

L'immunocompetenza antibatterica delle api da miele (*Apis mellifera*) è un adattamento ai diversi stadi della vita ed ai rischi ambientali

di Heike Gätschenberger, Klara Azzami, Jürgen Tautz, Hildburg Beier [«PlosOne» 6-2013]

Abstract (Traduzione): Lo sviluppo di tutte le caste di api avviene attraverso tre diversi stadi dell'esistenza nei quali si incontrano infezioni microbiche di differenti intensità. Abbiamo esaminato lo sforzo immunitario delle api in tutte le fasi di sviluppo con particolare attenzione rivolta all'espressione temporale di risposte immunitarie cellulari e umorali indotte artificialmente con l'introduzione del batterio *Escherichia coli*. Abbiamo utilizzato una vasta gamma di metodi per studiare le strategie di difesa degli individui infetti: (a) destino dei batteri nei vasi (emocele), (b) formazione di noduli, (c) espressione di peptidi antimicrobici (AMPS). Recentemente è risultato che operaie e fuchi sono in grado di attivare in modo efficiente tutte le risposte immunitarie esaminate. Il numero di batteri vitali in circolazione nell'emocele delle api infette è diminuito rapidamente di più di due ordini di grandezza all'interno delle prime 4-6 ore dopo l'iniezione infettante, in coincidenza con la comparsa di noduli di melanizzazione. L'attività antimicrobica, dall'altra parte, è risultata rilevabile solo dopo il passaggio batterico iniziale. Questi due *pattern* temporali di reazioni di difesa probabilmente rappresentano la risposta immunitaria cellulare e quella umorale indotta. Una caratteristica unica delle api da miele è che una parte di operaie sopravvive nel corso della stagione invernale formando un glomere e queste api sono pertanto impegnate nella termoregolazione. Mostriamo in questo studio che lo sforzo immunitario complessivo delle api invernali corrisponde a quello prodotto da giovani api in estate, anche se in questo caso le reazioni nodulari non si avviano affatto. Come previsto, dosi elevate di batterio E. coli non hanno causato alcuna mortalità nelle larve o negli adulti di ogni età. Tuttavia i fuchi e le pupe di operaia soccombono ad E. coli anche a bassi dosaggi, e le pupe presentano una colorazione scura prematura. In contrasto con quanto abbiamo osservato nelle larve e negli adulti, non abbiamo osservato alcuna circolazione rapida di batteri vitali e nessuna espressione di AMPS, ma si è registrata una rapida proliferazione di batteri di E. coli nell'emocele delle pupe, proliferazione che induce alla loro morte.

Introduzione (Traduzione): Così come è peculiare agli insetti eusociali, le api da miele (*Apis mellifera*) presentano famiglie composte da tre caste. Nelle regioni a clima temperato, nella stagione estiva, una singola regina (femmina fertile) si trova a coabitare con fino a 50.000 operaie (femmine sterili) e circa 2.000 fuchi (maschi). Operaie, regine e fuchi differiscono notevolmente nelle caratteristiche morfologiche,

fisiologiche e comportamentali. La peculiarità delle api è costituita dal loro modo specifico di sopravvivenza alla stagione invernale rispetto ad altri insetti eusociali. Nelle api da miele, la maggior parte delle operaie non muore in autunno (come avviene nei bombi) o non si ritirano in grotte al riparo dal gelo (come le formiche e le termiti), ma da circa 1/5 a 1/10 dei membri della colonia formano un glomere quando le temperature scendono. La termoregolazione del glomere in inverno si ottiene sia attraverso l'isolamento dovuto ad un fitto "mantello" di api nella zona più esterna del glomere, sia attraverso la produzione di calore endotermico prodotto da api che si trovano nella parte più interna e generano calore vibrano i loro muscoli adibiti al volo. Le api estive e quelle invernali differiscono sotto molti profili, marcatamente quello della longevità. In estate le api vivono dai 20 ai 40 giorni, mentre le api invernali rimangono in vita fino a 230 giorni. Tutte e tre le caste di api da miele passano attraverso tre diverse fasi di sviluppo dopo la schiusa dell'uovo: larva, pupa, adulto. Le larve di tutte e tre le caste lasciano l'uovo dopo un lungo periodo embrionale di tre giorni, ma successivamente il percorso di sviluppo delle operaie, delle regine e dei fuchi è molto diverso tra loro. La fase larvale è caratterizzata da un periodo di costante alimentazione da parte delle nutrici. Durante la prima fase di sviluppo, le larve di entrambe le caste femminili sono nutrite con pappa reale, una secrezione prodotta dalle ghiandole ipofaringee, presenti nella testa delle operaie adulte. Negli stadi larvali successivi, la pappa reale viene mantenuta come dieta unica della regina, mentre una miscela di secrezioni ghiandolari mescolate con polline e miele è riservata alle larve di operaie. L'alimentazione differenzia geneticamente le larve e regola la differenziazione di casta; e ciò che determina a livello molecolare questo fenomeno include percorsi e componenti diverse. La fine della fase larvale è segnata dall'inizio della sua evoluzione che consiste in una complessa riorganizzazione delle strutture larvali. Dopo la trasformazione in pupa, questa subisce una serie di cambiamenti nella pigmentazione degli occhi composti e del corpo fino allo sfarfallamento. Al fine di combattere le infezioni microbiche, le api da miele, come tutti gli insetti, si affidano esclusivamente sulle risposte immunitarie innate che si basano su una risposta cellulare e su una risposta immunitaria umorale. Un totale di quattro tipi di segnali a cascata contribuiscono alla costituzione dell'immunità innata, due dei quali sono denominati Toll e Imd, e giocano un ruolo chiave nella regolazione della trascrizione del target dei geni codificanti i peptidi antimicrobici (AMPS). Sono solitamente attivati da elementi capaci di determinare una reazione immunitaria e che sono solitamente conservati nella parte cellulare dei microbi, come i lipopolisaccaridi o peptidoglicani. I corpi grassi situati all'interno della cavità del dorso degli insetti sono il principale tessuto immunitario, reattivo per la sintesi e la secrezione di AMPS in tutte le reazioni umorali. Il recente

sequenziamento del genoma delle api da miele ha facilitato il confronto con i dati genomici di altri insetti che possiedono con le api omologhi sistemi della complessa reazione immunitaria umorale. Inoltre, in uno studio di Casteels et al. sono stati scoperti ed individuati una serie di AMPS specifici delle api presenti nell'emolinfa delle operaie adulte in reazione al batterio E. coli, e questi sono abecina, apidecina, imenoptecina, defensina 1. Successivamente, è stato rivelato da studi sul RNA che l'espressione di imenoptecina e abecina ma non di defensina 1 è mediato da una reazione a cascata di Imd. Recentemente, abbiamo studiato le reazioni di difesa delle operaie e dei fuchi ed abbiamo avuto conferma in vivo dell'espressione di AMPS nell'emolinfa in seguito all'attacco batterico! Benché siano disponibili una certa quantità di informazioni relative alla risposta immunitaria, poco si sa circa il sistema immunitario cellulare delle api da miele. La risposta immunitaria cellulare comprende la guarigione della ferita, la fagocitosi, la nodulazione e l'incapsulamento dell'intruso. Tutte queste reazioni sono mediate da cellule presenti nell'emolinfa dell'insetto, gli emociti. Essi fagocitano i batteri, intrappolano i microbi in capsule (noduli) e possono racchiudere anche grandi parassiti. Gli emociti sono classificati per la loro morfologia e fisiologia e variano notevolmente nei diversi ordini in cui gli insetti sono suddivisi. Nei Lepidotteri, sono state classificati fino a 5 diversi tipi, mentre nei Ditteri sono presenti da 3 a 4 emociti differenti. I primi studi volti a caratterizzare gli emociti delle api da miele hanno rivelato tre diverse tipologie, ma le loro diverse funzioni nella risposta immunitaria cellulare sono sconosciute. Solo le reazioni nodulari sono state studiate, in qualche misura, nelle api. È stato dimostrato che la formazione di noduli poteva venire indotta in operaie appena sfarfallate ed infettate artificialmente batteri liofilizzati di *Serratia marcescens* e nei giovani adulti di operaie e fuchi la stessa reazione è stata indotta da infezioni artificiali di E. coli. Studi sulla immunocompetenza delle api considerate in diverse fasi della propria vita e nelle diverse caste hanno rivelato delle differenze nelle reazioni di difesa. Abbiamo scoperto che i fuchi e le larve di operaie rispondono con una forte reazione umorale all'aggressione batterica indotta artificialmente, con una produzione di AMPS specifici delle api. Degno di nota è che gli adulti appena sfarfallati – ma non le larve – hanno inoltre reagito con una sovra-regolazione di alcune proteine, tra le quali quelle facenti parte della famiglia dei carbossilesterasi e proteine di riconoscimento di peptidoglicani. Inoltre, abbiamo scoperto che l'impatto di un'infezione di virus della paralisi acuta (APV) differisce considerevolmente tra larve di operaie ed operaie adulte. Api adulte sopravvivono ad una dose maggiore di particelle ABPV per un periodo più lungo post-infezione rispetto alle larve, che inoltre rispondono all'infezione virale con un ritardo di crescita e cambiamenti morfologici del corpo larvale. In questa ricerca, abbiamo ampliato le nostre conoscenze sulle competenze

del sistema immunitario delle caste di api ponendo particolare attenzione sul modello temporale di risposta immunitaria cellulare e umorale rispetto agli attacchi batterici. Inoltre, abbiamo studiato le strategie di difesa delle pupe di api da miele e quella delle api invernali, la cui competenza immunitaria era fino ad ora del tutto sconosciuta. Da un lato, abbiamo verificato che le pupe - il cui sviluppo in ape adulta avviene in celle di covata sigillate e sottoposte a temperature controllate con precisione - possiedono una capacità immunitaria limitata. Con nostra sorpresa, abbiamo verificato che le pupe di operaie e fuchi sono totalmente incapaci di attivare delle risposte immunitarie umorali o cellulari a seguito di infezione batterica indotta artificialmente. Dall'altra parte, abbiamo scoperto che le api raccolte in glomere conservano importanti componenti del sistema immunitario innato e sono quindi in grado di contrastare efficacemente l'infezione microbica.

Discussione (Traduzione): Negli ultimi due decenni le api hanno attirato una speciale attenzione a causa della catastrofica perdita delle colonie in tutto il mondo. In Europa, i problemi sono iniziati con l'introduzione dell'acaro ectoparassita *Varroa destructor* che ha comportato una nuova e maggiore acquisizione di virulenza dei virus. Negli USA, la sindrome del collasso degli alveari (CCD) è un fenomeno caratterizzato da un abbandono ancora inspiegabile della popolazione di api operaie di un alveare, ed ha comportato una perdita di famiglie che varia dal 50 al 90%. Nel contesto di un aumento della mortalità delle singole api mellifere e/o della perdita di intere colonie, è stato spesso ipotizzato che il sistema immunitario delle api venga compromesso o addirittura soppresso. Tutto ciò solleva una questione relativa alla definizione di competenza del sistema immunitario globale e dei parametri accertati ad esso correlati. Infatti vengono considerate valutazioni molto differenti per determinare la resistenza immunitaria delle singole api, dal conteggio degli emociti, alla quantificazione dei corpi grassi, alla risposta di incapsulamento, all'attività degli anti-ossidanti, fino agli studi sulla regolazione dei geni specifici coinvolti nella regolazione delle reazioni umorali. Per quanto riguarda le api, la definizione di competenza immunitaria è ulteriormente ostacolata dall'esistenza di caste differenti e dallo sviluppo di stadi variabili rispetto alla stagione estiva ed invernale. In uno studio completo abbiamo esaminato e confrontato l'immunocompetenza di fuchi ed operaie rispetto ai diversi stadi che interessano la loro esistenza e rispetto alle reazioni cellulari ed umorali. I nostri risultati dimostrano con chiarezza che le api si sono adattate alle infezioni microbiche, come è ragionevole che sia, in base alle loro esigenze. Per assicurarci di poter studiare la risposta immunitaria in individui sani prodotta da infezioni indotte artificialmente, abbiamo preso alcune precauzioni: (a) sono state selezionate api sane esenti da peste americana ed europea, ed inoltre con livelli di infestazione di *varroa* mantenuti a livelli molto bassi da un apicoltore

professionista; (b) lo studio della coltivazione ed infezione in vitro di operaie e fuchi è avvenuta in condizioni sterili; (c) le pupe di operaie e fuchi sono state tenute su piastre tissutali sterili in cui lo sviluppo procede normalmente e (d) le api sfarfallate sono state tenute in piccole scatole senza rischio di contaminazioni esterne. Per questa ragione, non abbiamo mai rilevato alcuna attività antimicrobica nel controllo di campioni dell'emolinfa di api non coinvolte direttamente nei test. Le api selezionate per gli studi erano tutte operaie o fuchi appena sfarfallati. Tutti sono stati in grado di attivare le reazioni cellulari ed umorali di difesa conosciute. Sembra pertanto ragionevole sostenere che non solo le operaie, ma anche i fuchi, sono attrezzate con gli stessi strumenti di difesa, considerato che il successo riproduttivo del maschio è una delle principali cause di selezione naturale nelle api, contribuendo al benessere generale della colonia e considerando che una colonia investe molte risorse per l'allevamento ed il mantenimento di una certa quota di fuchi. Si è osservato che il numero di batteri vitali nell'emolinfa delle api testate è calato rapidamente di oltre due ordini di grandezza in un periodo compreso tra i 30 e 60 minuti successivi all'iniezione di circa 150 batteri di *E. coli* in coincidenza con un rapido aumento della nodulazione rilevabile. Circa 6 ore dopo l'iniezione si è accertata la prima attività antimicrobica, aumentata nelle 24 ore successive, e in seguito rimasta costante nel periodo di osservazione successivo. Questi due tempistiche differenti delle risposte immunitarie probabilmente rappresentano la più rapida risposta immunitaria cellulare, costituita principalmente da fagocitosi e nodulazione, e quella umorale che comporta la produzione di vari peptidi antimicrobici. Tali dinamiche microbicide temporali sono state osservate anche altrove. Korner e Schmid-Hempel hanno verificato dinamiche simili delle operaie di *Bombus terrestris*. La suscettibilità di *Manduca sexta larve* alle infezioni dei vari patogeni è stata studiata anche da Dunn e Drake. La concentrazione di tutti i batteri esaminati si è ridotta in modo significativo durante la prima ora seguita da una seconda fase che ha portato all'eliminazione dei batteri vitali o alla loro moltiplicazione. Gli autori citati ritengono che le fagocitosi e/o nodulazione siano responsabili di tutta la riduzione dei batteri in questo primo periodo. Ulteriori esperimenti hanno dimostrato che la produzione di composti antimicrobici serve a proteggere gli organismi infettati dai batteri che possono essere sopravvissuti alla prima risposta immunitaria. Una caratteristica unica e peculiare alle api da miele è costituita dalla loro differente longevità. Le api estive vivono solitamente fino a 6 settimane, mentre l'arco vitale delle api invernali varia tra i 6 e 9 mesi. Le api invernali sono impegnate principalmente nella termoregolazione del glomere in risposta alle temperature rigide esterne. L'isolamento del glomere si ottiene grazie ad uno strato più esterno di api che formano una sorta di "mantello" e di api interne che

invece producono calore vibrando i muscoli deputati al volo. Questo processo endotermico di produzione del calore è un processo altamente energivoro e si basa soprattutto sulle riserve di miele di una colonia. Alcune caratteristiche fisiologiche contraddistinguono le api estive da quelle invernali. In inverno, le api hanno livelli di vitellogenina più elevati, e questa è una proteina di stoccaggio prodotta e secreta dai corpi grassi e, tra le altre funzioni, è deputata a proteggere le api dallo stress ossidativo. Inoltre, le api invernali possiedono un elevato contenuto di lipidi, glicogeno e proteine nei corpi grassi ed hanno un numero elevato di emociti. Quindi, considerate le esigenze di un'efficiente risposta immunitaria cellulare ed umorale, le api invernali [nel caso di api invernate in condizioni di salute buone N.d.T.] sono fondamentalmente ben attrezzate per avviare i relativi sistemi di difesa. Abbiamo rilevato reazioni immunitarie umorali nelle api invernali indotte da infezioni artificiali di *E. coli*. Abbiamo altresì rilevato un'attività microbica nell'emolinfa degli individui affetti e sono stati individuati i due principali peptidi antimicrobici: hymenoptecina e defensina 1. Inoltre, abbiamo osservato una rapida diminuzione di batteri vitali di *E. coli* per due ordini di grandezza entro le prime due ore post-iniezione dei batteri, e questa reazione è proseguita fino a 48 ore, quando il numero dei batteri vitali presenti sembrava essere eliminato. Unitamente alla risposta immunitaria umorale, le api invernali sono in grado di produrre anche reazioni nodulari melanotiche (cellulari) in risposta ad infezioni batteriche, una reazione di difesa cellulare dominante nella maggior parte degli insetti. Da Bedick et al. è stato sottolineato che le reazioni nodulari potrebbero verificarsi in tutte le tappe del ciclo vitale degli insetti. Non possiamo sostenere pienamente questa affermazione poiché abbiamo rilevato delle variazioni della nodulazione rispetto all'età, e nelle api da miele vi è un'evidente tendenza a perdere la capacità di nodulazione con il progredire dell'età, fino alla totale assenza di nodulazione. È stato precedentemente dimostrato da Stanley-Samuelson et al. che la nodulazione è mediata da eicosanoidi e che i principali elementi di un sistema di eicosanoidi sono presenti nei corpi grassi e negli emociti, tessuti e cellule che sono abbondanti nelle api invernali. Gli eicosanoidi sono sintetizzati a partire da acidi grassi, principalmente da acido arachidonico che viene successivamente metabolizzato attraverso tre differenti percorsi. Possiamo ipotizzare che la sintesi di eicosanoidi sia alterata nelle operaie anziane. In sintesi, possiamo affermare che le api invernali, cioè quelle più longeve, sostanzialmente mantengono la loro piena capacità di attivare reazioni cellulari umorali e cellulari. Questa idoneità delle api invernali rispetto al livello di immunocompetenza si rispecchia in una vasta gamma di funzioni cognitive. Così è stato dimostrato da Behrends e Schneider che nonostante l'età avanzata, le api invernali non conoscono un declino di apprendimento in relazione con l'età. Considerando le varie attività coinvolte nella

termoregolazione dell'alveare, dall'allevamento della covata (con la partecipazione della regina) nelle zone più calde interne al glomere, ai sporadici voli di purificazione, è ragionevole pensare che le api invernali sono ben disposte a lottare contro qualsiasi attacco microbico possano incontrare. Oltre agli adulti di operaia e fuco, abbiamo anche esaminato come le larve d'api possano reagire alle infezioni batteriche. Le larve che vengono costantemente rifornite nelle loro celle aperte di covata di un alimento prodotto dalle nutrici, possono incontrare infezioni microbiche attraverso queste due principali modalità: (a) ingestione di alimento contaminato e (2) da contaminazioni esterne che portano ad infezioni dell'emocele. Come mostrato in questa ricerca e negli studi precedenti, le operaie ed i fuchi sono ben attrezzati ad affrontare le infezioni batteriche che invadono l'emocele. Entrambe le reazioni, umorale e cellulare, venivano avviate a 4-5 giorni di età delle larve di operaia ed a 6-9 giorni delle larve da fuco. Una delle malattie batteriche più disastrose per le api è la peste americana (AFB), causata da spore prodotte dai batteri di *Paenibacillus larvae*. Solo le larve sono suscettibili ad AFB e l'infezione è causata dall'ingestione di spore attraverso cibo contaminato. Le spore germinano e una proliferazione massiccia di batterio P. larve avviene nello stomaco di mezzo prima della penetrazione nell'epitelio intestinale. Di conseguenza, l'emocele delle larve viene invaso da una elevatissima dose di P. larve che necessiterebbero di una reazione enorme ed eccessiva per il sistema immunitario umorale e cellulare di giovani larve. Questa ipotesi è supportata dall'osservazione che solo le larve al primo stadio sono particolarmente suscettibili alle infezioni di AFB, mentre le larve di età superiori ai due giorni risultano resistenti alle infezioni. La suscettibilità età-dipendente delle larve è stata attribuita allo sviluppo età-dipendente ed alla composizione della membrana peritrofica, che rappresenta una barriera per i batteri di P. larve prima che raggiungano l'epitelio intestinale. Inoltre, i corpi grassi sono un tessuto importante alla sintesi di composti antimicrobici e questo tessuto può risultare troppo piccolo nelle giovani larve e quindi non consentire l'espressione di AMPs adeguati. Gli studi di Evans hanno rivelato alti livelli di abecina e defensina 1 nelle larve di operaia esposte a P. larve, suggerendo che le larve da miele possono esprimere una risposta immunitaria rispetto a questo patogeno. In questo contesto royalisin contenuta nella pappa reale ed identica al noto defensina 1 ha mostrato di esprimere effetti inibitori nei confronti di P. larve, nonché rispetto ad altri batteri. Con nostra grande sorpresa, le pupe di operaie e fuchi risultavano completamente incapaci di attivare una risposta immunitaria cellulare ed umorale rispetto alle infezioni indotte artificialmente. *E. coli* ha causato pertanto un arresto rapido e completo dello sviluppo della pupa accompagnato da una colorazione scura e prematura e da una decomposizione del corpo dell'intera pupa, reazioni indotte come conseguenza di una massiccia

proliferazione di batteri di *E. coli* nell'emolinfa delle api infette. Questi effetti sono stati osservati anche su pupe in cui la reazione veniva indotta da bassi quantitativi di batterio. Le pupe di ape contengono un'alta concentrazione di emociti ed anche i corpi grassi sono già formati in quello stadio di sviluppo, ragione per cui l'assenza di una reazione immunitaria non può essere attribuita all'assenza dei tessuti deputati. Non esiste quasi alcun dato sul sistema immunitario delle pupe, principalmente a causa delle loro piccole dimensioni e dalla scarsa disponibilità di esemplari di pupe per insetti dei differenti ordini, con una sola eccezione. In gran parte a causa delle loro gigantesche dimensioni, le larve da seta e le pupe dei Lepidotteri sono state tra le prime impiegate nello studio dei sistemi immunitari innati. Le pupe di *Hyalophora cecropia* e *Samia Cynthia* sono risultate avere una risposta immunitaria attribuibile ad un'attività antibatterica dell'emolinfa. Successivamente, il primo peptide antimicrobico degli insetti, denominato cecropins, è stato isolato a partire dall'emolinfa di pupe di *H. cecropia*. La forte risposta immunitaria delle pupe di falena e l'assenza di risposta nelle pupe di api da miele pone una questione sulle differenze inerenti alle loro diverse fasi di sviluppo. Dopo la schiusa, i giovani bruchi di falena si nutrono di foglie, fino a quando non iniziano a filare i loro bozzoli attaccati ai ramoscelli, bozzoli che consistono in tre strati che proteggono le pupe dall'ambiente esterno. Lo sviluppo delle api da miele contrasta con quello delle falene sotto molti aspetti. Le larve delle api da miele non si preoccupano del proprio approvvigionamento, ma si alimentano all'interno delle celle di covata aperte con pappa reale prodotta e fornita dalle nutrici. In questa fase della loro esistenza le larve sono più sensibili all'aggressione dei patogeni attraverso il cibo e quindi sono fornite di un sistema immunitario adeguato. Ricordiamo a tale proposito che la pappa reale contiene vari composti specifici antimicrobici tra i quali la già ricordata defensina 1, capace di minimizzare le infezioni batteriche e fungine. Nella fase larvale finale pre-pupa, le larve di ape si allungano ed iniziano a formare un bozzolo attorno a se stesse. Questa straordinaria solitudine potrebbe essere la spiegazione della perdita di un sistema immunitario attivo. Nella fase pre-pupa si verifica inoltre la defecazione. Di conseguenza, le pupe sono generalmente prive di microrganismi intestinali che le larve hanno ingerito con il cibo. Questa funzionalità potrebbe ulteriormente spiegare l'assenza di un sistema immunitario attivo nelle pupe di api da miele che non sono teoricamente minacciate da infezioni microbiche provenienti né dall'esterno né dall'interno, almeno fino alla recente introduzione di *Varroa destructor*. Il maggior effetto negativo di questo nuovo parassita delle api da miele è proprio dovuto alla riproduzione di *Varroa destructor* all'interno delle celle opercolate di covata maschile e femminile di api. L'acaro madre crea una ferita, un varco nella cuticola della pupa, succhiando dall'emolinfa di quest'ultima l'alimentazione utile

all'allevamento della propria prole. Così la pupa d'ape è danneggiata in una varietà di modi che conduce o alla morte della pupa o ad un'esistenza con bassa aspettativa di vita o deterioramento delle funzioni cognitive da adulta. Inoltre, l'effetto dannoso di *V. destructor* è moltiplicato dall'essere vettore di varie tipologie di virus. Inoltre dei batteri potrebbero anche essere trasmessi da acari presenti all'interno delle celle, batteri con i quali la varroa è entrata in contatto attraverso la parassitizzazione di api, e quindi le infezioni batteriche trasmesse alle pupe potrebbero contribuire al danno complessivo causato dall'assenza di risposta immunitaria in questa fase del ciclo vitale delle api. Sono state spesso osservate per questa ragione numerose colonie di batteri su pupe di api. Lo sviluppo delle pupe di api da miele è estremamente veloce a causa delle temperature del nido, stabili sui 33-36° C. Variazioni di temperatura durante lo sviluppo della pupa possono influenzare le *performances* comportamentali dell'ape adulta ed è stato suggerito pertanto che essendo l'attivazione ed il mantenimento del sistema immunitario assai costoso in termini di risorse energetiche, questo non possa essere sostenuto insieme ad altre attività impegnative. Quindi è ragionevole supporre che le pupe d'ape utilizzino le proprie risorse energetiche per i processi metabolici. Le infezioni virali negli insetti apparentemente non inducono la stessa risposta immunitaria innata che si riscontra con attacchi batterici, ma sono invece dei meccanismi di interferenza del RNA a svolgere un'importante attività antivirale negli insetti. In accordo con questi risultati, abbiamo recentemente dimostrato che l'infezione di larve e giovani api di operaie rispetto al virus della paralisi acuta (APV) non innesca risposte cellulari o umorali. Le pupe di *A. mellifera* soccombono anche di fronte ad infezione di APV, anche se con un certo ritardo rispetto alle infezioni batteriche. Un accumulo di virus nelle pupe comporta un arresto completo dello sviluppo della pupa nell'arco di 3-4 giorni. Il motivo di questo fenomeno non è noto, ma sottolinea la vulnerabilità delle pupe di api da miele. In questa ricerca abbiamo dimostrato che il sistema immunitario delle api da miele si basa su un ampio repertorio di reazioni immunitarie innate, ma che l'attivazione delle componenti di questo sistema dipende dall'età e dal periodo di sviluppo dell'ape. Si deduce da questi dati che le api sembrano aver adottato un equilibrio tra l'urgenza e la necessità dell'attivazione delle difese immunitarie e la loro fattibilità in termini di risparmio energetico.

(Traduzione di Luca Tufano)