

**Relazione Tecnica conclusiva della AZIONE B2, Regolamento 1308/2013/CE: Indagini sul campo finalizzate all'applicazione di strategie di lotta caratterizzate da basso impatto chimico sugli alveari.**

**Progetto APIMARCHE 2021: Stazioni di monitoraggio e sorveglianza in apicoltura; Rete Apistica Regionale (RAR).**

**A cura di Stefano Gavaudan e Alessandra Di Donato**

Centro bi regionale malattie trasmesse da vettori e malattie degli animali selvatici

Struttura Complessa Diagnostica Marche

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "T.Rosati"

### **Andamento della Stagione Apistica 2021**

La stagione apistica 2021, dopo una ottima partenza ad inizio primavera che ha favorito la crescita e la popolosità delle famiglie e di conseguenza il loro potenziale produttivo, ha subito un repentino arresto a causa di un brusco peggioramento delle temperature che hanno danneggiato irrimediabilmente le fioriture primaverili e compromesso in molti casi anche quelle estive. Il danno che ne è conseguito non si è limitato a compromettere le rendite aziendali, ma ha avuto ripercussioni anche in termini di salute delle colonie, condizione che gli apicoltori hanno tentato di limitare il più possibile ricorrendo alla nutrizione artificiale con somministrazione di grandi quantitativi e per lunghi periodi di sciroppo o candito o miele. Occorre considerare che l'efficienza del sistema immunitario dell'ape è strettamente legata allo stato nutritivo delle colonie ed alla disponibilità di adeguate risorse energetiche (nettare) e proteiche (polline) tanto in termini quantitativi quanto in termini qualitativi. Pertanto le caratteristiche ambientali dell'area di bottinamento e climatiche condizionano fortemente la suscettibilità del singolo individuo e del super organismo ai più svariati patogeni. In uno scenario piuttosto drammatico, che tende a ripresentarsi periodicamente in questi ultimi anni, nel quale le condizioni climatiche avverse mettono in crisi le aziende apistiche, la presenza di una Rete di Monitoraggio e Sorveglianza, costituita da apiari sentinella monitorabili da remoto, consente di effettuare registrazioni oggettive dei fenomeni in atto, su cui basare le strategie migliori per limitare le perdite tanto in termini produttivi quanto di capitale.

In un contesto di particolare fragilità di un settore che si trova a fronteggiare rese che si riducono di anno in anno, la diffusione di nuovi patogeni (*Nosema ceranae*, virosi, *Aethina tumida*, *Vespa velutina*) e la recrudescenza di problematiche sanitarie storicamente note (Peste Europea ed Americana, micosi ed avvelenamenti) sottolineano la necessità di affiancare alla Comunità degli apicoltori e delle Associazioni che insistono sul territorio degli interlocutori in grado di fornire supporto e consulenza tecnico-scientifico specialistica capace di dare risposte obiettive e certe, in quanto basate sull'utilizzo di metodiche standardizzate, riconosciute a livello internazionale, su cui basare strategie di lotta razionali. La varroatosi rappresenta ad oggi la principale problematica

sanitaria in grado di determinare importanti perdite di redditività e di capitale portando alla scomparsa, al termine della stagione, un elevato numero di famiglie.

Le percentuali sempre maggiori di colonie che vanno incontro a collasso per PMS (*Parasitic Mite Syndrome*) denunciano la crescente difficoltà nella gestione in campo della parassitosi e indicano la necessità di una evoluzione culturale richiesta alla comunità degli apicoltori, che devono necessariamente abbandonare l'abitudine di affidarsi esclusivamente ai metodi empirici (ovvero i trattamenti a calendario) acquisendo l'abitudine e le competenze tecniche che permettano di individuare i momenti migliori per effettuare trattamenti calibrati sulla specifica realtà aziendale e pedoclimatica. Di grande importanza è infatti la necessità di *coordinare i trattamenti acaricidi su base territoriale* (così come raccomandato dal Piano Annuale del Ministero della Salute), in maniera tale da ridurre i fenomeni di re infestazione legati alla deriva delle api tra alveari e apiari contigui.

In continuità all'azione di monitoraggio su stazioni High-Tech (Smart Arnie) attivate nel territorio regionale avviata nella stagione apistica 2020, anche nel 2021 l'IZSUM ha coordinato gli apicoltori coinvolti elaborando ed emanando un *bollettino Varroasi* a cadenza trimestrale finalizzato a fornire un riferimento sull'andamento della parassitosi a tutti gli apicoltori del territorio.

La protezione dell'*Apis mellifera*, non solo in funzione del suo ruolo produttivo, ma soprattutto in quanto elemento essenziale ai fini della tutela della biodiversità, in linea con l'orientamento dell'Unione Europea, passa necessariamente per la difesa delle sue *caratteristiche genetiche* che hanno sostenuto il suo perfetto adattamento all'ambiente nel quale è inserita. La valutazione della deriva genetica soprattutto in aree vocate, per idonee caratteristiche orografiche o in quanto circostanti ad allevamenti di api regine Ligustiche certificate, alla tutela degli ecotipi locali nonché la messa a punto di un metodo alternativo all'analisi morfometrica per l'identificazione di sottospecie di *Apis mellifera* sono due ulteriori obiettivi che hanno caratterizzato l'attività del 2021. L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche in un'ottica di collaborazione con le associazioni del territorio, i Servizi Veterinari delle ASL e numerosi altri enti partner (IZSLT, IZSVe, CREA-Api, UNICAM, Fondazione E.Mach), si propone come il punto di riferimento tecnico-scientifico per il territorio di competenza promuovendo programmi di sorveglianza sanitaria innovativi che richiedono il ricorso al *Laboratorio di Apicoltura* per il controllo razionale delle problematiche del settore. Grazie ai finanziamenti previsti per l'apicoltura dal Bando OCM-Miele-Sottoazione B2 per l'annata apistica 2021, l'IZSUM ha operato nell'ottica di rafforzare la diagnostica di laboratorio e di campo nel settore apistico, offrendo un *supporto diagnostico e scientifico* gratuito di alto livello a tutti gli apicoltori iscritti alla BDA e ha implementato la *Rete di Sorveglianza* attiva rivolta verso gli insetti esotici (in particolare *Vespa velutina*) a rischio introduzione e ha rafforzato la sorveglianza inerente al piano sanitario nazionale di sorveglianza dell'*Aethina tumida*.

## Principali azioni svolte

L'attività di Sorveglianza Sanitaria Attiva, ivi incluso il monitoraggio della varroatosi, è stata condotta sulle stazioni di monitoraggio attivate nella Regione Marche nel 2020 e collocate per fasce (costiera, medio-collinare, pedemontana-montana) meteoclimatiche.

Rispetto alle stazioni attivate nel 2020 sono state modificate alcune collocazioni fronte della mutata disponibilità di alcuni apicoltori a partecipare al progetto. Di seguito una tabella con le denominazioni alfanumeriche e le corrispondenti ubicazioni per provincia e fascia meteoclimatica:

 <b>ZONA METEOCLIMATICA COSTIERA</b>	 <b>ZONA METEOCLIMATICA COLLINARE</b>	 <b>ZONA METEOCLIMATICA MONTANA</b>
Apiario PU01: Terre Roveresche (PU) Apiario AN04: Ancona (AN) Apiario MC08: Potenza Picena (MC) Apiario FM11: Monte Urano (FM) Apiario AP14: Campofilone (FM)	Apiario PU02: Isola del Piano (PU) Apiario AN05: Corinaldo (AN) Apiario MC09bis: Airolo (MC) Apiario MC09: Tolentino (FM) Apiario FM12: Montottone (FM) Apiario AP15: Offida (AP)	Apiario PU03: Carpegna (PU) Apiario AN06: Fabriano (AN) Apiario MC10: Muccia (MC) Apiario MC10bis: Sarnano (MC) Apiario FM13: Amandola (FM) Apiario AP16: Acquasanta Terme (AP)

Figura 1: Stazioni di monitoraggio suddivise per province e fasce meteoclimatiche.

Ogni Stazione di Monitoraggio (SM), è caratterizzata da un alveare con una famiglia di buona consistenza, dotata di una doppia bilancia con sensore bio-mimetico inserito all'interno dell'alveare (*Hivetech*<sup>®</sup> 3Bee) in grado di rilevare con cadenza oraria le variazioni di peso, temperatura, umidità interna e rumore, effettuando un invio dati giornaliero al server. L'andamento, monitorabile da remoto grazie ad un'App (3BeeApp), ha permesso di seguire in tempo reale l'attività della colonia inserita nella "Smart Arnia".

Tale azione ha permesso di fornire i *dati oggettivi di produzione* ad ASSAM utilizzabili per effettuare una stima del danno produttivo e su cui motivare *azioni di sostegno economico* al settore da parte della Regione Marche.

Le rilevazioni della produttività nelle SM sono state affiancate dalle determinazioni periodiche di tipo sanitario di seguito specificate:

- Determinazione di campo mensile del *tasso di infestazione da Varroa destructor* tramite il metodo dello zucchero a velo (ZAV), effettuato con un Kit specifico. A disposizione degli

apicoltori è stato fornito un protocollo operativo (Allegato 1) per l'esecuzione del test nonché un video-tutorial di riferimento disponibile nel sito istituzionale. Il metodo ZAV, pur avendo una sensibilità limitata sotto soglie di infestazione dell'1% (Lee et al.,2010), è stato scelto in quanto permette di effettuare direttamente dall'allevatore la valutazione quantitativa del livello di infestazione, non dovendo necessariamente ricorrere al laboratorio.

- Determinazione mensile del livello di infestazione da *Nosema spp.* in un campione di 100 api bottinatrici prelevate e immediatamente inviate al laboratorio attraverso il conferimento ad una delle sedi provinciali dell'istituto.

L'azione è stata coordinata con un *calendario delle attività di campo* e uno *schema di flusso dati/campioni*. Sul sito [www.izsum.it](http://www.izsum.it), sono disponibili i due video-tutorial realizzati in collaborazione con UNIPM, per l'effettuazione del metodo ZAV (<https://youtu.be/MporZiNvtwl>) e per il prelievo delle api bottinatrici destinate alla ricerca di *Nosema spp.* (<https://youtu.be/6DqUaU9vC5g>).

Di seguito il calendario delle attività di campo:

	ZAV	Campionamento x NOSEMA
1°Aprile	X	X
15 Aprile	X	
Maggio	X	X
Giugno	X	X
Luglio	X	X
Agosto	X	X
Settembre	X	X

Tabella 1: Calendario delle attività di campo

Solo alcune SM hanno effettuato i campionamenti per la valutazione di *Nosema spp.*. La scelta è stata condotta a seguito di valutazioni che hanno preso in considerazione innanzitutto il rilevamento del microsporidio nella medesima famiglia nell'anno precedente e fattori di natura climatico altitudinale. Di seguito le SM che hanno effettuato anche il campionamento di bottinatrici per la ricerca di *Nosema spp.*:

PV	SM
<b>PU</b>	SM-PU02, SM-PU03
<b>AN</b>	SM-AN04, SM-AN05, SM-AN06
<b>MC</b>	SM-MC09, SM-MC09bis, SM-MC10
<b>FM</b>	SM-FM11, SM-FM13
<b>AP</b>	SM-AP14, SM-AP15, SM-AP16

Tabella 2: Elenco delle SM per provincia, sottoposte al monitoraggio della nosemiasi

La ricerca e la quantificazione di *Nosema spp.* è stata effettuata con metodo ufficiale OIE (1) a partire da un omogenato di intestini di 60 api bottinatrici: i campioni positivi all'indagine microscopica, per la presenza di spore di *Nosema* sono stati conteggiati con camera di Burker e successivamente sottoposti ad identificazione di specie con metodo molecolare (multiplex PCR *N.ceranae*, *N.apis* e *N.bombi*) (1).

I dati relativi al livello di infestazione da *Varroa destructor* sono stati elaborati per essere poi restituiti, tramite il *Bollettino Apistico Trimestrale* pubblicato sulla pagina web IZSUM (Allegati 2, 3 e 4), in tempi utili alla programmazione degli *interventi di controllo* della parassitosi in

corrispondenza della stagione primaverile, estiva ed autunnale. Nel terzo bollettino sono stati pubblicati anche i dati relativi al *blocco di covata* (totale/parziale) sopraggiunto prima dell'intervento acaricida autunnale in maniera tale da fornire agli apicoltori un riferimento anche relativo allo stato riproduttivo della famiglia monitorata.

Anche nel 2021 è proseguita l'attività di *sorveglianza attiva* nei confronti di Insetti Alieni a Rischio di Introduzione quali *Aethina tumida* (attività collaterale a quella condotta dai SV e inerente il Piano Ministeriale di Sorveglianza e Controllo) e *Vespa velutina* rilevata in Italia nel 2013 ed attualmente presente e radicata nell'Italia Nordoccidentale con tendenza a spostarsi verso sud scendendo lungo la Versilia. Il sistema si è basato sulla *Rete* costituita nel 2019 caratterizzata da *100 stazioni di sorveglianza* distribuite nell'intero territorio regionale, individuate tra gli apiari iscritti all'anagrafe apistica e grazie al coordinamento dei quattro Consorzi Apistici ed alle Associazioni del territorio. Questi hanno fornito il supporto logistico e il raccordo con le Sedi marchigiane dell'IZSUM. Tale rete, implementata annualmente grazie alla ulteriore distribuzione di specifiche trappole (Tap-Trap ed Aethina stop) è rappresentata da apicoltori formati e rimane operativa per l'intera durata della stagione produttiva garantendo la sorveglianza nei confronti degli insetti esotici.

L'Attività di Sorveglianza Sanitaria Passiva è invece volta ad indagare le patologie presenti nelle colonie a seguito di episodi clinici.

Nella stagione 2021, oltre a rinnovare il supporto diagnostico di laboratorio e la consulenza gratuita ai tecnici e agli apicoltori in regola con l'iscrizione all'anagrafe apistica nazionale sono state messe a punto ed emanate *Linee Guida per il corretto campionamento* in occasione di episodi di morie/spopolamenti in apiario (allegato 6) ad uso dei Tecnici Apistici riconsociuti (in collaborazione con ASUR). L'iniziativa è nata dall'esigenza di fornire delle istruzioni operative fruibili tanto dai veterinari quanto dai tecnici apistici o apicoltori esperti, finalizzate ad eseguire un campionamento corretto, in termini di: tipo matrice/i da raccogliere, quantità minima sufficiente, corretto confezionamento, conservazione a temperatura e invio al laboratorio.

Ciò ha permesso al laboratorio di riferimento di espletare le analisi necessarie ad effettuare la *diagnosi differenziale* delle patologie sospettate sulla base sintomatologica e clinica osservata. Tali Linee Guida sono state presentate in occasione di un corso di approfondimento in apicoltura organizzato da ASSAM nel periodo Febbraio Marzo 2021, ma anche nei diversi incontri di aggiornamento organizzati dai Consorzi e Associazioni, per poi essere pubblicate sul sito istituzionale IZSUM

<http://www.izsum.it/files/Download/638/22107/LINEE%20GUIDA%20SEGNALAZIONI%20MORIE%20SPOPOLAMENTO.pdf>.

Negli episodi di mortalità, come per ogni altra problematica sanitaria, i campioni per la diagnosi di laboratorio sono stati consegnati presso le sedi dell'IZSUM (Fermo, Tolentino, Ancona, Pesaro) e inviati al Laboratorio di Ancona. Tale *servizio di assistenza tecnica e di laboratorio* mette in relazione e attiva la consulenza dei Tecnici Apistici, degli esperti dell'ASSAM, dei veterinari dell'ASUR e dei veterinari IZSUM per le rispettive competenze.

L'Istituto Zooprofilattico si è impegnato nell'annata apistica 2021 anche sul fronte della *tutela delle sottospecie autoctone di Apis mellifera* attraverso campionamenti ad hoc che hanno avuto lo scopo di effettuare una iniziale verifica della distribuzione locale e regionale, con particolare attenzione a quelle aziende che commercializzano materiale genetico producendo regine e/o sciami.

La valutazione della *deriva genetica*, soprattutto in aree vocate, per idonee caratteristiche orografiche o in quanto circostanti ad allevamenti di api regine ligustiche certificate, è un passaggio preliminare fondamentale per intraprendere azioni coordinate finalizzate alla protezione degli ecotipi locali. L'IZSUM, attraverso la collaborazione con Consorzi, Associazioni del territorio e Parco

Nazionale dei Monti Sibillini, ha selezionato 18 aziende variamente distribuite sul territorio regionale (5 PV AN, 6 PV MC, 3 PV PU, 1 PV FM, 3 PV AP) per un totale di 25 famiglie analizzate. I campioni pervenuti consistevano in *falcon* da 50 ml riempite per circa metà volume di api nascenti (appena sfarfallate), immerse in alcool etilico assoluto denaturato. I campioni sono stati conferiti con un'unica spedizione al *Crea-api di Bologna*, che ha effettuato le corrispondenti *analisi morfometriche* tese a verificare la rispondenza del campione analizzato alla sottospecie *ligustica*.

## Risultati

### SORVEGLIANZA ATTIVA

I dati periodici, dell'infestazione da *Varroa destructor* delle famiglie monitorate (tabella 4) hanno permesso di rilevare un'infestazione media dello 0,4% nella stagione primaverile (prendendo in considerazione i dati complessivi pervenuti nei mesi di Aprile e Maggio); valore praticamente uguale a quello registrato nel 2020 nelle medesime stazioni, considerando però esclusivamente i valori pervenuti a Maggio (nel 2020 le rilevazioni dell'infestazione da *Varroa destructor* sono iniziate, come da progetto, il primo di Maggio). Esaminando il dato distinto per le differenti fasce meteorologiche, secondo quanto pervenuto dalle corrispondenti stazioni, si è evidenziato un livello di infestazione medio dello 0,5% nella fascia costiera, dello 0,4% in quella collinare e dello 0,2% in quella montana; dati molto simili tra loro che hanno denunciato una situazione abbastanza omogenea nelle varie zone ad inizio stagione. Come si evince da pubblicazioni scientifiche in merito alle soglie da considerare critiche ai fini di una programmazione razionale degli interventi acaricidi (Fontana et al.,2013), livelli di infestazione al di sotto dell'1% sono da ritenere entro la soglia di sicurezza, chiaramente contestualizzandoli al periodo di rilevamento. Considerando che, in base alla dinamica di popolazione di *Varroa destructor*, i livelli di infestazione aumentano con il procedere della stagione, i dati delle rilevazioni primaverili vanno valutati anche in un'ottica di previsione, tenendo presenti le indicazioni sottostanti.

RISCHIO		% varroa luglio	% varroa agosto	% varroa settembre
BASSO	■	<1%	<2%	<3%
MODERATO	■	1%-5%	2%-5%	3%-5%
ELEVATO	■	>5%	>5%	>5%

Tabella 3: Soglia di rischio periodico per intensità di infestazione da *Varroa* misurata con Metodo ZAV

Analizzando i dati riportati in Tabella 4 possiamo notare come le famiglie MC08 e MC10bis presentavano un livello di infestazione prossimo o superiore all'1% già nel mese di aprile. La famiglia MC08 ha mostrato già a partire dalla primavera una infestazione critica che ha indotto l'apicoltore ad effettuare un intervento preventivo a giugno con acido ossalico gocciolato, quando il livello di infestazione si attestava al 2,5%. La necessità di tale intervento è sempre più frequente, permette di portare in produzione famiglie che risulterebbero altrimenti improduttive e anzi fonte di impegno con spreco di energie, materiali e risorse con problemi intercorrenti.

Complessivamente infatti, 4 apiari su 13 (30%) presentavano fin dalla primavera livelli di infestazione pari o superiori alla soglia di sicurezza dell'1%; per analogia nel Maggio 2020, 2 apiari su 17 (11%) risultavano sopra la soglia di sicurezza. Va però considerato che mentre nel 2020 veniva richiesta la valutazione con metodo ZAV del livello di infestazione da *Varroa destructor* di un singolo alveare per apiario, nel 2021 i dati risultano dalla media delle valutazioni ZAV relative ad almeno tre famiglie del medesimo apiario, il più possibile distanziate tra loro.

L'infestazione media rilevata nella stagione estiva 2021 è stata del 1,6 % (nei primi 15 giorni di Luglio), valore di poco superiore a quello registrato nel 2020 nelle medesime stazioni. Esaminando le differenti fasce meteorologiche, si è evidenziato un livello di infestazione medio dell'1,8% nella fascia costiera, 1,7% in quella collinare (il rilevamento di luglio della stazione AN05 è stato escluso per ragioni spiegate di seguito), 1% in quella montana, dati che in linea con quelli del 2020, denunciano una dinamica di infestazione simmetricamente correlabile alla fascia altitudinale e dipendente dall'andamento meteorologico.

Riferendosi sempre ai dati riportati in tabella 4, 4 apiari su 15 (27%) presentavano nel mese di giugno livelli di infestazione pari o superiori alla soglia di sicurezza dell'1%, stessa situazione riscontrata anche a giugno 2020. Nel mese di luglio la situazione risultava sotto controllo con oltre la metà degli

apiari monitorati entro la soglia di sicurezza dell'1%, fatta eccezione per la stazione di monitoraggio MC09 (Abbadia di Fiastra) che ha registrato un valore di *Varroa destructor* oltre la soglia critica (6,5%). La stazione AN05 (Corinaldo) ha registrato un valore pari a 4%, influenzato da un blocco di covata naturale (cambio regina) in una delle famiglie monitorate, condizione che ha determinato un repentino aumento della varroa foretica, mentre la stazione di Ancona ha registrato un valore di 4,5 prossimo al limite critico. La situazione complessiva risultava comunque ampiamente sotto controllo, pur richiedendo una programmazione a breve termine del/dei trattamenti acaricidi estivi. I valori sono risultati all'incirca sovrapponibili a quelli riscontrati nel medesimo periodo del 2020.

L'infestazione media rilevata nella stagione tardo estiva autunnale 2021 è del 1% (considerando i dati complessivi pervenuti nell'arco del mese di settembre). Esaminando le differenti fasce meteorologiche, secondo i dati pervenuti dalle corrispondenti stazioni, si è evidenziato un livello di infestazione medio dello 0,6% nella fascia costiera, dell'1,5% in quella collinare e dell'1,2% in quella montana. Come è possibile osservare nella tabella 4, solo un apiario su 12 (8,3%) presentava in autunno un livello di infestazione pari o superiore alla soglia di sicurezza del 3%.

Complessivamente a differenza dei dati raccolti dalle medesime stazioni nel 2020, nel 2021 solo una famiglia (MC09) ha superato il livello di infestazione ritenuto critico per la colonia (soglia critica del 5% come desunta da Sumpter e Martin, 2004). In generale, grazie all'intervento effettuato dagli apicoltori, l'infestazione è stata tenuta sotto controllo per l'intera stagione. Occorre considerare che la soglia del 5% è ritenuta critica relativamente a danni di natura sanitaria in quanto oltre questa percentuale aumentano sensibilmente i rischi di insorgenza clinica di virusi (DWV e ABPV in particolare) correlate alla *Varroa*. È pertanto da valutare la convenienza di adottare una soglia critica più bassa di quella consigliata in letteratura nell'ottica di prevenire anche danni di natura produttiva che potrebbero verificarsi a percentuali di infestazione anche più contenute. Inoltre numerosi studi confermano un ruolo sinergico tra diversi patogeni endemici (come *Varroa* e *Nosema* per esempio), e tra fattori biotici ed abiotici sottolineando come vi sia una multi fattorialità alla base delle perdite produttive e riproduttive, prima ancora di arrivare a considerare il danno arrecato al capitale.

SM	1-Apr	15-Apr	1-Mag	1-Giu	1-lug	1-Ago	1-Set
PU01	0,5	N.P.	1	0,5	0,5	N.P.	0,5
PU02	0,5	N.P.	1	0	0,5	N.P.	N.P.
PU03	N.P.	N.P.	0,5	0	0,5	0,5	0,5
AN04	0	0,5	0,5	1,5	4,5	<b>4,5</b>	2,5
AN05	N.P.	0,5	0	0,5	4	4,5	<b>2,5</b>
AN06	N.P.	N.P.	0,5	N.P.	1,5	N.P.	N.P.
MC08	<b>1,5</b>	<b>1,5</b>	0,5	2,5	<b>2,5</b>	<b>2,5</b>	<b>1,5</b>
MC09	0	0,5	0,5	0,5	<b>6,5</b>	4,5	N.P.
MC09bis	N.P.	N.P.	N.P.	0,5	0,5	2	0
MC10	N.P.	0	0	1,5	1,5	0,5	2,5
MC10bis	0	1	0,5	1	1	N.P.	N.P.
FM11	N.P.	0	0	0,5	1	3	0
FM12	N.P.	0	0,5	0,5	0,5	1,5	1
FM13	N.P.	N.P.	0	0,5	0,5	1,5	N.P.
AP14	0,5	0,5	0	0,5	0,5	0,5	0,5
AP15	N.P.	N.P.	N.P.	N.P.	0,5	N.P.	2,5

AP16	0	N.P.	0	0,5	0,5	0,5	0,5
------	---	------	---	-----	-----	-----	-----

Tabella 4: Tasso di infestazione da *Varroa* (valutazione ZAV in campo). In rosso i valori che superano la soglia critica del 5%. N.P.=dato non pervenuto.

Dai grafici osservabili in Figura 2 si osserva un andamento dell'infestazione da *Varroa destructor* con scostamento di almeno due-tre settimane del livello di infestazione nelle tre fasce meteorologiche. Le percentuali di infestazione aumentano prima nella fascia costiera quindi nella collinare ed infine nella montana. I picchi dei livelli di infestazione, sebbene abbastanza differenti tra loro in termini percentuali si registrano tutti entro la prima metà di agosto, anche in relazione all'abitudine consolidata degli apicoltori di effettuare il trattamento tampone a calendario e subito dopo la rimozione dei melari piuttosto che in base alle esigenze sanitarie degli alveari.

È evidente dal grafico come l'inflessione primaverile delle percentuali di infestazione di *Varroa* sulle api adulte, evidente sulle curve rappresentative della zona costiera e di quella montana, sia da ricondurre a trattamenti acaricidi applicati in primavera.

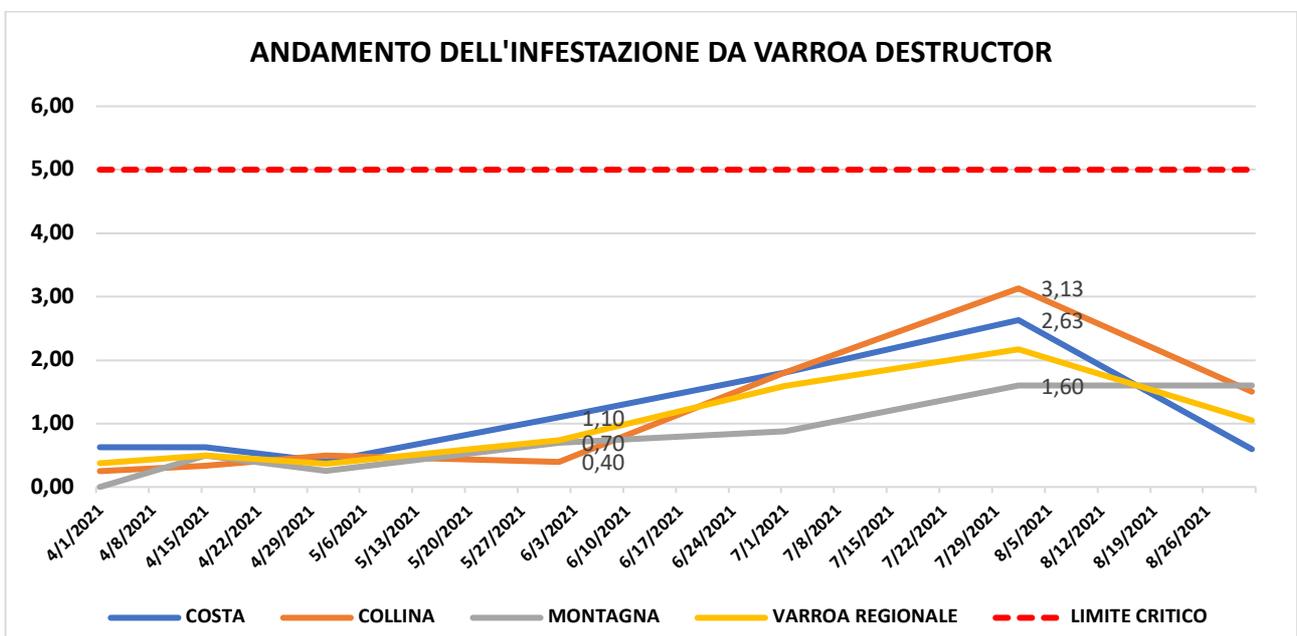


Fig.2: Andamento dell'infestazione nelle differenti fasce meteorologiche considerando le medie ottenute dalle quindicinali valutazioni nella medesima fascia.

In generale, dai dati pervenuti nell'arco dell'intera stagione 2021, l'andamento di *Varroa* non ha evidenziato importanti criticità in termini di livello di infestazione a livello regionale (curva gialla). È ragionevole supporre che le condizioni meteorologiche avverse verificatesi tra la fine di marzo e l'inizio di aprile, caratterizzate da gelate anche a bassa quota, abbiano rallentato, in molti areali anche fortemente, lo sviluppo delle famiglie con fenomeni di blocco di covata che possono aver inciso negativamente anche sulla dinamica di popolazione di *Varroa destructor*.

Tuttavia è da verificare la possibilità più volte enunciata di anticipare il trattamento estivo, anche viste le potenzialità produttive del periodo, anche alla luce della bassa produttività del periodo tardo estivo.

Relativamente all'azione di monitoraggio attuata nei confronti di *Nosema spp.* tutte le colonie monitorate (già risultate affette nel 2020) sono risultate positive al microsporidio anche nel 2021, sebbene con livelli di infestazione decisamente più contenuti, sottolineando che l'infestazione, tende solo apparentemente a risolversi, ripresentandosi alla stagione successiva. Tutti gli omogenati di intestino con presenza di spore riconducibili al microsporidio sono stati sottoposti ad indagine

molecolare in PCR per determinarne la specie di appartenenza (*N.ceranae*, *N.apis* e *N.bombi*). In tutti i casi le spore appartenevano a *Nosema ceranae*.

PV	SM	01-apr	01-mag	01-giu	01-lug	01-ago	01-set	01-ott	Specie
AN	AN 04 (Ancona)	0	58819	0	0	1400000	369791	0	<i>N.ceranae</i>
		0	26041	0	0	0	0	0	<i>N.ceranae</i>
	AN 05 (Corinaldo)	0	0	0	60763	0	700000	6944	<i>N.ceranae</i>
PU	PU01(Terre Roveresche)	1600000	0	550000	39930	0	0	0	<i>N.ceranae</i>
MC	MC09(Tolentino)	0	409722	0	0	0	0	0	<i>N.ceranae</i>
	MC10(Muccia)	0	0	0	0	17361	0	0	<i>N.ceranae</i>
FM	FM13(Amandola)	0	0	0	0	0	0	10500	<i>N.ceranae</i>
AP	AP14(Campofilone)	0	0	0	0	20833	17361	0	<i>N.ceranae</i>
	AP16(Acquasanta Terme)	0	41666	0	0	0	145833	490000	<i>N.ceranae</i>

Tabella 5: Valori di infestazione (n. spore/ape/mese) di *Nosema ceranae* su un campione di 60 api bottinatrici (metodo OIE). In blu i valori che corrispondono ad elevati livelli di infestazione.

Dal grafico in Fig.3 è possibile osservare come il *tasso di positività* (campioni positivi/campioni controllati) presenti due picchi stagionali. Il primo si posiziona nel *periodo tardo primaverile*, momento caratterizzato generalmente dalla presenza nell'alveare di molte bottinatrici vecchie nate nell'autunno precedente, le quali favoriscono la concentrazione del microsporidio nel campione osservato ed il secondo nel *periodo tardo-estivo autunnale* quando la colonia inizia a rallentare in termini riproduttivi per prepararsi all'inverno. Questo andamento, almeno in parte sovrapponibile a quello mostrato dal parassita nelle medesime SM durante la stagione 2020, risulta simile a quello di *N.apis*, caratterizzando pertanto una *malattia stagionale tipica dell'invecchiamento della colonia*. Considerato che la ripresa della riproduzione e la sostituzione primaverile di gran parte delle bottinatrici con insetti giovani, riporta l'infestazione entro livelli di minor allarme, come visibile dalla diminuzione sia del tasso di positività registrato a giugno sia del livello di infestazione minimo rilevato a giugno e a luglio, *una azione di bilanciamento delle singole famiglie tra la quantità di api adulte e la forza della covata*, ove necessario e solo nell'ambito dell'apiario (evitando infestazioni e trasferimento di patogeni tra apiari), è da considerarsi una azione preventiva da attuarsi in primavera prima della messa in produzione delle famiglie (anche in linea con la prevenzione della Peste Europea). *Nosema* è senza dubbio un patogeno da non sottovalutare, è infatti nota la sua *azione deprimente sul sistema immunitario* dell'ape, che la rende maggiormente suscettibile, sia a malattie intercorrenti che a dosi sub letali di pesticidi, altrimenti tollerate senza grandi alterazioni o danni a carico delle bottinatrici. *Nosema* vanta anche una azione sinergica con *Varroa destructor*, potenziando la capacità dell'acaro di aprire la strada a patologie di irruzione secondaria di origine batterica e virale che hanno larga diffusione in Italia e nella nostra Regione, come già confermato dai dati di monitoraggio relativi all'anno 2020.

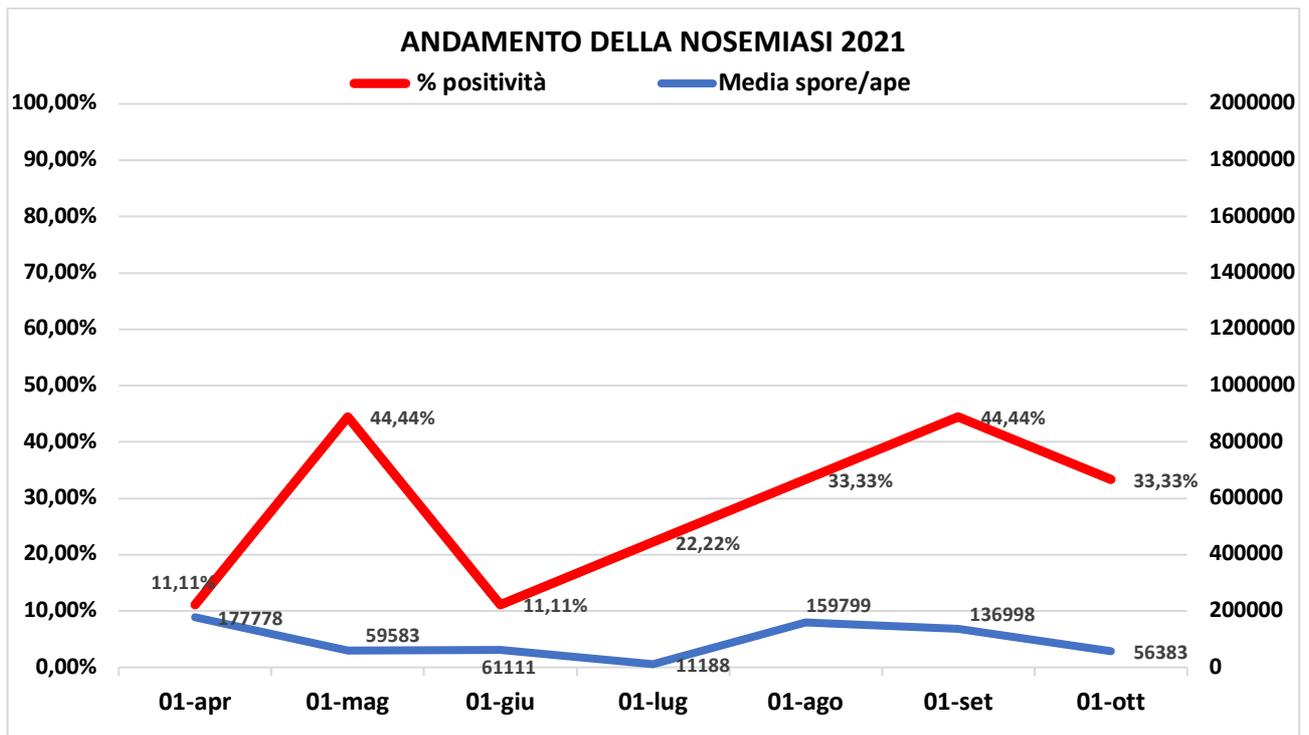


Fig.3: Andamento mensile dell'infestazione da *Nosema ceranae* nelle stazioni monitorate (metodo OIE).

A partire dall'anno 2021 è stata avviato uno studio, condotto in collaborazione con l'Unità di Apicoltura dell'IZS Lazio e Toscana, in merito all'adozione di metodi innovativi, rapidi ed economici, per l'identificazione di *Apis mellifera* e le sue diverse sottospecie (*ligustica*, *carnica*, *sicula*), al fine di sostituire l'analisi morfologica e morfometrica (costosa e poco pratica ai fini certificativi), quale atto preliminare per una successiva eventuale azione di tutela. Lo studio ha come obiettivo di verificare l'applicabilità della spettrometria di massa in MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight), all'identificazione, attraverso l'elaborazione di un profilo proteico caratteristico, di sottospecie di *Apis mellifera*, quali la *ligustica*, la *carnica* e la *sicula*. Lo studio ha l'obiettivo di sviluppare una metodologia rapida ed economica per l'analisi spettroscopica e a fini genetici delle api. Il numero di campioni analizzati per alcune sottospecie non ha permesso di ottenere una distribuzione omogenea degli spettri, necessaria per giungere ad una identificazione attendibile della sottospecie. Sono pertanto in corso indagini su ulteriori campioni, per verificare la fattibilità di una procedura di identificazione basata su questa tecnologia. In merito alle *analisi morfometriche commissionate al Crea-api* di seguito vengono riportati i dati in tabella:

ANALISI MORFOMETRICHE	Campioni analizzati	<i>A.m.ligustica</i>	Non Conforme
PV AN	9	8	1
PV MC	7	6	1
PV PU	4	4	0
PV FM	2	1	1
PV AP	3	1	2

TOTALE	25	20	5
--------	----	----	---

Tabella 6: Campioni di api sottoposte ad analisi morfometrica ai fini della valutazione della conformità alla sottospecie *ligustica*.

Sono stati sottoposti ad analisi morfometrica complessivamente 25 campioni per 18 aziende distribuite, come indicato in tabella 6, nelle 5 province marchigiane. Il 20% dei campioni analizzati è risultato non conforme ad alcuna delle sottospecie di *Apis mellifera* presenti sul territorio italiano. A fronte dell'esiguo numero e della non uniforme distribuzione del campione sul territorio regionale, *non possiamo considerare il risultato rappresentativo della situazione regionale*.

#### SORVEGLIANZA PASSIVA

Per sorveglianza passiva si intende *l'attività diagnostica svolta nel corso dell'anno dietro segnalazione di sintomi o mortalità in apiario*. Le richieste sono pervenute sia dai Servizi di Veterinari dell'Asur che dai *Tecnici Apistici* dei Consorzi Apistici Provinciali o anche direttamente da parte degli apicoltori. Anche nel 2021, grazie ai fondi stanziati dall'OCM Miele, è stata garantita la *consulenza diagnostica gratuita* per gli apicoltori iscritti alla *anagrafe apistica nazionale*. L'intervento è stato prestato non solo con l'attività di laboratorio, ma anche con la consulenza già a partire dalle fasi di campionamento che è stato effettuato in un certo numero di casi direttamente dall'apicoltore oppure dai Servizi Veterinari anche congiuntamente con il personale IZSUM seguendo quanto specificato nelle Linee Guida elaborate ed emanate dall'IZSUM. Le prove di laboratorio sono state effettuate nei laboratori dell'IZSUM per *l'accertamento definitivo del sospetto diagnostico*.

Tale azione si va consolidando di anno in anno, sostenuta dalla consapevolezza che l'osservazione clinica, nel caso delle patologie delle api adulte, comporta al massimo l'emissione di un sospetto che richiede la conferma analitica. Ricordiamo che *la maggior parte delle malattie delle api non sono individuabili clinicamente*, pertanto il ricorso alla diagnosi di laboratorio è una necessità assoluta se si intende evitare di ricorrere a trattamenti e provvedimenti irrazionali effettuati a priori. L'andamento sanitario nella Regione Marche è stato caratterizzato da numerose richieste di intervento diagnostico in apiario da parte degli allevatori, a cui sono seguiti gli accertamenti analitici per la diagnosi di laboratorio; come si evince dalla tabella sottostante sono state condotte un totale di 59 indagini analitiche.

<b>ANALISI ESEGUITE API 2021 SORVEGLIANZA PASSIVA</b>	
ESAME QUANTITATIVO NOSEMA	12
ESAME QUANTITATIVO VARROA	3
RT-PCR DWV (VIRUS DELLE ALI DEFORMI)	1
RT-PCR ABPV (VIRUS DELLA PARALISI ACUTA)	1
RT-PCR CBPV (VIRUS DELLA PARALISI CRONICA)	2
IDENTIFICAZIONE AETHINA TUMIDA	2
EAP TELAINO DI COVATA PER SOSPETTO PESTE AMERICANA	4
EAP TELAINO DI COVATA PER SOSPETTO PESTE EUROPEA	3
ISOLAMENTO IN COLTURA MELISSOCOCCUS PLUTONIUS	6
ESAME MICROSCOPICO COLORATO DELLE LARVE	6
ISOLAMENTO IN COLTURA PAENIBACILLUS LARVAE	5
PCR PAENIBACILLUS LARVAE	1
PCR MELISSOCOCCUS PLUTONIUS	2

EAP TELAINO DI COVATA PER SOSPETTO COVATA A SACCO/COVATA CALCIFICATA	8
RICERCA PESTICIDI SU MATRICE API	3
<b>TOTALE INDAGINI EFFETTUATE</b>	<b>59</b>

Tabella 7: Tabella riassuntiva dei campioni e delle analisi effettuate (stagione apistica 2021)

Legenda: EAP: Esame anatomo-patologico; RT-PCR DWV: Real Time Polimerase chain reaction Deformed Wing Virus (Virus delle ali deformi); RT-PCR ABPV: Real Time Polimerase chain reaction Acute Bee Paralysis Virus (Virus della paralisi acuta); Real Time PCR CBPV: Polimerase chain reaction Cronic Bee Paralysis Virus (Virus della paralisi cronica).

Dai dati riportati in tabella 7 si evince come alcune patologie della covata, come le Malattie Batteriche e la Covata a Sacco, si presentino puntualmente annualmente, con segnalazioni che probabilmente rappresentano solamente la punta di un iceberg. Per quanto tali patologie solitamente siano facilmente individuabili dall'apicoltore esperto (almeno in fase conclamata), le analisi di laboratorio sono comunque necessarie per confermare un sospetto diagnostico e, con una diagnosi certa e precoce, consentire all'allevatore di mettere in atto delle misure tempestive ed efficaci per evitare la diffusione della malattia nell'apiario, contenendo i danni che soprattutto le pesti possono arrecare tanto in termini sanitari quanto produttivi. Il 2021 si è distinto per un numero maggiore di casi diagnosticati di Peste Europea rispetto agli anni passati, complice il brusco peggioramento delle condizioni climatiche verificatosi ad aprile dopo una fase iniziale estremamente favorevole della stagione. Le famiglie particolarmente popolose per una ripartenza riproduttiva particolarmente spinta tra fine febbraio e marzo, si sono trovate successivamente a fronteggiare temperature particolarmente rigide, anche a motivo di importanti neviccate. Queste hanno costretto le colonie a tornare in glomere, lasciando le porzioni più periferiche del nido, piene di covata, non sufficientemente accudite, potenzialmente esposte a forme batteriche pestose. Dagli accertamenti condotti in tutta la stagione è stato diagnosticato un solo caso di Mal Nero (CBPV), a differenza di quanto rilevato nel 2020, anno in cui si è verificata una vera e propria epidemia interessante tutte le province.

CASI	SOSPETTO CLINICO	INDAGINI DI LABORATORIO	DIAGNOSI
6	Spopolamento a carico di nuclei di circa 1 mese con completa scomparsa della famiglia. Assenza di api morte dentro e fuori dall'arnia. Sospetto avvelenamento	<i>Nosema ceranae</i> e <i>Varroa destructor</i> ad elevati livelli di infestazione. PCR DWV e PCR ABPV. EAP dei telaini di covata.	Sindrome da spopolamento per coinfezione da <i>Nosema ceranae</i> , <i>Varroa destructor</i> , DWV (virus delle ali deformi) e ABPV (Virus della paralisi acuta), SCB (Virus della covata a sacco) e Covata calcificata.
2	Parasitic Mite Sindrome	<i>Varroa destructor</i> ad elevati livelli di infestazione	Varroatosi
4	Peste Americana	Isolamento <i>Paenibacillus larvae</i> ; PCR Peste Americana	Peste Americana
2	Sospetto Peste Europea associata a proliferazione massiva di funghi e muffe	Isolamento di <i>Melissococcus plutonius</i> ; Evidenziazione di <i>Ascosphaera apis</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i> . <i>Nosema ceranae</i> ad elevati livelli di infestazione	Peste Europea e Covata Calcificata e Pietrificata associata a Nosemiasi

2	Malattia della covata, sospetto peste in fase iniziale	Isolamento di <i>M.plutonius</i> e PCR Peste Europea, PCRSBV	Peste Europea e Covata a Sacco
1	Malattia della covata, sospetto peste in fase iniziale	Isolamento ed identificazione di <i>Ascospaera apis</i>	Covata calcificata
5	Spopolamento massiccio su 5 alveari, sospetto avvelenamento	Presenza di <i>Nosema ceranae</i> a medio-elevati livelli di infestazione.	Inconclusiva
1	Sintomatologia nervosa, sospetto avvelenamento	Api piccole, glabre e nere; PCRCBPV	Mal nero (CBPV)
3	Spopolamento su numerosi alveari, morte massiva di api. Sospetto avvelenamento	<i>Nosema ceranae</i> a bassi livelli di infestazione	Inconclusiva
2	Alterazioni addominali di pupe a termine, presenza di larve sospette. Pupe morte e disopercolate Sospetta Aethiniosi	Larve di <i>Galleria mellonella</i> con danneggiamento della covata nascente	Infestazione massiva da <i>Galleria mellonella</i>

Tabella 8: segnalazioni di episodi clinici e relative diagnosi. Nella prima colonna (sospetto clinico) sono riportate le informazioni anamnestiche e relative ad una prima valutazione di campo; nella seconda colonna (indagini di laboratorio) sono riassunte le analisi che hanno avuto un esito positivo tra quelle effettuate sui campioni inviati; nella colonna di destra la diagnosi conclusiva.

Ad inizio stagione, sono arrivate numerose segnalazioni da parte di alcuni apicoltori della provincia di Ancona, riguardanti la morte massiva di numerose famiglie contemporaneamente. Purtroppo è stato possibile effettuare un solo sopralluogo presso un apiario del comune di Monte San Vito a fronte della *tardività di molte segnalazioni*. Nonostante il sospetto, da parte dell'apicoltore, del coinvolgimento di *trattamenti fitosanitari* condotti in maniera non corretta da alcuni agricoltori confinanti, gli accertamenti non hanno rilevato alcuna presenza di molecole fitosanitarie nei campioni indagati. Le analisi hanno invece rilevato la presenza contemporanea di numerosi patogeni tra i quali *Nosema ceranae*, *Varroa destructor*, entrambi ad elevati livelli di infestazione, contemporaneamente alle principali virosi indagate e strettamente associate alla Varroa (DWV, ABPV). Il quadro emerso è stato suggestivo di un episodio massivo di CCD (Colony Collapse Disorder) con scomparsa totale delle famiglie, mancanza di api morte dentro e fuori dall'arnia e presenza di scorte intatte e non saccheggiate. Le analisi hanno confermato il sospetto diagnostico formulato in campo. Rimane da intensificare l'indagine sul ruolo dei vari presidi sanitari utilizzati in agricoltura, sia per la loro capacità di determinare episodi di morie acute e massive di numerosi alveari se non interi apiari quando esposti a dosi massicce, sia per la loro azione più subdola, pertanto più difficile da evidenziare a livello analitico, di riuscire con dosi sub letali a ridurre la capacità delle colonie di far fronte alle patologie infettive, in particolare le virali, altrimenti subcliniche.

## **Considerazioni finali**

Il principale obiettivo dell'azione B2 è quello di offrire il supporto diagnostico e di valutazione dello *stato di salute* dell'apicoltura regionale in merito ai principali e più rilevanti patogeni che minacciano la situazione sanitaria delle colonie di *Apis mellifera* ma anche di *acquisire informazioni e dati utili a studiarne il comportamento e l'epidemiologia a livello locale*, cercando di creare un network specialistico tra i numerosi attori coinvolti, partendo dal presupposto che la ricerca di campo deve avere il duplice scopo di produrre informazioni sullo stato sanitario con dati ufficiali e confrontabili, ma anche restituire le informazioni collezionate a tutti gli stakeholder in causa.

E' infatti il ritorno e la condivisione del dato elaborato ad aumentare il livello di consapevolezza degli allevatori e dei loro tecnici apistici, i quali guadagnano pertanto un aiuto concreto non solo nel comprendere quale sia realmente la situazione sanitaria della propria azienda, potendo anche sviluppare delle *strategie di lotta e di contenimento* secondo scelte *razionali*, che vadano verso misure in grado di aumentare le produzioni e salvaguardare il capitale, tutelando il *consumatore* riducendo l'impatto chimico sugli alveari ed i loro preziosi prodotti. La scelta di coinvolgere gli apicoltori con una strategia di "citizen science" ha esattamente la finalità di aumentare la conoscenza di chi lavora in campo tutti i giorni fornendo degli strumenti, come metodi standardizzati di campo o l'assistenza gratuita al settore, utili per *limitare il più possibile le perdite* e proteggere una specie che riveste una importanza fondamentale per l'agricoltura e l'intero *ecosistema*.

L'approfondimento dell'andamento stagionale di alcuni patogeni, come *Varroa destructor* e *Nosema Ceranae* fornisce un quadro abbastanza diversificato, soprattutto per la varroatosi, nelle differenti fasce meteorologiche dove sono state posizionate le stazioni di monitoraggio. L'esigenza di individuare il periodo più idoneo per effettuare l'intervento acaricida principale nei confronti della *Varroa* viene soddisfatta effettuando dei *rilevamenti periodici* in campo in grado di fornire riferimenti per areali omogenei e diffondendo l'informazione tramite *bollettini apistici* fruibili dalla comunità degli allevatori. L'abitudine di monitorare l'andamento dell'acariasi, avvalendosi di un metodo di facile e rapida esecuzione (metodo ZAV) consente, anche nell'apicoltura pratica, non solo di programmare tempistiche e modalità di trattamenti acaricidi, ma anche di *valutarne l'efficacia* avendo cura di confrontare la carica parassitaria prima e dopo la somministrazione del principio attivo. Effettuando infatti controlli diagnostici puntuali in apiario, soprattutto sulle famiglie destinate ad entrare in produzione, consentirà all'apicoltore di intervenire tempestivamente per ridurre l'infestazione sia per evitare le note conseguenze legate al danno sanitario diretto della *Varroa* e al notevole incremento dell'esposizione a patogeni secondari, sia per cercare di non raggiungere nemmeno le soglie di danno produttivo. Le famiglie uscite bene dal periodo invernale necessiteranno di pochi controlli dell'infestazione da *Varroa* ed eventualmente di un intervento prima del posizionamento del melario.

L'approccio alle problematiche sanitarie in apiario ha necessità di *procedure standard* che iniziano dall'applicazione di un preciso protocollo di campionamento che permetta di impostare un completo ed esaustivo diagnostico differenziale e di eseguire tutte le analisi che il caso richiede.

L'elaborazione e l'emanazione di *linee guida specifiche* ha permesso di uniformare gli interventi in campo, partendo dalla raccolta delle corrette matrici, delle quantità sufficienti e della giusta conservazione del campione. La formazione dei tecnici apistici e dei veterinari Asur, ma anche degli stessi apicoltori, rappresenta la strategia di base per una maggior e miglior organizzazione dei servizi in maniera di avere una sinergia di azione nel territorio che permetta la valutazione delle azioni ed il raggiungimento di migliori risultati.

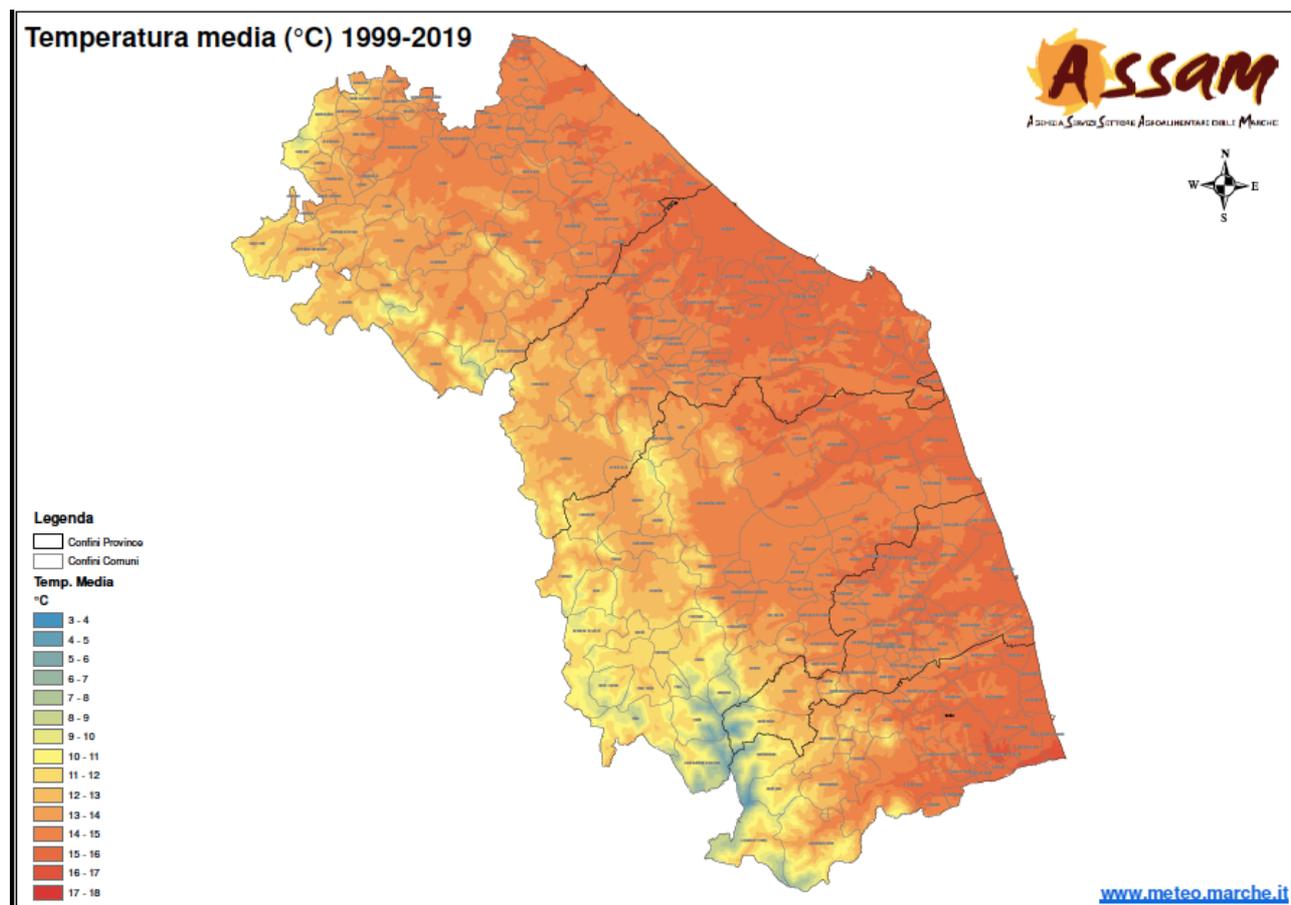
## **Bibliografia**

1. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animal. Nosemosis of honey bees. 2019, Chapter 3.2.4;
2. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Varroosis of honey bees (infestation of honey bees with *Varroa* spp.), 2019, Chapter 3.2.7;
3. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Infestation with *Aethina tumida* (small hive beetle), 2019 Chapter 3.2.5;
4. Lee, K V, Gary S. Reuter, and Marla Spivak. 2010. "Standardized Sampling Plan to Detect *Varroa* Density in Colonies and Apiaries." *American Bee Journal* 150 (12): 1151–55;
5. Sumpter, D J T, and Martin, S J. 2004. "The dynamics of virus epidemics in *Varroa*-infested honey bee colonies". *Journal of animal ecology* 73(1):51-63.

*Si ringraziano gli apicoltori, i Consorzi Apistici delle Marche, i Tecnici apistici, le Associazioni, Le Università (UNICAM e UNIPM), l'ASUR, l'ASSAM, le Regioni e tutti i collaboratori dei Laboratori IZUM per il fondamentale apporto nella produzione di questi dati.*

### ALLEGATO 1

Mappa meteo climatica della regione Marche basata sulle temperature medie annuali del periodo 1999-2009 (per concessione del Centro di Agrometeorologia dell'Assam).



ALLEGATO 2 Protocollo per la stima quantitativa di *Varroa destructor* con il metodo dello Zucchero A Velo (ZAV) fornito dall'Università Politecnica delle Marche.

Università Politecnica delle Marche

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE, ALIMENTARI ED AMBIENTALI



***PROTOCOLLO PER LA STIMA DEL LIVELLO DI INFESTAZIONE DI  
VARROA DESTRUCTOR  
(PROGETTO REGIONALE APICOLTURA, ANNO 2020 – AZIONE B2)***

Il test ZAV (Zucchero A Velo) è un metodo validato con un ampio lavoro scientifico (Lee et al., 2010a, 2010b). È una pratica molto semplice e rapida per valutare il livello di infestazione di varroa in una famiglia di api. È opportuno valutare il livello di infestazione all'uscita dell'inverno, e successivamente mensilmente.

**Materiale occorrente**

- un recipiente graduato in cui misurare il volume di 120 ml di api (un comune contenitore per le analisi delle urine);
- un vasetto da 750 ml provvisto di chiusura in rete, per far passare la varroa ma non le api: prendere un vasetto di miele da 750 ml, forare la capsula del vasetto a filo del bordo, ritagliare una rete con maglia di circa 2 mm ed incollarla alla rete con colla a caldo a chiudere il foro della capsula.
- un piatto largo bianco o meglio una ciotola bianca con bordi alti
- un cucchiaino
- zucchero a velo asciutto e polverulento
- acqua

**Esecuzione del test ZAV**

1. Raccogliere nel recipiente graduato 120 ml di api (circa 50 g di api) prelevandole dai favi di covata (meglio se da più favi). Allo scopo si pone il favo in posizione verticale e si scorre gentilmente l'imboccatura del contenitore dall'alto verso il basso sul dorso delle api, che in questo modo cadono all'interno. Ovviamente bisogna porre attenzione a non catturare la regina.
2. Travasare le api raccolte nel vasetto da 750 con tappo in rete e aggiungere 35 g zucchero a velo (possibilmente attraverso la rete).

3. Rimescolare bene le api delicatamente per 3 minuti per facilitare il buon impolveramento delle api.
4. Lasciare riposare per circa 1 minuto (IMPORTANTE).
5. Capovolgere e scuotere energicamente lo zucchero per circa 1 minuto sopra il piatto bianco contenente un po' d'acqua.
6. Rimettere le api nella colonia.
7. Contare gli acari (ben evidenti perché lo zucchero si scioglie in acqua).
8. Calcolare il livello di infestazione (numero varroa in 50 g di api).

Il metodo è stato validato con un ampio lavoro scientifico (Lee et al., 2010a, 2010b).

#### *Riferimenti bibliografici*

Lee, K V, R D Moon, E C Burkness, W D Hutchison, and M Spivak. 2010. "Practical Sampling Plans for *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in *Apis Mellifera* (Hymenoptera: Apidae) Colonies and Apiaries." *Journal of Economic Entomology* 103 (4): 1039–50.

Lee, K V, Gary S. Reuter, and Marla Spivak. 2010. "Standardized Sampling Plan to Detect Varroa Density in Colonies and Apiaries." *American Bee Journal* 150 (12): 1151–55.