 2012: 219.
- Charrière J.D., Imdorf A., Bachofen B., Tschan A. 2003 - The removal of capped drone brood: an effective means of reducing the infestation of Varroa in honey bee colonies. *Bee World*, 84 (3): 117-124.
- De Jong D., Goncalves L.S. 1982 - Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *V. jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research* 21: 165-167.
- Floris I., Prota R. 1993 - Preliminary results of field trials in north Sardinia using Apistan to control *Varroa jacobsoni*. *Apicoltura Moderna* 84(5): 179-184.



- Formato G. 2011 - Strategie di lotta a *Varroa destructor*. Corso pratico teorico "Patologia apistica: prevenzione, diagnosi e controllo", IZS Lazio e Toscana, 18-20 Oct. 2011, Roma, Italy.
- Gonzalez-Gomez G., Otero-Colina G., Villanueva-Jimenez J. A., Pea-Valdivia C.B., Santizo-Rinco J.A. 2012 - Repellency of the oily extract of neem seeds (*Azadirachta indica*) against *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Experimental and Applied Acarology* 56: 261-270.
- Gregorc A., Planinc I. 2001 - Acaricidal effect of oxalic acid in honeybee (*Apis mellifera*) colonies, *Apidologie* 32: 333-340.
- Imdorf, A., Charriere J. D., Maquelin C., Kilchenmann, V., Bachofen B. 1996 - Alternative varroa control. *American Bee Journal* 136(3): 189-19.
- Laboratorio Apistico Regionale c/o Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali Università di Udine 2012 - Il Piano di Lotta alla varroa nel 2012 in Friuli Venezia Giulia.
- Lodesani M., Colombo M., Spreafico M. 1995 - Ineffectiveness of Apistan treatment against the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in several districts of Lombardy (Italy). *Apidologie* 26(1): 67-72.
- Milani N. 2001 - Activity of oxalic and citric acids on the mite *Varroa destructor* in laboratory assays. *Apidologie* 32(2): 127-138.
- Milani N., Nazzi F., Greatti M. 1992 - The reinfestation of apiaries after the treatments: a frequent cause of failure in the control of *Varroa jacobsoni*. *Experimental & Applied Acarology* 16: 279-286.
- Nanetti A., Büchler R., Charriere JD, Fries I, Helland S, Imdorf A. 2003 - Oxalic acid treatments for varroa control (Review). *Apiacta* 38: 81-87.
- Nanetti A., Besana A., Romanelli R., Baracani G., Galuppi R. - 2011 - Api-Bioxal (acido ossalico) e blocco dicovata nel trattamento estivo contro la varroosi. *Apitalia* 37(7): 51-54.
- Nanetti A., Martini A., Tampieri M.P., Besana A., Rovida A., Raschi A. 2005 - A comparison between different oxalic acid treatments in overwintering honey bee colonies affected by *Varroa destructor* Anderson & Trueman. *Proc. XXXIX Int. Apimondia Congr.*, Dublin, Ireland, 21 - 26 Aug. 2005: 122.
- Nanetti A., Russano M., Cabbri R. 2014 - Performance of sugar dusting in predicting the infestation level of *Varroa destructor*. *Proc. 6th European Conference of Apidology*, Murcia, Spain, 9-11 September 2014 (accepted for oral presentation).
- Pietropaoli M., Giacomelli A., Scholl F., Formato G. 2013 - L'ingabbiamento della regina. *Apitalia* 11: 8-10.
- Rademacher E., Harz M. 2006 - Oxalic acid for the control of varroosis in honey bee colonies - a review. *Apidologie* 37(1): 98-120.
- Rosenkranz P., Aumeier P., Ziegelmann B. 2010 - Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* (103), Supplement: S96-S119.
- Spreafico M., Eördegh F.R., Bernardinelli I., Colombo M. 2001 - First detection of strains of *Varroa destructor* resistant to coumaphos. Results of laboratory tests and field trials. *Apidologie* 32(1): 49-55.
- Wallner K. 1999 - Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie* 30 (2-3): 235- 248.

## NOSEMA

- Botías C., Martín-Hernández R., Barrios L., Meana A., Higes M. 2013. *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera*iberiensis) at the colony level. *Vet Res* 44, 1-15.
- Dainat B., van Engelsdorp D., Neumann P. Colony collapse disorder in Europe. *Environmental Microbiology Reports* 2012, 4:123-125.
- Fries I., 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 103, Supplement, S73-S79.
- Higes M., Martín-Hernández R., Botías C., Bailón E.G., González-Porto A.V., Barrios L., del Nozal M.J., Bernal J.L., Jiménez J.J., Palencia P.G., Meana A. 2008 - How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology* 10, 2659-2669.
- Higes M., Martín-Hernández R., Meana A. 2006 - *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology* 92(2): 93-95.
- Higes M., Meana A., Bartolomé C., Botías C., Martín-Hernández R. 2013 - *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21<sup>st</sup> century honey bee pathogen. *Environmental Microbiology Reports* 5, 17-29.
- 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.J. 2007 - Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* 96, 1-10.
- Office International des Epizooties (OIE) 2008. *Nosemosis of honey bees* [WWW Document]. URL [http://www.oie.int/eng/normes/manual/2008/pdf/2.02.04\\_NOSEMOSIS.pdf](http://www.oie.int/eng/normes/manual/2008/pdf/2.02.04_NOSEMOSIS.pdf).
- Martín-Hernández R., Meana A., Prieto L., Salvador A.M., Garrido-Bailón E., Higes M. 2007 - Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 6331-6338.





**Regione Lombardia**  
Agricoltura

Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura  
[www.agricoltura.regione.lombardia.it](http://www.agricoltura.regione.lombardia.it)