

## contro *Nosema ceranae* indagata mediante due metodi q-PCR

Antonio Nanetti<sup>1</sup>, Giovanni Cilia<sup>1</sup>, Martina Bonetto<sup>1</sup>, Donato Tesoriero<sup>1</sup>, Claudia Garrido<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CREA Centro di Ricerca per l'agricoltura e l'ambiente, Bologna, Italy

<sup>2</sup>BeeSafe, Leverkusen, Germany

### INTRODUZIONE

*Nosema ceranae* parassitizza il ventricolo dell'ape<sup>1</sup> e viene trasmesso tramite ingestione. Questo patogeno emergente può essere veicolato oltre che dall'ape anche da altri organismi<sup>2,3</sup>, ed è una delle principali cause della perdita di colonie di *Apis mellifera* a livello mondiale<sup>4</sup>. Il controllo è problematico a causa della limitata disponibilità di medicinali specifici.

**Scopo dello studio:** Sulla base di studi preliminari<sup>5,6</sup>, abbiamo confrontato l'efficacia di Api-Bioxal e ApiHerb, due prodotti naturali, contro *N. ceranae*. La quantificazione è stata effettuata mediante analisi q-PCR basata su due diverse sequenze geniche.



Figura 1. I prodotti sono stati sciolti in una soluzione di zucchero e acqua (1:1 p/v) e somministrati gocciolando secondo l'etichetta: una volta Api-Bioxal e tre volte (a distanza di 7 giorni) ApiHerb.

### RISULTATI

L'abbondanza nei campioni pre- e post-trattamento in media è  $3.3 \cdot 10^9$  e  $4.8 \cdot 10^5$  copie con il metodo *Hsp70* (Fig. 2). La seconda tecnica ha portato a valori significativamente più alti, rispettivamente:  $1.5 \cdot 10^{12}$  (t-test:  $t(475) = -4.35$ ;  $P = 0,000$ ) e  $2.6 \cdot 10^7$  (t-test:  $t(475) = -5.08$ ;  $P = 0,000$ ) copie. La correlazione è stata insufficiente ( $r = 0,859$ ,  $p = 0,000$ ) per poter effettuare conversioni tra i due metodi.

ANOVA mostra un **effetto significativo** sui dati post-trattamento ( $F(2,16)=25.98$ ,  $p=0.000$ ). Il post-hoc Newman-Keuls test rileva differenze significative in tutte le comparazioni intragruppo (ApiHerb<Api-Bioxal<Controllo,  $p \leq 0.05$ ).

La Figura 3 mostra che, durante il trattamento, l'abbondanza è aumentata nel controllo (+ 40,52%), ma è diminuita nelle colonie trattate (Api-Bioxal: -98.75%; ApiHerb: -99.98%; t-test:  $t(11) = -2,009$ ;  $P = 0,070$ ). La diminuzione è di 1-6 ordini di grandezza, il valore massimo, corrispondente alla colonia 3 altamente infetta del gruppo Api-Bioxal.

La prevalenza era del 100% nei campioni pre-trattamento di tutti i gruppi. Il parassita era ancora prevalente in tutti i campioni post-trattamento nei gruppi trattati con Api-Bioxal e controllo, ma è diminuita nel gruppo trattato con ApiHerb.

Tre delle sei colonie trattate con ApiHerb sono risultate negative all'analisi post-trattamento effettuata con il metodo *Hsp70*. Negli campioni sopra la prevalenza non era significativamente diversa quando misurata con i due metodi q-PCR (*Hsp70*: 50.00%; *16S rRNA*: 54.67%; t-test:  $t(10) = -0.154$ ;  $P = 0.881$ ).

### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Api-Bioxal riduce l'abbondanza delle copie di *N. ceranae* ma non la prevalenza, a differenza dei risultati precedenti<sup>5</sup> ottenuti con un protocollo di trattamento differente, ovvero due somministrazioni di soluzioni di acido ossalico a bassa concentrazione. Tuttavia i nostri risultati suggeriscono che il trattamento effettuato con Api-Bioxal contro la varroa possa produrre un effetto anche sulle infezioni coesistenti di *N. ceranae*.

A questo proposito, una differenza tra Api-Bioxal e ApiHerb è debolmente supportata dalle statistiche. Tuttavia, ApiHerb ha influenzato la prevalenza, sebbene siano necessari ulteriori esperimenti per chiarire se ciò dipende dalla sua composizione specifica o dal periodo di trattamento prolungato. Entrambi i prodotti soddisfano le esigenze dell'apicoltura sostenibile e questo esperimento conferma che *N. ceranae* può essere controllato con sostanze sicure per l'ambiente, almeno nelle condizioni di questo studio. Tuttavia, studi futuri dovrebbero essere fatti per aumentare la nostra comprensione del loro modo di agire.

I metodi *Hsp70* and *16S rRNA* producono sistematicamente risultati differenti. Sono necessarie ulteriori indagini per chiarire le ragioni di questa differenza e stabilire quale tecnica sia più affidabile nell'analisi quantitativa.

RINGRAZIAMENTI: Gli autori ringraziano la dott.ssa Ilaria Cardaio e la dott.ssa Elisa Gianessi per il loro prezioso supporto tecnico.

### BIBLIOGRAFIA

- Higes, M., García-Palencia, P., Urbieta, A., Nanetti, A. & Martín-Hernández, R. *Nosema apis* and *Nosema ceranae* Tissue Tropism in Worker Honey Bees (*Apis mellifera*). *Vet. Pathol.* (2019). doi:10.1177/0300985819864302
- Martin-Hernández, R. et al. *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. *Environ. Microbiol.* **20**, 1302–1329 (2018).
- Cilia, G., Cardaio, I., dos Santos, P. E. J., Ellis, J. D. & Nanetti, A. The first detection of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in the small hive beetle, *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae). *Apidologie* **49**, 619–624 (2018).
- Valera, F., Martín-Hernández, R. & Higes, M. Evaluation of large-scale dissemination of *Nosema ceranae* spores by European bee-eaters *Merops apiaster*. *Environ. Microbiol. Rep.* **3**, 47–53 (2011).
- Nanetti, A., Rodríguez-García, C., Meana, A., Martín-Hernández, R. & Higes, M. Effect of oxalic acid on *Nosema ceranae* infection. *Res. Vet. Sci.* **102**, 167–172 (2015).
- Nanetti, A., Martín-Hernández, R., Gómez-Moracho, T., Cabri, R. & Higes, M. ApiHerb en el control orgánico de la Nosemosis tipo C (*Nosema ceranae*, Microsporidia). in *III Congreso Ibérico de Apicultura* (eds. Vilas-Boas, M., Dias, L. G. & Moreira, L. M.) 36 (Instituto Politécnico de Bragança, 2014).
- Cilia, G. et al. A novel TaqMan® assay for *Nosema ceranae* quantification in honey bee, based on the protein coding gene *Hsp70*. *Eur. J. Protistol.* **63**, 44–50 (2018).
- Boureois, A. L., Rinderer, T. F., Beaman, J. D. & Danka, R. G. Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee. *J. Invertebr. Pathol.* **103**, 53–58 (2010).

### MATERIALI E METODI

Gruppi randomizzati di colonie sono stati selezionati da un apiario infetto a Bologna, in Italia. A partire dal 6 ottobre 2017, due di loro sono stati trattati con Api-Bioxal, p.a. acido ossalico o ApiHerb, contenente estratti di aglio e cannella (Fig. 1). Un gruppo di controllo è stato lasciato non trattato.

Nei giorni 0 e 21, sono state campionate api bottinatrici (N = 25) dai telai esterni di ogni colonia. Abbondanza e prevalenza di *Nosema* sono state valutate mediante analisi q-PCR individuale, con primers e sonde progettate su sequenze dei geni *Hsp70* e *16S rRNA*<sup>8</sup>.

Le statistiche parametriche sono state calcolate su dati di abbondanza trasformati:  $x' = \log(x + 1)$ .

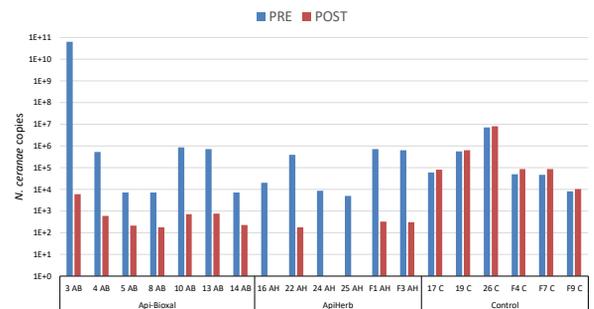


Figura 2. Abbondanza media pre e post trattamento valutata con il metodo *Hsp70* q-PCR nelle colonie dei tre gruppi.

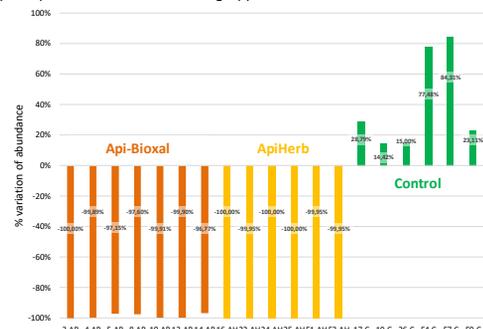


Figura 3. Effetto (= variazione relativa % pre-post) dei trattamenti sull'abbondanza di *N. ceranae*.