

# STUDI DI EFFICACIA CLINICA E TOSSICITA' SULLE API – ESPERIENZE DIRETTE

Michele Mortarino



DIMEVET – Università degli Studi di Milano

Corso: Efficacia clinica dei Medicinali  
Veterinari per le Api e loro uso in campo

Roma 19-20 dicembre 2018

# VARROA: IL PRINCIPALE PROBLEMA DELLE API

- Fase riproduttiva: covata opercolata da fuco e da operaia

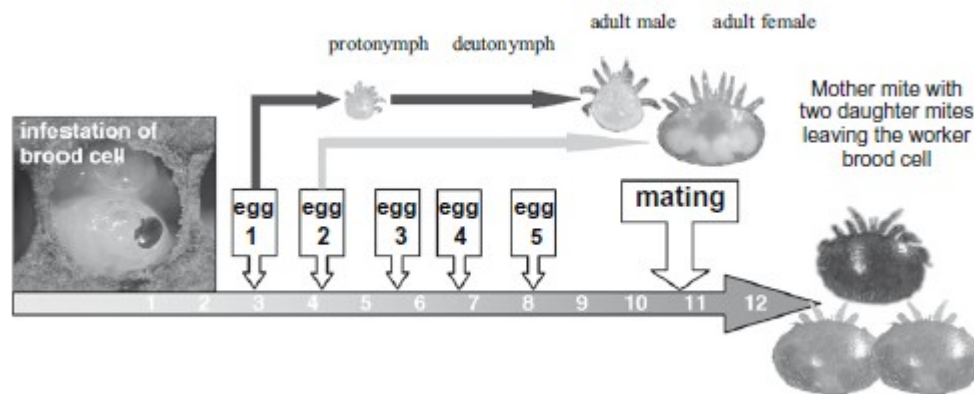
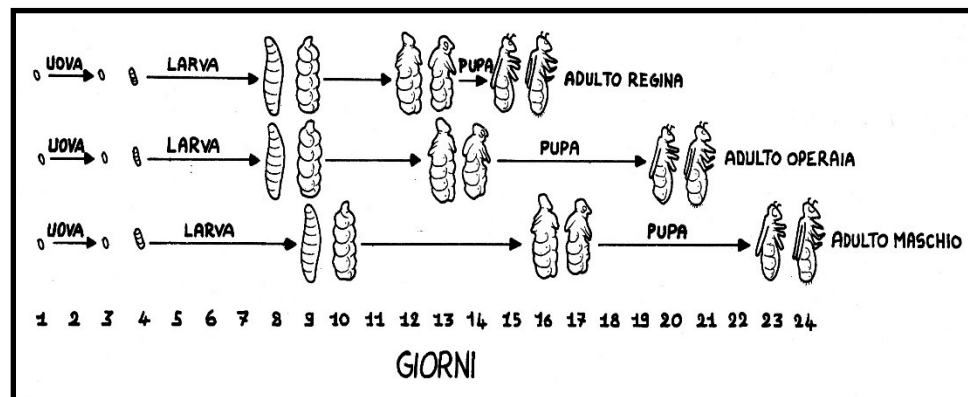


- Fase foretica: api adulte (es. nutrici)



# VARROA: CICLO RIPRODUTTIVO

- Sincronia con il ciclo di sviluppo dell'ape
- Iniziatrice: femmina adulta (semiochimica)
- Cella da fuco vs cella da operaia
- Infestazione singola vs infestazione multipla
- Di norma 2-3 cicli (o anche più)
- Disseminazione delle varroe adulte tramite deriva e soprattutto saccheggio → le famiglie molto parassitate e deboli fungono da fonte di (re)infestazione per le famiglie forti



# VARROA: STADI DI SVILUPPO

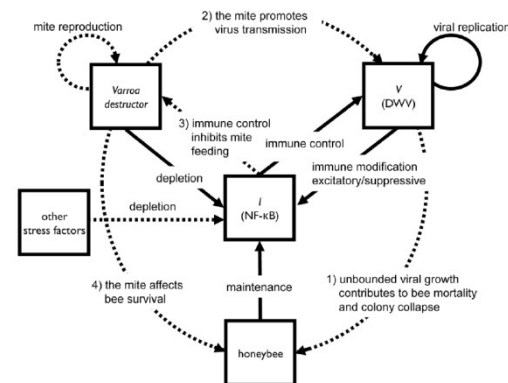
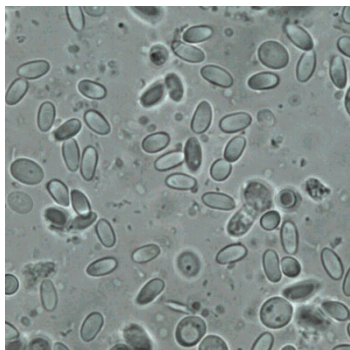
- Uovo
- Larva
- Protoninfa
- Deutoninfa
- Mobile
- Immobile (crisalide)
- Maschio
- Femmina



*P. Rosenkranz et al./Journal of Invertebrate Pathology 103 (2010) S96–S119*

## VARROA: IL PRINCIPALE PROBLEMA DELLE API

- Api adulte: prelievo di emolinfa
- Larve/pupe: prelievo di emolinfa, immunosoppressione, inoculazione di virus (es. DWV)
- Perdita di peso
- Accorciamento della vita (es. api invernali!)
- Ridotta capacità di volo ed orientamento
- Sinergia con altre avversità: virus, pesticidi, Nosema...→CCD





# VARROA: PRINCIPI BASE PER IL CONTROLLO FARMACOLOGICO NELL'APIARIO

- Modalità degli interventi (es. AF, AO): formulazione, somministrazione, integrazione con tecniche apistiche,...
- Numero degli interventi
- Tempistica degli interventi (stagionalità)
- Semplicità e accessibilità dei farmaci
- Alternanza di principi attivi (es. follow up)



# VARROA: PRINCIPI BASE PER IL CONTROLLO FARMACOLOGICO NELL'APIARIO

- Monitoraggio tollerabilità/sicurezza
- Monitoraggio efficacia acaricida
- Monitoraggio residualità in matrici
- Monitoraggio saccheggio/avversità
- Monitoraggio/controllo della sciamatura



# VARROA: LINEE GUIDA EUROPEE PER LE PROVE DI TOLLERABILITA' ED EFFICACIA DI NUOVI FARMACI



15 November 2010  
EMA/CVMP/EWP/459883/2008  
Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP)

Guideline on veterinary medicinal products controlling  
*Varroa destructor* parasitosis in bees

- Titolazione/conferma/studio di campo
- Numero delle famiglie
- Randomizzazione/analisi statistica
- Valutazione di tollerabilità
- Valutazione di efficacia/resistenza

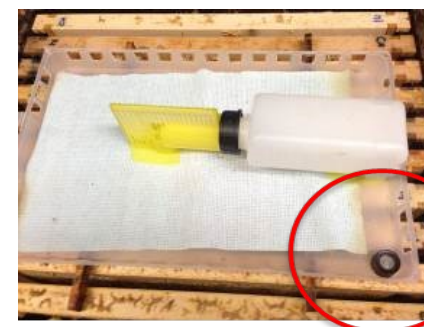
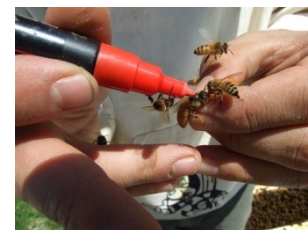
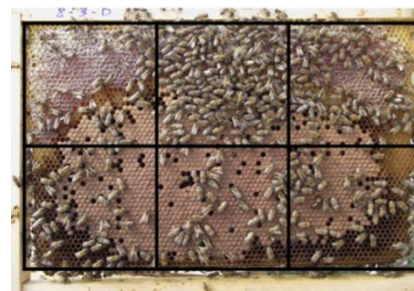
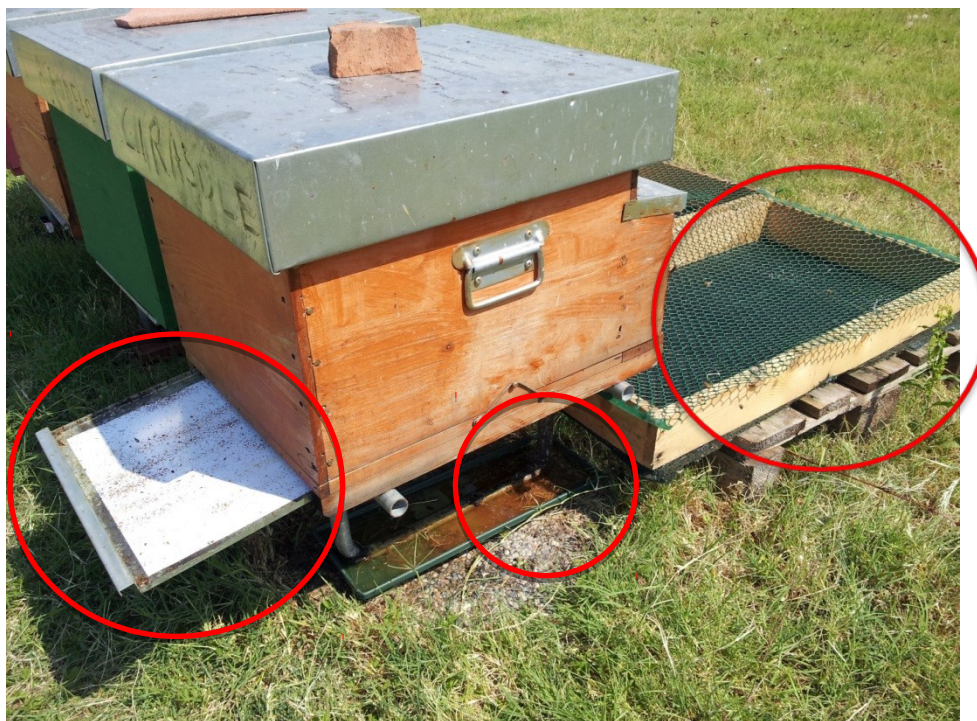


## SOMMINISTRAZIONE DEL TRATTAMENTO: ESEMPIO DI ABBINAMENTO CON TECNICA APISTICA



# TOLLERABILITÀ ED EFFICACIA DEL TRATTAMENTO

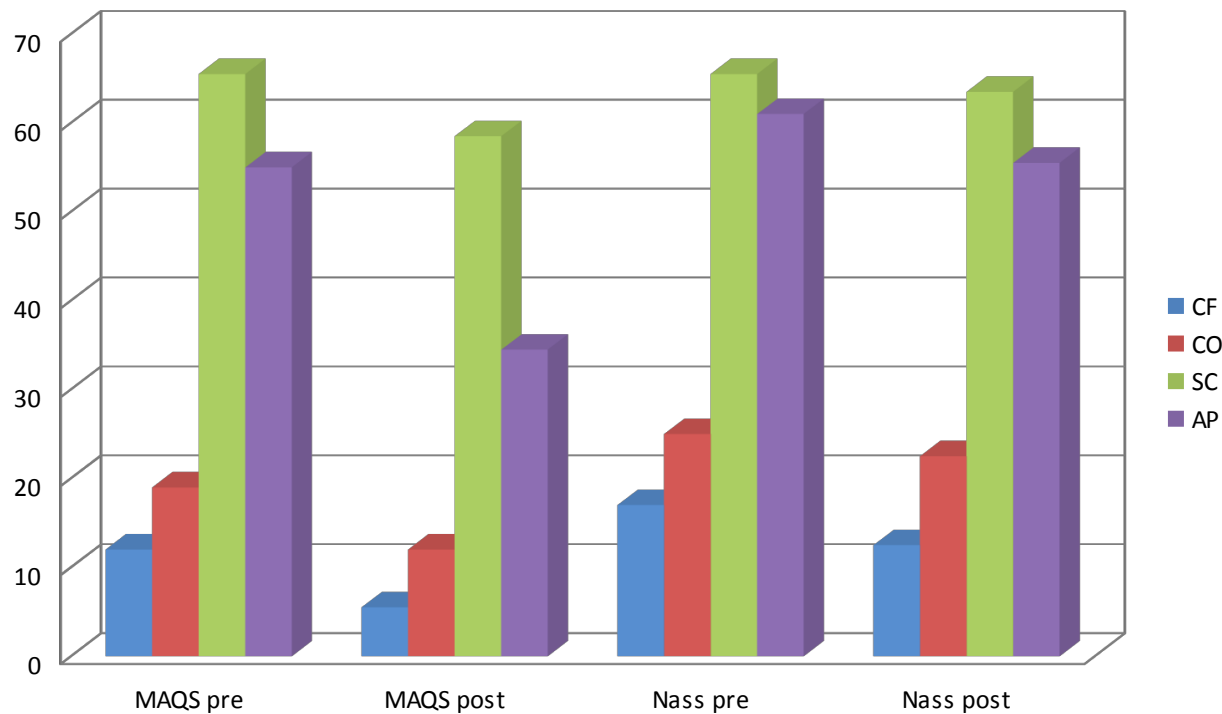
- Valutazione della forza delle famiglie e della salute delle regine
- Monitoraggio della mortalità delle api adulte
- Monitoraggio della mortalità delle varroe foretiche (a volte: anche nella covata)
- Registrazione dei parametri ambientali





# TOLLERABILITÀ: METODO DEI SESTI

All'inizio e alla fine del trattamento:  
valutazione di covata fresca, covata  
opercolata scorte e api adulte



# VALUTAZIONE DELL'INFESTAZIONE

- Caduta naturale/indotta nel cassetto diagnostico → varroa foretica
- Monitoraggio di api adulte con o senza uccisione (es. alcool/acqua saponata vs ZAV) → varroa foretica
- Monitoraggio della varroa nella covata

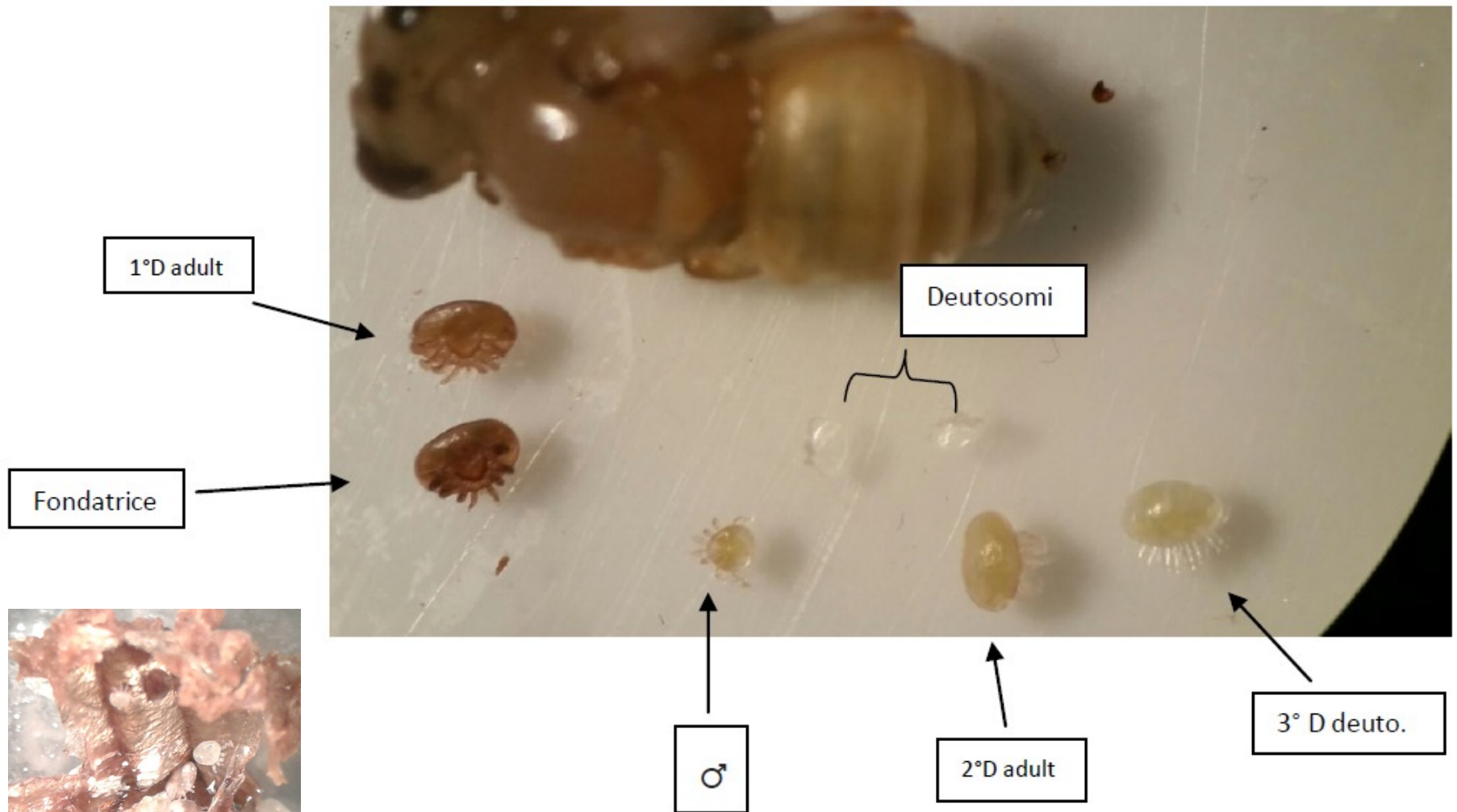


# VALUTAZIONE DELLA EFFICACIA ACARICIDA VS VARROA FORETICA

- **Valutazione della mortalità** dovuta al trattamento (T1)
- **Abbattimento delle varroe residue** tramite trattamento con prodotto acaricida non correlato chimicamente (T2)→caduta totale (T1+T2)
- **Efficacia % di T1 per alveare** rispetto alla caduta totale (T1+T2)
- **Efficacia % media** di T1 nel gruppo di trattamento
- L'efficacia nei due gruppi va confrontata statisticamente, mediante test parametrici o non-parametrici



# VALUTAZIONE DELL'INFESTAZIONE DELLA COVATA



# VALUTAZIONE DI EFFICACIA NELLA COVATA OPERCOLATA

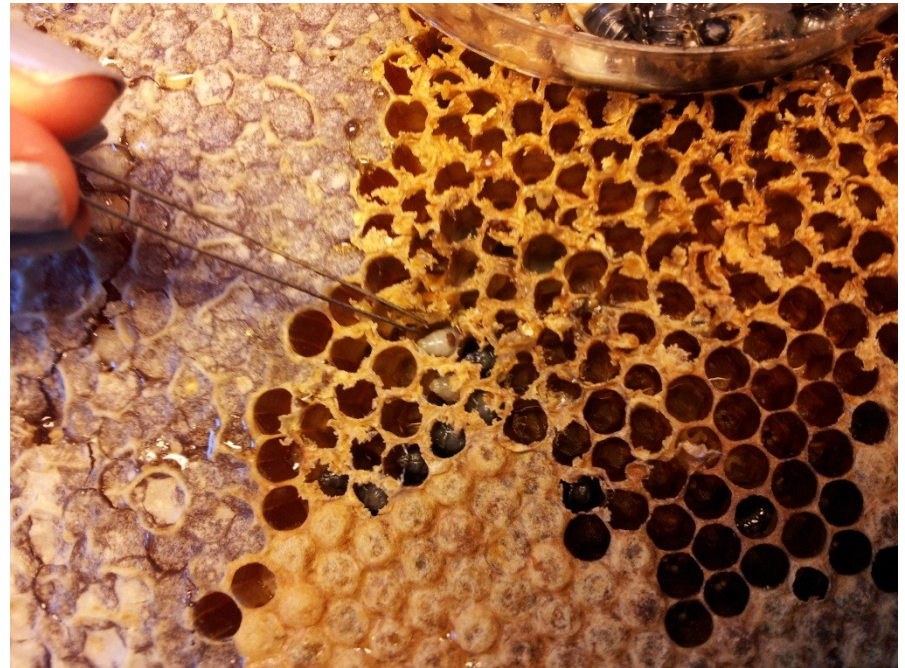
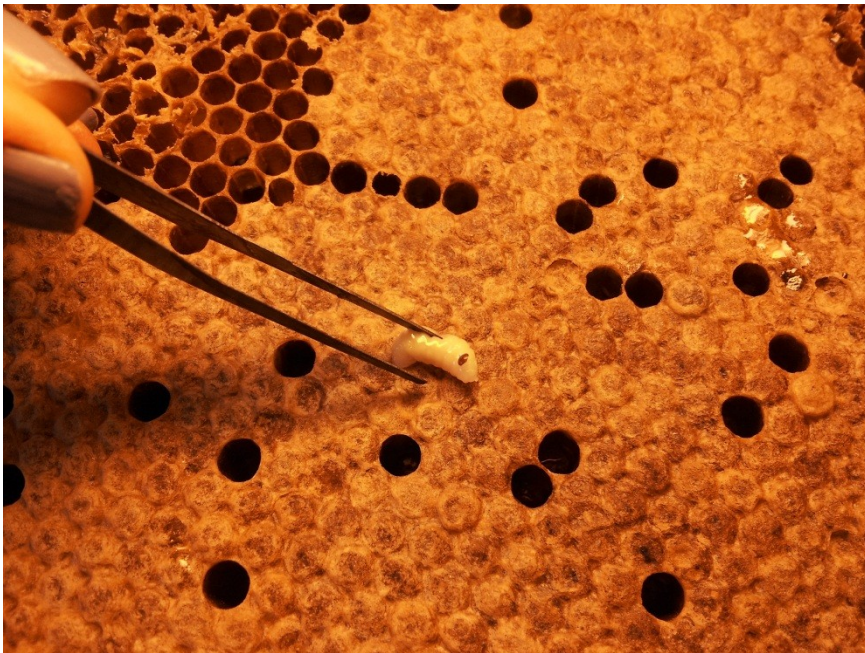
Disopercolazione completa della covata nei favi.....





# VALUTAZIONE DI EFFICACIA NELLA COVATA OPERCOLATA

...e conta delle varroe rinvenute sulla covata (stato di sviluppo – mobilità')



# VALUTAZIONE DI EFFICACIA NELLA COVATA OPERCOLATA

...lavaggio e recupero delle varroe rimaste  
sul fondo delle cellette disopercolate





# VALUTAZIONE DI EFFICACIA NELLA COVATA OPERCOLATA

Prima della  
disopercolatura



Alla fine della  
disopercolatura



*4000-6000 celle per favo....*



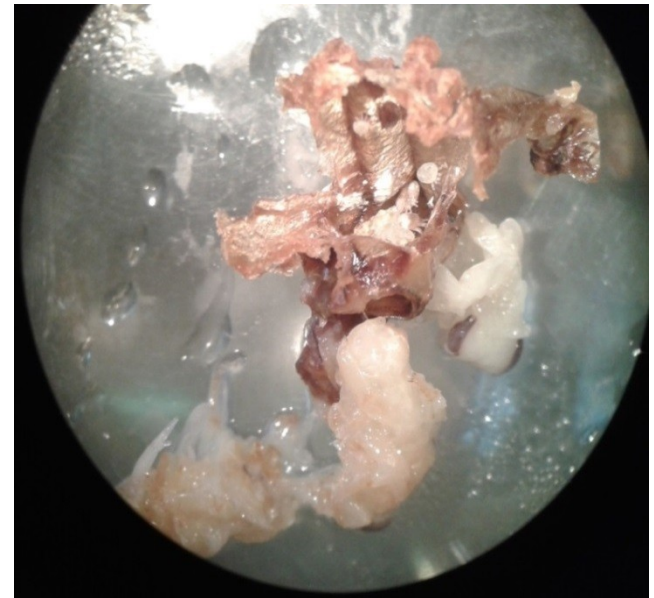
# VALUTAZIONE DI EFFICACIA ANTIVARROA NELLA COVATA

Analisi di 100 celle selezionate random per ciascuna faccia del favo (Trattato vs controllo)

- *Conta delle celle infestate (%)*

Analisi stereomicroscopica di ciascuna cella positiva alla varroa

- *Conta delle varroe*
- *Classificazione dello stadio di sviluppo*
- *Valutazione della motilità*



Stats: TTEST, NPAR1WAY and procedure GLM di SAS™

# Quale impatto dall'uso ripetuto di acaricidi di sintesi nell'alveare?

## Selezione di ceppi di *Varroa* resistenti ai trattamenti...

Apidologie 33 (2002) 357–366  
© INRA/DIB-AGIB/EDP Sciences, 2002  
DOI: 10.1051/apido:2002027

357

Original article

### First report of *Varroa destructor* resistance to pyrethroids in the UK

Helen M. THOMPSON\*, Michael A. BROWN, Richard F. BALL, Medwin H. BEW

Research Article



Received: 15 November 2012    Revised: 30 October 2013    Accepted article published: 4 November 2013    Published online in Wiley Online Library: 15 November 2013

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/ps.3679

### Point mutations in the sodium channel gene conferring tau-fluvalinate resistance in *Varroa destructor*

Jan Hubert,<sup>a</sup> Marta Nesvorna,<sup>a</sup> Martin Kamler,<sup>b</sup> Jan Kopecky,<sup>a</sup> Jan Tyl,<sup>b</sup> Dalibor Titera<sup>b</sup> and Jitka Stara<sup>a\*</sup>

Apidologie 30 (1999) 229–234  
© Inra/DIB/AGIB/Elsevier, Paris

229

Review article

### The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides

Norberto Milani

Parasitol Res (2010) 107:1189–1192  
DOI 10.1007/s00436-010-1986-8

ORIGINAL PAPER

### Resistance phenomena to amitraz from populations of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* of Argentina

Matías D. Maggi · Sergio R. Ruffinengo · Pedro Negri · Martín J. Eguaras

# Quale impatto dall'uso ripetuto di acaricidi di sintesi nell'alveare?

... aumentata presenza di residui nelle matrici dell'alveare con effetti negativi sulla salute delle api...

OPEN ACCESS Freely available online



## Field-Level Sublethal Effects of Approved Bee Hive Chemicals on Honey Bees (*Apis mellifera* L)

Jennifer A. Berry<sup>1</sup>, W. Michael Hood<sup>2</sup>, Stéphane Pietravalle<sup>3</sup>, Keith S. Delaplane<sup>1\*</sup>

Apidologie  
© INRA/DIB-AGIB/EDP Sciences, 2010  
DOI: [10.1051/apido/2010018](https://doi.org/10.1051/apido/2010018)

Available online at:  
[www.apidologie.org](http://www.apidologie.org)

Review article

Pesticides and honey bee toxicity – USA\*

Reed M. JOHNSON<sup>1</sup>, Marion D. ELLIS<sup>1</sup>, Christopher A. MULLIN<sup>2</sup>, Maryann FRAZIER<sup>2</sup>

Journal of Insect Physiology 58 (2012) 613–620



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Insect Physiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jinsphys](http://www.elsevier.com/locate/jinsphys)



Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*

Humberto Boncristiani<sup>a,b</sup>, Robyn Underwood<sup>c,1</sup>, Ryan Schwarz<sup>a</sup>, Jay D. Evans<sup>a</sup>, Jeffery Pettis<sup>a</sup>, Dennis vanEngelsdorp<sup>c,\*</sup>

# Quale impatto dall'uso ripetuto di acaricidi di sintesi nell'alveare?

...e potenziali effetti sinergici con altri acaricidi, agrochimici e patogeni dell'alveare

APICULTURE AND SOCIAL INSECTS

## Synergistic Interactions Between In-Hive Miticides in *Apis mellifera*

REED M. JOHNSON,<sup>1</sup> HENRY S. POLLOCK, AND MAY R. BERENBAUM

Department of Entomology, 320 Morrill Hall, University of Illinois, 505 S. Goodwin, Urbana, IL 61801-3795

OPEN ACCESS Freely available online



Garrido et al. *Vet Res* (2016) 47:51  
DOI:10.1186/s13567-016-0335-z



## High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health

Christopher A. Mullin<sup>1\*</sup>, Maryann Frazier<sup>1</sup>, James L. Frazier<sup>1</sup>, Sara Ashcraft<sup>1</sup>, Roger Simonds<sup>2</sup>, Dennis vanEngelsdorp<sup>3</sup>, Jeffery S. Pettis<sup>4</sup>

### RESEARCH ARTICLE

Open Access



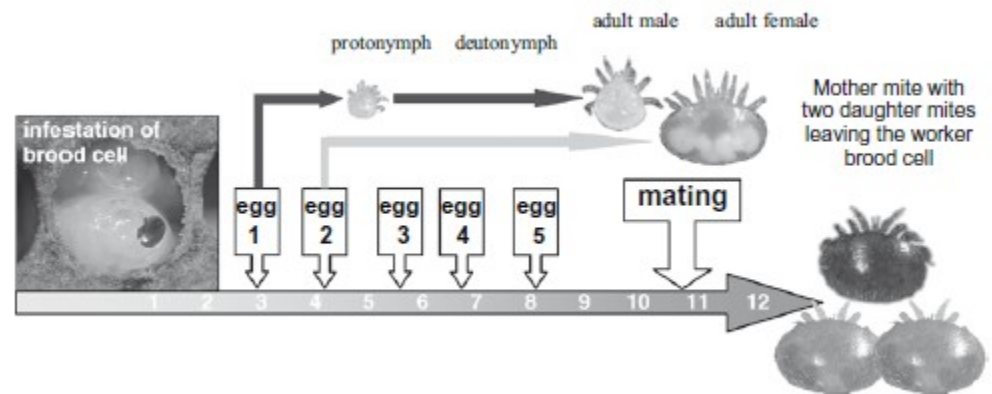
Sublethal effects of acaricides and *Nosema ceranae* infection on immune related gene expression in honeybees

Paula Melisa Garrido<sup>1\*</sup> , Martín Pablo Porrini<sup>1</sup>, Karina Antúnez<sup>2</sup>, Belén Branchiccela<sup>2</sup>, Giselle María Astrid Martínez-Noël<sup>3</sup>, Pablo Zunino<sup>2</sup>, Graciela Salerno<sup>3</sup>, Martín Javier Eguaras<sup>1</sup> and Elena Ieno<sup>4</sup>

# ***Perché promuovere l'uso di acaricidi di origine naturale?***

- Promozione di pratiche integrate in grado di ridurre:

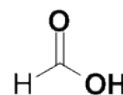
- 1. i trattamenti convenzionali di sintesi chimica*
- 2. il carico di varroa nella covata*





# ***Come aumentare la disponibilita' di acaricidi naturali?***

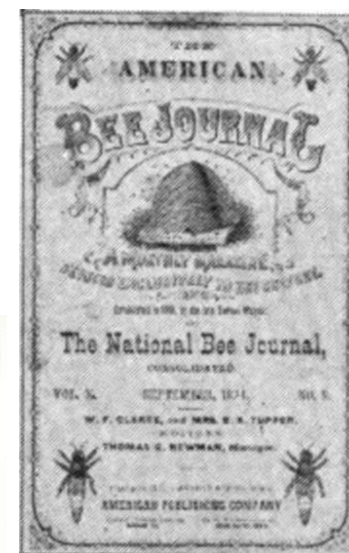
- Miglioramento dei protocolli esistenti per l'impiego di prodotti registrati: il caso dell'acido formico liquido (AF)



Chemical Formula:  $\text{CH}_2\text{O}_2$   
Molecular Weight: 46.03

## ***Trials (and Tribulations) With Formic Acid for Varroa Control***

by DR. FRANK A. EISCHEN  
Research Entomologist  
USDA-ARS



American Bee Journal October 1998

# ACIDO FORMICO VS VARROA

## *Caratteristiche principali*

- Agisce per evaporazione (veloce vs lenta)
- Differenti supporti di evaporazione (liquido, strip di gel, ecc.)
- Bassa residualità nelle matrici apistiche
- Potenzialmente in grado di uccidere sia la varroa foretica che gli acari nelle celle di covata

# ASPETTI PARTICOLARI DEL TRATTAMENTO CON PRODOTTI A BASE DI ACIDO FORMICO: efficacia

- a) temperatura ambientale che deve permettere una sufficiente evaporazione del principio attivo (lenta vs rapida) durante tutto il periodo di trattamento
- [Esposizione totale= (concentrazione x tempo)]
- b) quantità della covata opercolata presente, che può proteggere la varroa riproduttiva dagli effetti del trattamento
- c) forza della famiglia e relativa intensità di ventilazione
- d) metodo di applicazione, soprattutto in relazione alle modalità di evaporazione

# **ASPETTI PARTICOLARI DEL TRATTAMENTO CON PRODOTTI A BASE DI ACIDO FORMICO: tollerabilità**

- Possibili effetti collaterali anche severi:
- a) diminuzione della popolazione di api
- b) arresto della deposizione da parte della regina→ripresa al termine del trattamento
- c) perdita della regina→verificare nascita nuova regina
- d) allontanamento delle api dall'arnia
- e) possibile interruzione forzata del trattamento

# ASPETTI PARTICOLARI DEL TRATTAMENTO CON PRODOTTI A BASE DI ACIDO FORMICO: ambiti applicativi

- **Bassa affidabilità** come trattamento principale a causa della variabilità nell'efficacia e nella tollerabilità



- **Alta flessibilità** di utilizzo grazie alla disponibilità di diverse formulazioni e modi di applicazione

- → Trattamento tampone (es. primavera/autunno)?



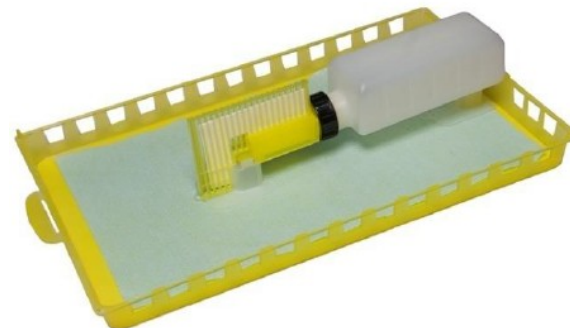
# **ACIDO FORMICO VS VARROA**

## ***aspetti chiave nelle prove in campo***

- **Verificare variabilità di efficacia e tollerabilità in relazione a:**
  1. Temperatura e umidità relativa ambientali
  2. Formulazione
  3. Dosaggio
  4. Efficacia del dispenser (per formulazioni liquide)
  5. Forza della colonia
  6. Volume di evaporazione (tipo di arnia, melario, ecc.)

# SVILUPPO E REGISTRAZIONE DI NUOVI FARMACI ANTIVARROA: ACIDO FORMICO

- Diverse formulazioni:
- Gel a contenuto alto e trattamento veloce: MAQS
- Gel a contenuto inferiore e trattamento prolungato: VarTerminator
- Liquido → Apifor60 con modalità di trattamento diverse in base al tipo di evaporatore (~acido ossalico per sublimazione)



# ACIDO FORMICO VS VARROA

## *Trials collaborativi*

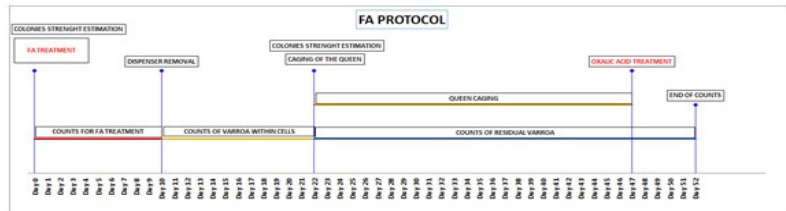
**Prova di campo con Acido Formico in Nord Italia/2015**

**Formulazione 60 % Liquido vs MAQS**

*Michele Mortarino - Giovanni Prestini - Livio Colombari – Giovanni Formato*

Varroa Control Task Force-WG4 meeting - Unje, 19th-20th 2016

### 2. "SHORT-TERM PROTOCOL"

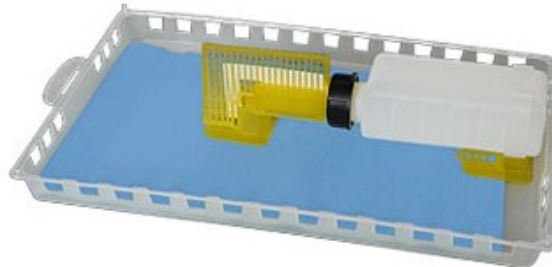


efficacy of the treatment is realized at the end of the formic acid administration (varroa survived counts)

## **Varroa Control Task Force-WG4 Activity (coordinators: B. Dainat- G. Formato):**

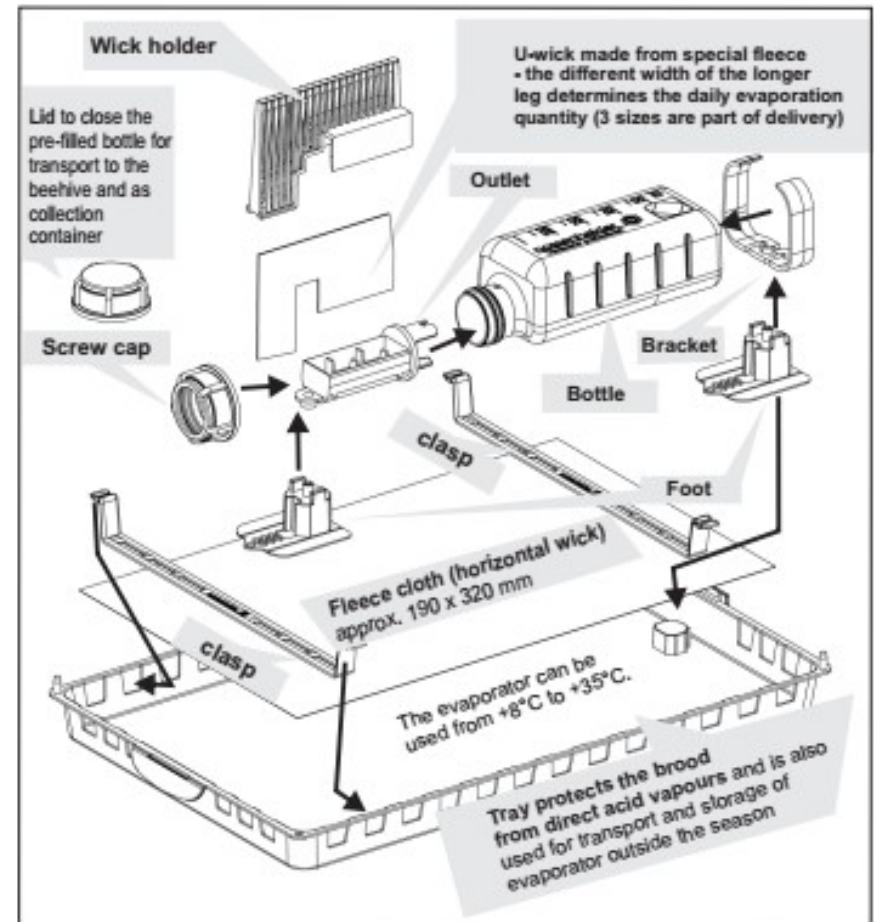
a common COLOSS protocol to run FA trials through all the European climate gradient from North to South

# EVAPORATORE: NASSENHEIDER PROFESSIONAL



60 % AF per 10/14 giorni

Colony size / hive type	Daily doses	Filling / Requirement
6-9 honeycombs / offshoot	6-10 ml	140 ml
DNM/ Zander	10-15 ml	180 ml
Dadant DNM/ Zander two	20-25 ml	290 ml (fill completely)

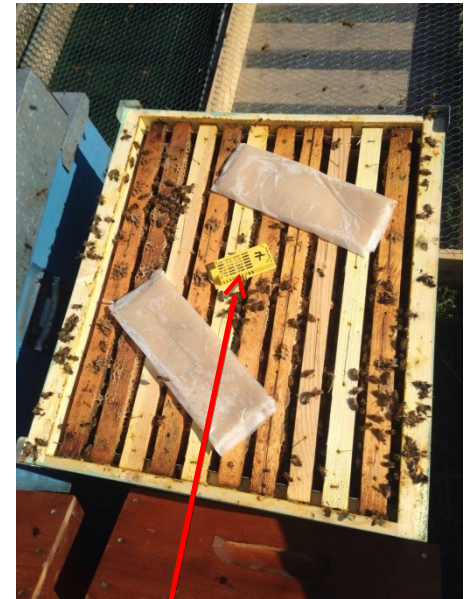




# APIARIO TEST

- 25 alveari totali (Calco, Lecco –Nord Italia)
  - 6 Nassenheider-pro
- 18 alveari trattati
  - 3 TESTI
    - 6 MAQS
    - 6 Controlli non trattati
- Arnie Dadant/Blatt a 10 favi

# I TRATTAMENTI

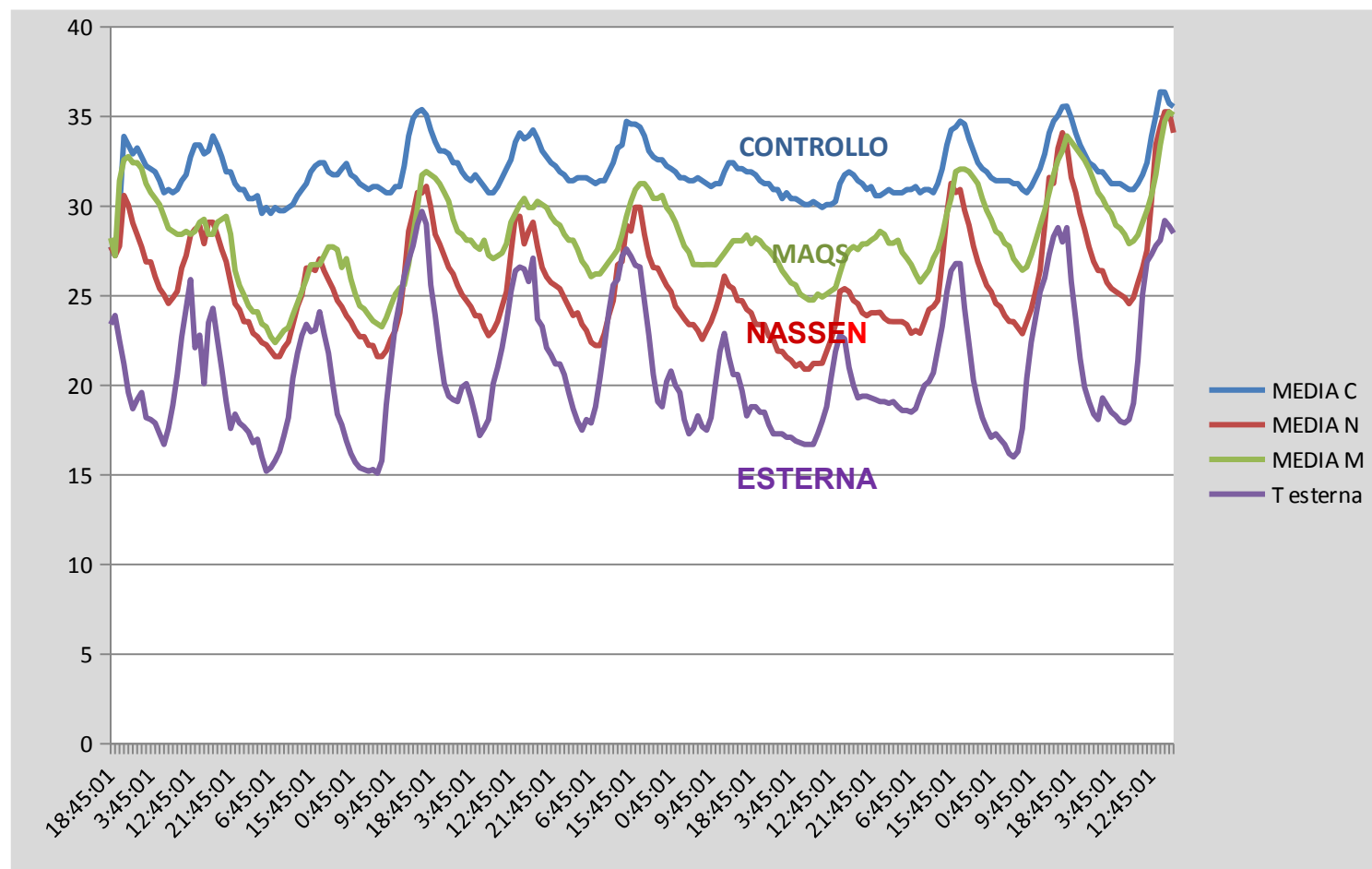


Datalogger (dentro una gabbietta da introduzione)

## ARTICOLAZIONE DELLA PROVA

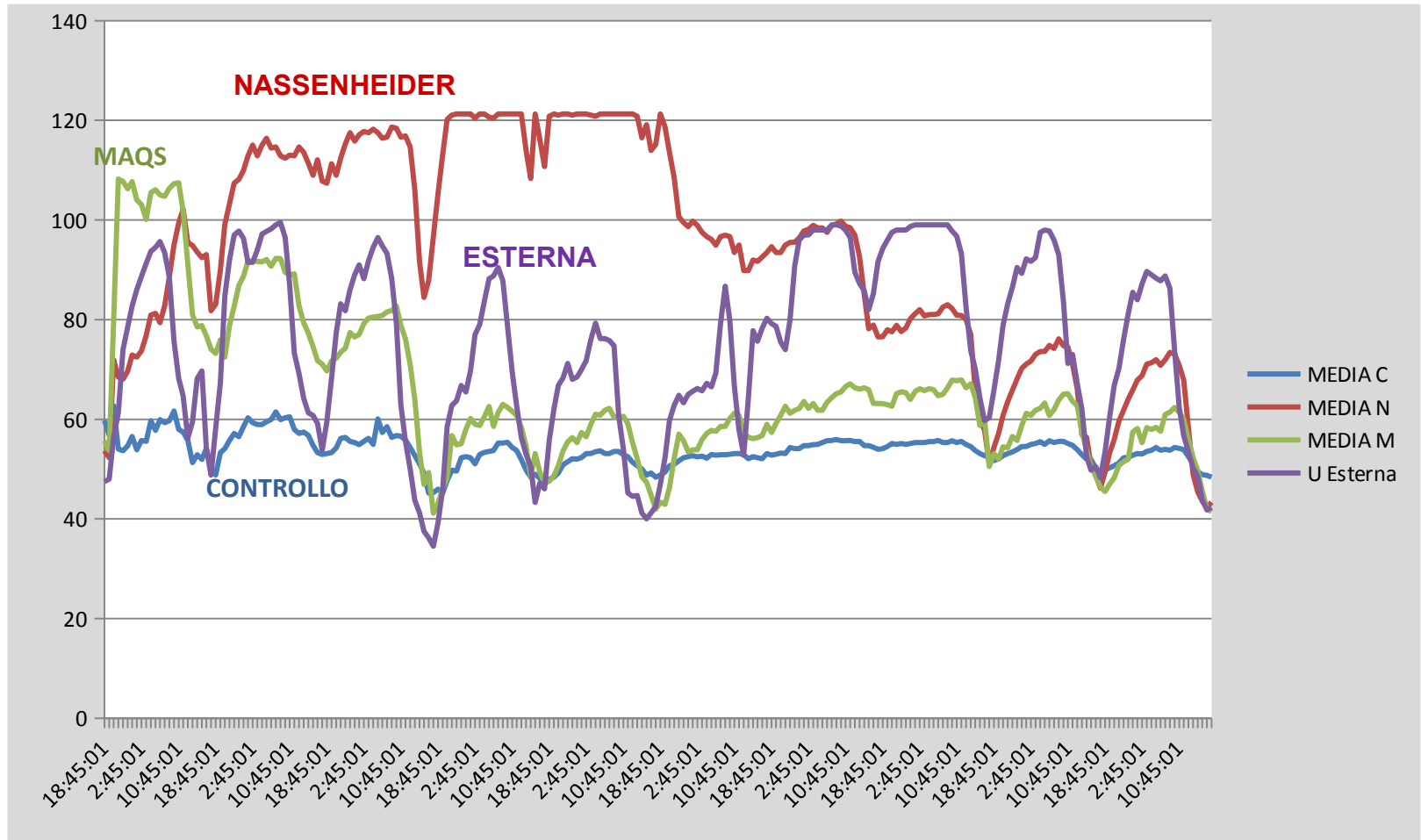
- Giorno -3: valutazione della forza delle famiglie/ZAV
- Giorno 0: trattamento / inizio registrazione della caduta di varroe/ datalogger (3 per ciascun gruppo) / underbasket
- Giorno 16: valutazione della forza delle famiglie/ ingabbiamento regine
- Giorno 38: liberazione regine / trattamento con Apibioxal gocciolato
- 
- Giorno 48 : fine della prova

# TEMPERATURA MEDIA NEGLI ALVEARI DURANTE IL TRATTAMENTO

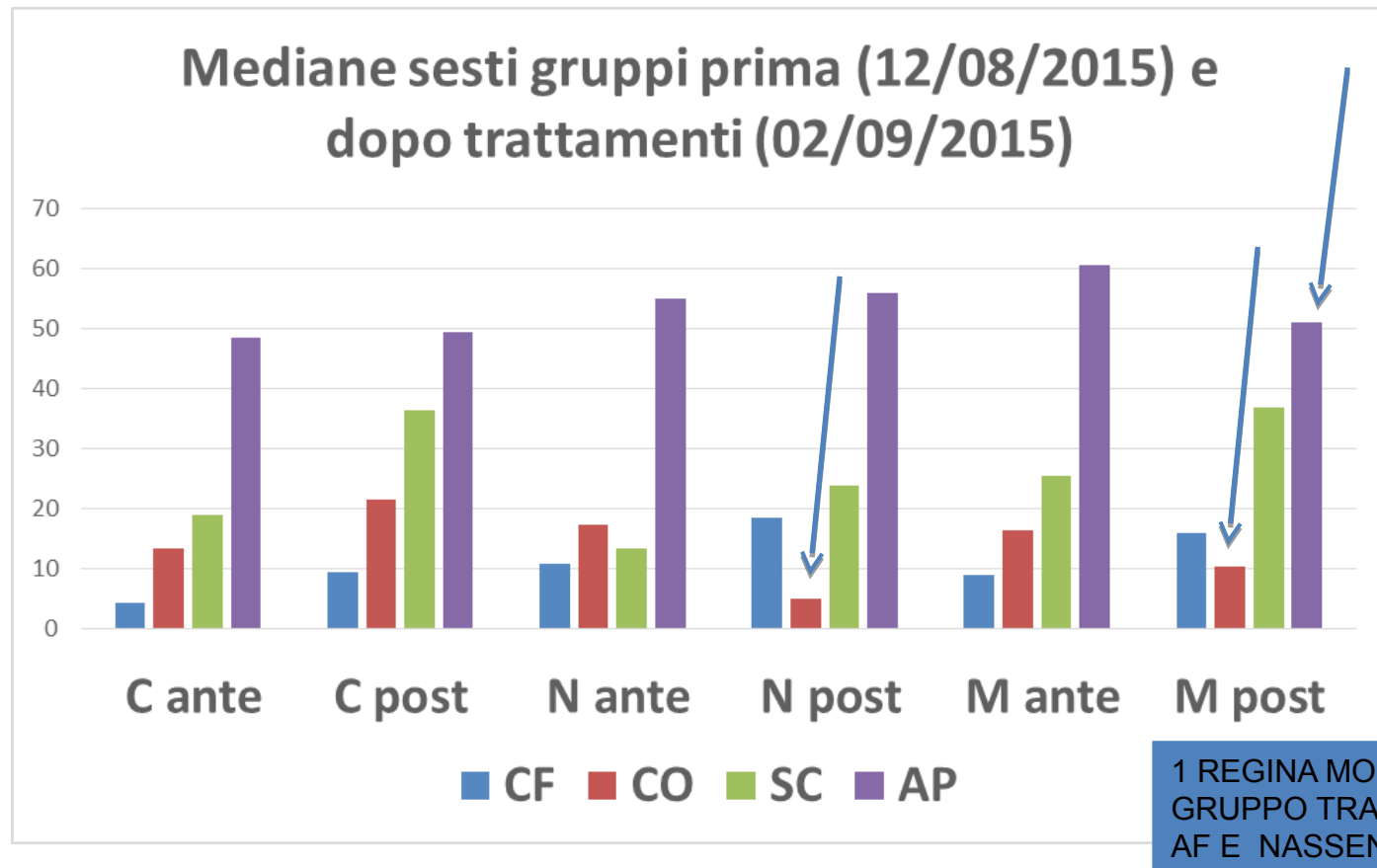




# UMIDITA' REL. MEDIA NEGLI ALVEARI DURANTE IL TRATTAMENTO

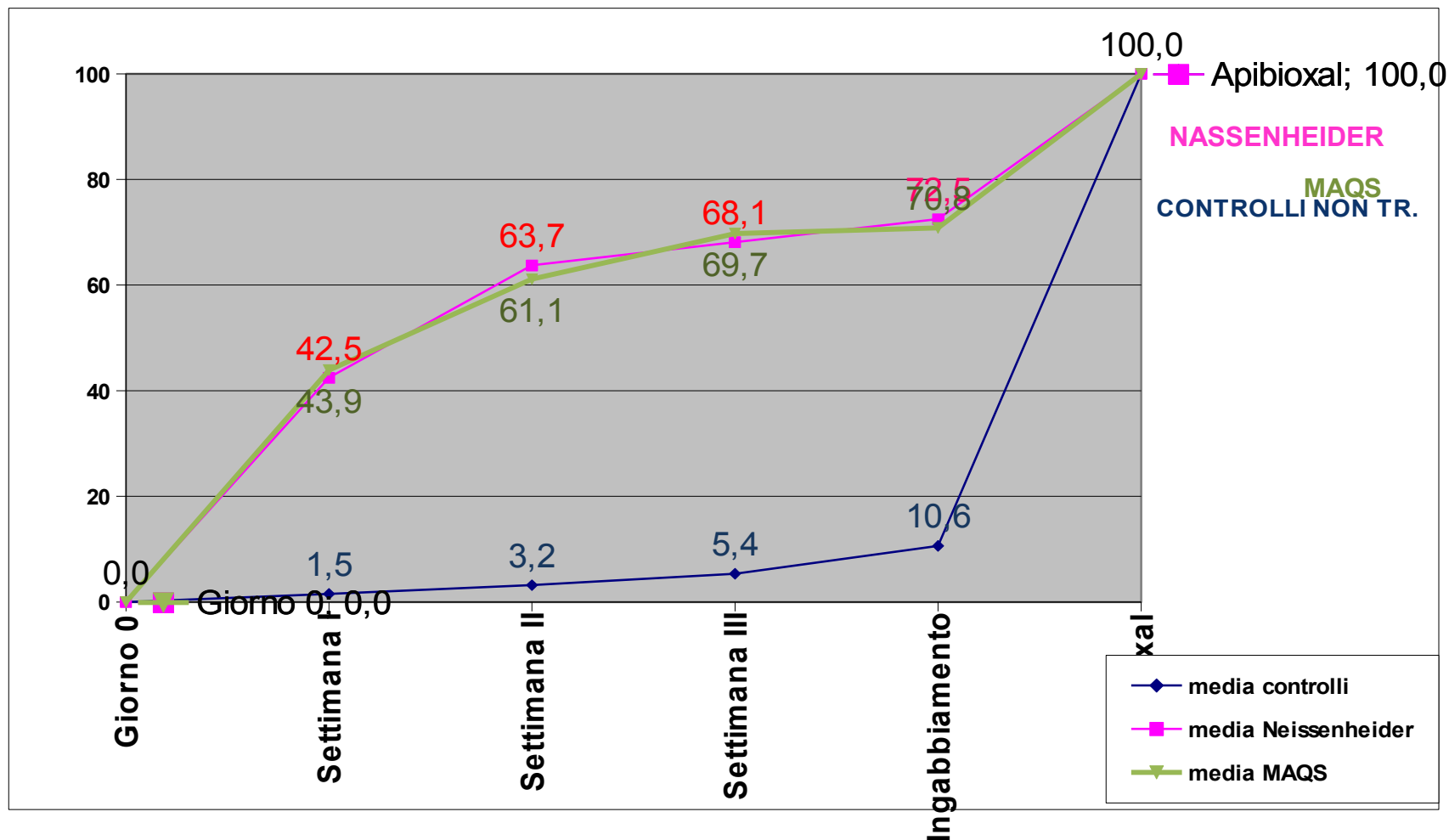


# FORZA DELLE FAMIGLIE PRE-POST TRATTAMENTO



CF: cov. fresca–CO: cov. Opercol.–SC: miele/polline–AP: api adulte

# EFFICACIA % CUMULATIVA MEDIA



# RISULTATI DELLA PROVA maggio 2016: TOLLERABILITA'

## *Mortalità delle api adulte e delle regine*

NASSENH	MORTALITA' TOTALE	MAQS	MORTALITA' TOTALE
NASSENH 1	780	MAQS 1	942
NASSENH 2	650	MAQS 2	984
NASSENH 3	323	MAQS 3	2023
NASSENH 4	570	MAQS 4	1117
NASSENH 5	406	MAQS 5	1182
NASSENH 6	325	MAQS 6	526
NASSENH 7	459	MAQS 7	1909
NASSENH 8	185	MAQS 8	202
NASSENH 9	350	MAQS 9	718
NASSENH 10	375	MAQS 10	767
<b>Media±DevSt NASSENH</b>	<b>442 ± 177</b>	<b>Media±DevS t MAQS</b>	<b>1037 ± 568</b>



**Nassenheider: 1 orfanità**  
**MAQS: 3 orfanità**

***p=0.007***



## **AF liquido vs varroa: CONCLUSIONI**

- Prove di campo collaborative → continuare su larga scala per una migliore conoscenza dei parametri intra-colonia ed ambientali (microclima) che influenzano la tollerabilità e l'efficacia
- NP: rilascio modulabile con ridotta dipendenza dalle condizioni di T° e RH

# *Grazie per l'attenzione*

