



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE AGRICULTURA, PESCA
Y ALIMENTACIÓN



DIRECCIÓN GRAL DE SANIDAD DE LA PRODUCCIÓN
AGRARIA

DIVISIÓN DE LABORATORIOS DE SANIDAD DE LA
PRODUCCIÓN AGRARIA

Implicación de la toma de muestras en el trabajo del LNR

Virginia Pelayo Rincón

LNR para Enfermedades de Abejas

Laboratorio Central de Veterinaria (LCV)

vpelayo@mapa.es

“ Taller del Programa de Vigilancia sobre las Pérdidas de Colonias de Abejas”

Madrid 16-17 de Junio 2021



Red de Laboratorios Salud de las Abejas



EURL PARA LA SALUD DE LAS ABEJAS

LABORATORIO CENTRAL DE VETERINARIA ALGETE (MAPA)

Tasas infestación *Nosema spp*
Enfermedades

Confirmación *Aethina tumida* y *Tropilaelaps spp*

LABORATORIO ARBITRAL AGROALIMENTARIO DE ARAVACA (MAPA)

Análisis de residuos de pesticidas

LABORATORIOS OFICIALES DE LAS CCAA.

Tasas de parasitación por *Varroa destructor*

Búsqueda de la presencia de parásitos sospechosos:

Aethina tumida y *Tropilaelaps spp.*



LNR para la Salud de las Abejas

LCV

Laboratorio Central de Veterinaria
Algete (Madrid)

LNR Enfermedades de abejas

LAA

Laboratorio Arbitral Agroalimentario
Aravaca (Madrid)

LNR Análisis de residuos de pesticidas

(Coordinación)



MAPA



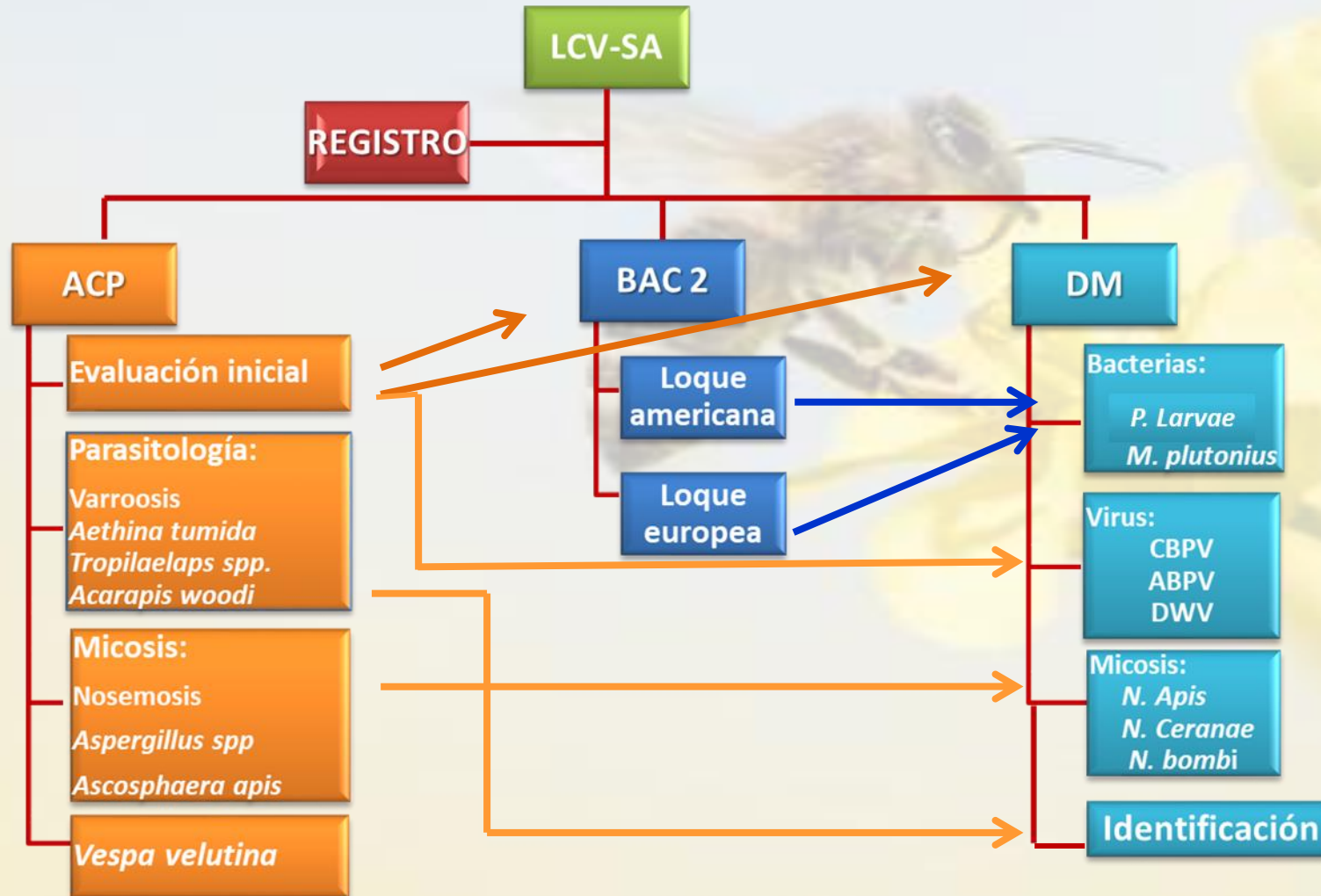
Acreditados de acuerdo a **ISO 17.025** “Norma que establece los requisitos que deben cumplir los laboratorios de prueba y calibración” → **Competencia y fiabilidad resultados**
Certificados de acuerdo a **ISO 14.001** “Sistemas de gestión medioambiental”



Funciones del LCV como LNR para Enfermedades de Abejas

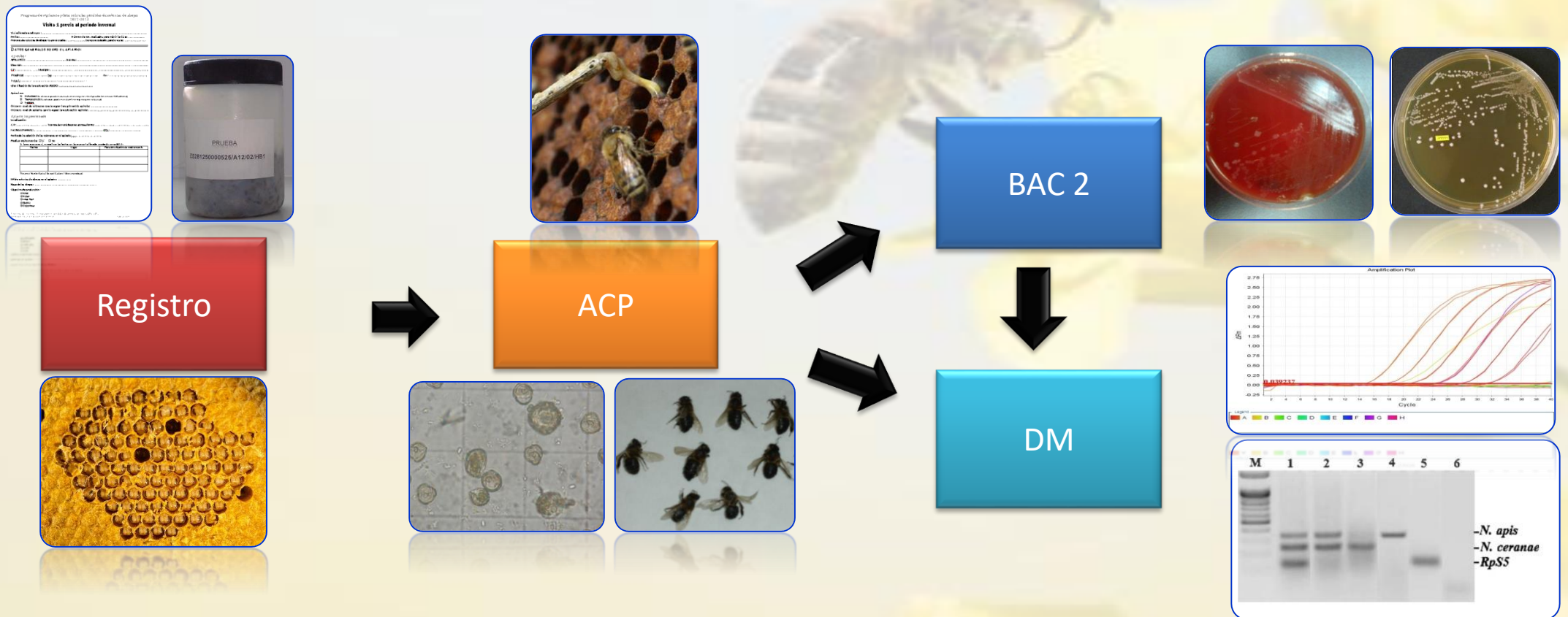
- **Colaborar** con el EURL:
 - Asistencia a Reuniones
 - Participación en proyectos
 - Participar en Ensayos de Intercomparación
- **Coordinar** las actividades de los laboratorios oficiales encargados del análisis de muestras.
- **Suministrar** materiales de referencia.
 - Varroa spp.*
 - Esporos de *Nosema apis*
 - Esporos de *Nosema ceranae*
- **Difundir** a la autoridad competente y a los laboratorios oficiales nacionales la información suministrada por el EURL.
- **Facilitar** a la autoridad competente asistencia científica y técnica para la puesta en práctica de los planes de control coordinados.

Organización LCV como LNR para Enfermedades de Abejas



Organización LCV como LNR para Enfermedades de Abejas

Flujo de muestras





Organización LCV como LNR para Enfermedades de Abejas

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD DE LA PRODUCCIÓN AGROPECUARIA, SUBSECCIÓN GENERAL DE SANIDAD E HIGIENE ANIMAL Y TRAZABILIDAD
LABORATORIO CENTRAL DE VETERINARIA

Entrada Nº: [] Fecha de entrada: []
Salida Nº: [] Fecha de emisión: []

INFORME DEL ANÁLISIS

Loque Americana (detección de ácidos nucleicos):
Identificación en cultivo bacteriano por PCR convencional: PESIG/DM-03 + ESIG/DM-03

Muestra	Resultado
2	Positivo

Fecha Inicio: []
Fecha Fin: []

Nosema apis (detección de ácidos nucleicos):
Identificación por PCR convencional: PESIG/DM-04 + ESIG/DM-04

Muestra	Resultado
1	Negativo

Fecha Inicio: []
Fecha Fin: []

Nosema ceranae (detección de ácidos nucleicos):
Identificación por PCR convencional: PESIG/DM-03 + ESIG/DM-08

Muestra	Resultado
1	Negativo

Fecha Inicio: []
Fecha Fin: []

Virus de la parálisis aguda de las abejas ABPV (detección de ácidos nucleicos):
PCR en tiempo real: PESIG/DM-01 + ESIG/DM-01

Muestra	Resultado
1	Positivo (Ct = 29,3)

Fecha Inicio: []
Fecha Fin: []

Virus de la parálisis crónica de las abejas CBPV (detección de ácidos nucleicos):
PCR en tiempo real cuantitativa: PESIG/DM-04 + ESIG/DM-04

Muestra	Resultado
1	Positivo (4,4 x 10 ⁶ copias de genoma viral por abeja)

Fecha Inicio: []
Fecha Fin: []

Virus de las alas deformadas de las abejas DWV (detección de ácidos nucleicos):
PCR convencional: PESIG/DM-03 + ESIG/DM-03

Muestra	Resultado
1	Positivo

Fecha Inicio: []
Fecha Fin: []

Observaciones: La incertidumbre del método PESIG/PCR-04 + ESIG/PCR09 está calculada y a disposición del cliente.

ENAC
C/Alameda, 14
28110 - ALGETE (MADRID)
TEL: 91 347 60 26/27
FAX: 91 347 3776
registro.lv@mapa.es

Los ensayos marcados no están amparados por la acreditación de ENAC.
Este informe sólo afecta a los objetos sometidos al ensayo y no deberá reproducirse parcialmente sin la aprobación por escrito del laboratorio de ensayo.
El laboratorio asegura la confidencialidad de los datos.

Página 1 de 2

MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD DE LA PRODUCCIÓN AGROPECUARIA, SUBSECCIÓN GENERAL DE SANIDAD E HIGIENE ANIMAL Y TRAZABILIDAD
LABORATORIO CENTRAL DE VETERINARIA

Entrada Nº: [] Fecha de entrada: []
Salida Nº: [] Fecha de emisión: []

Loque Americana:
Aislamiento e identificación: PESIG/BAC2-10

Muestra	Aislamiento e identificación
2	Detectada

Fecha Inicio: []
Fecha Fin: []

Detección de esporas de Nosema apis por microscopía:
Observación microscópica: PESIG/ACP-06

Muestra	Observación microscópica
1	No concluyente (20x10 ⁶ esporas por abeja). Esporas no identificadas.

Fecha Inicio: []
Fecha Fin: []

Loque Americana:
Observación macroscópica**

Muestra	Observación macroscópica**
2	-Presencia de cría saltada. -Opérculos de diferente color, oscuros y hundidos. -Larvas viscosas y matón-café: prueba de patillo positiva -Olor agrio característico de infección por Loque americana

Fecha Inicio: []
Fecha Fin: []

ENAC
C/Alameda, 14
28110 - ALGETE (MADRID)
TEL: 91 347 60 26/27
FAX: 91 347 3776
registro.lv@mapa.es

Los ensayos marcados no están amparados por la acreditación de ENAC.
Este informe sólo afecta a los objetos sometidos al ensayo y no deberá reproducirse parcialmente sin la aprobación por escrito del laboratorio de ensayo.
El laboratorio asegura la confidencialidad de los datos.

DM

BAC 2

ACP



Enfermedades de Abejas: Tratamiento de las muestras

**SIN UNA BUENA MUESTRA NO EXISTE
UN BUEN DIAGNOSTICO**



Enfermedades de Abejas: Muestras objeto de investigación

1. Muestras sistemáticas:

- ✓ Apiarios seleccionados y dentro de éstos,
- ✓ Todas las colonias seleccionadas al azar (máx.13)

2. Muestras sintomáticas:

- ✓ Cualquier colonia de las seleccionadas al azar que presente síntomas dentro de los apiarios del programa y
- ✓ Muestras de cualquier colonia fuera de las seleccionadas al azar si presentan síntomas

3. Fuera del Programa: muestras de cualquier colonia (perteneciente o no al programa) cuando el veterinario inspector lo considere necesario (síntomas)



Enfermedades de Abejas: *Nosema spp.*

1- MUESTRAS SISTEMÁTICAS:

Muestra elección: internas (cuadros periféricos)

Cantidad: >60



2- MUESTRAS SINTOMÁTICAS:

Muestra elección: externas (piquera)

Cantidad: >30



Restos de diarrea



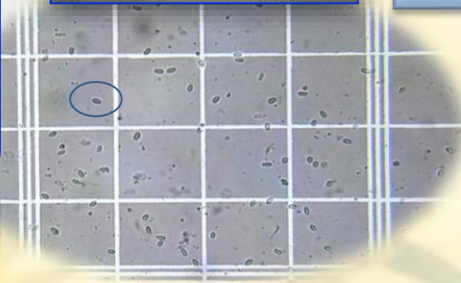
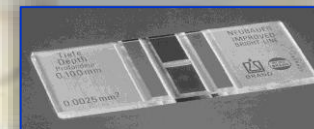
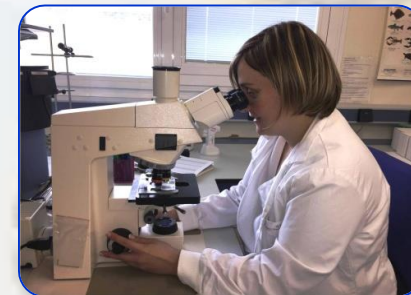
Abejas reptando por la hierba

Diagnóstico diferencial
Virus de la Parálisis Crónica

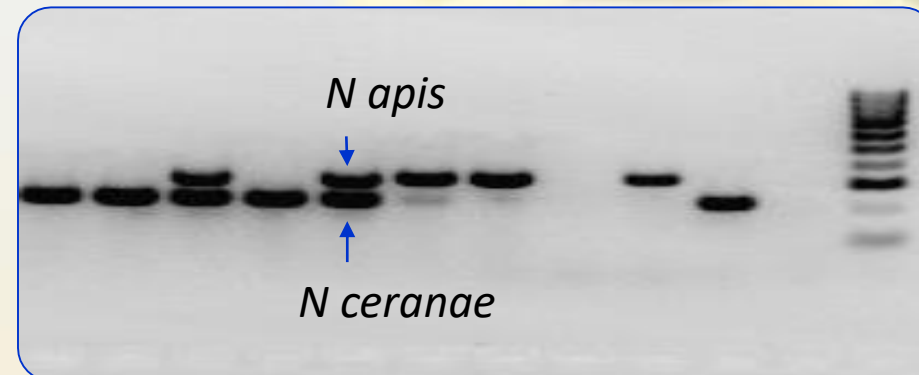


Enfermedades de Abejas: *Nosema spp.*

MUESTRAS SISTEMÁTICAS Y SINTOMÁTICAS



Resultados:
Nº esporos / abeja





Enfermedades de Abejas: *Varroa destructor*

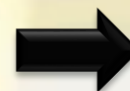
MUESTRAS SINTOMÁTICAS (sistemáticas → CCAA)

Muestra elección

Panal de cría operculado → 10x10 cm

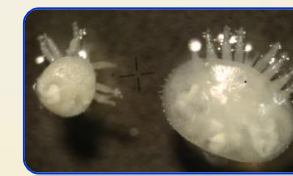
Larvas enfermas

Abejas vivas internas (nido de cría no operculado) >100



Diagnostico diferencial *Tropilaelaps spp.*

Resultados :
Tasa de parasitación = nº varroas/100 abejas

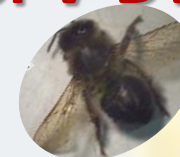




Enfermedades de Abejas: **Virosis (CBPV-ABPV-DWV)**

Muestra elección: abejas vivas externas /internas.

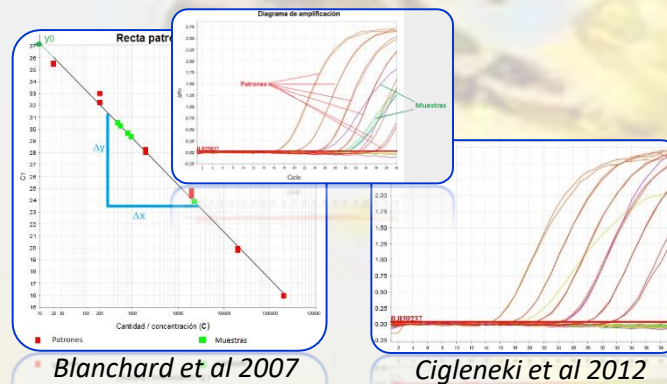
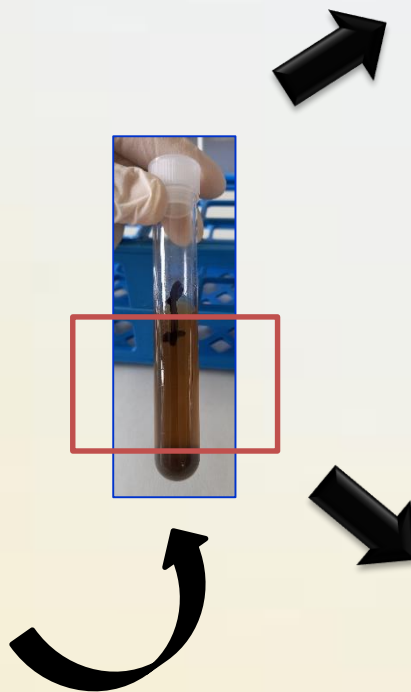
Cantidad: >30



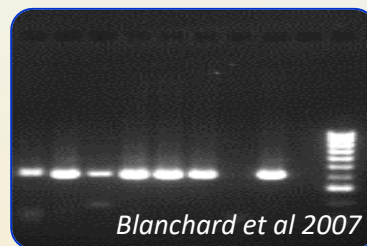
CBPV: detección y cuantificación (PCR en tiempo real cuantitativa)

ABPV: detección (PCR en tiempo real)

Diferencial



DWV: detección (PCR convencional)

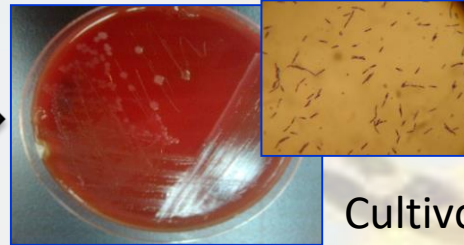
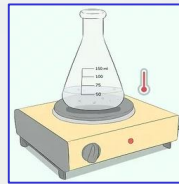
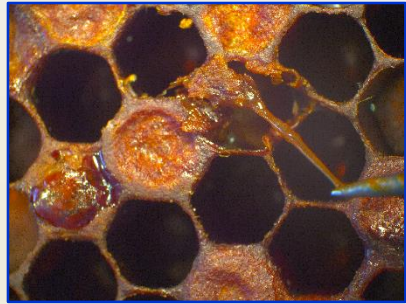




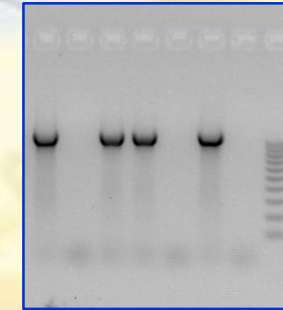
Enfermedades de Abejas: **Loque americana y europea**

LOQUE AMERICANA (*Paenibacillus larvae*)

Muestra de elección: Panal de cría con síntomas y larvas enfermas



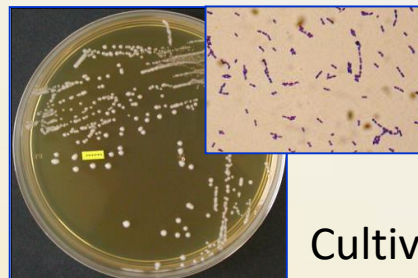
Cultivo y tinción



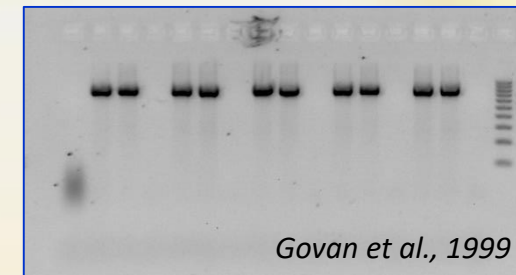
Dobbelaere et al., 2001b

LOQUE EUROPEA (*Melissococcus plutonius*)

Muestra de elección: Panal de cría con síntomas y larvas enfermas



Cultivo y tinción



Govan et al., 1999



Enfermedades de Abejas: Parásitos exóticos

Tropilaelaps spp. y Aethina tumida

No presentes a nivel nacional

Muestra de elección:

- Abejas, Panal de cría
- Escarabajos, larvas y huevos o ácaros sospechosos

Método diagnóstico

Detección durante el lavado de las abejas o el examen de muestras sintomáticas

Identificación por examen morfológico directo

Identificación molecular

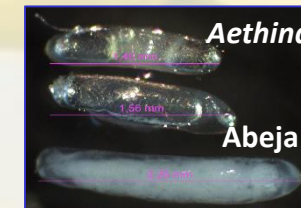


Tropilaelaps spp.



Diferencial
Varroa destructor

Aethina tumida



COI (GEN CITOCROMO OXIDASA I) 567nt/710nt

>Consensus for segment AMFMTCOX for specimen COI-P315-2lmuestral
 ATAGTAGGAACCTCATTAGACTCTTAATTCGAAGTGAATAGGAATCCTGGGTCAATTAATGGAAATGACCAAAATTA
 CAATGTTATTTGTTACAGCTCAGGCTTTCAITTAATTTCTTTATAGTTATACCAATTTATAAATGGCGGATTCGGAACT
 GATTAGTTCATTAATTAATGAGAGCCCTGATATAGCTTTCCTCGAATGAATAATATAAGATTCTGACCTTTACCAACA
 TCCCTTCTCTTCTATTAAGAAAGAAATGTAAGAAAGAGGAGCAGGAGCAAGATGAACAGTGTACCTCCACTTTTCATC
 TAATATCGCTCATGCTGGATCTTCAGTTGATTTAGCTATTTTAGACTTCACTTAGCAGGTATTTCTCTATTTTAGGTG
 CAGTAAATTTTATACCTCTAATTAATATGAGCCCTCAGCGATACCTTTGATCGAATACCTTTATTTGTTGAGCT
 GTAGTAATTACAGCTATCCTTCTTACTTTTCATGCTGTATAGCAGGAGCTATTACTATACTACTACAGATGAAA
 TCTAAAT

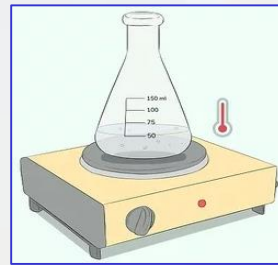
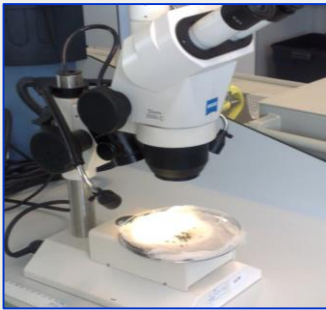
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E-value	Per. Ident	Accession
Aethina tumida_voucher_ATKR_cytochrome c oxidase subunit I (COXI) gene, partial cds: mitochondrial	1033	1033	100%	0.0	99.47%	MT602618.1



Enfermedades de Abejas: Otros patógenos

Acarapis woodi :

Muestra de elección: Abejas adultas

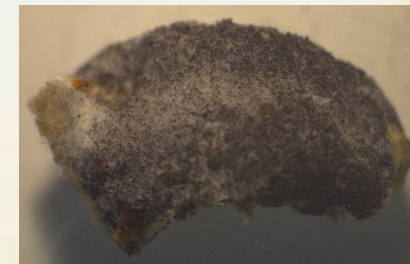


Solución de hidróxido potásico

Identificación por MO

Ascosperosis :

Muestra de elección: Larvas



Detección por MO

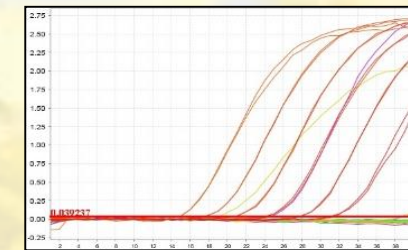
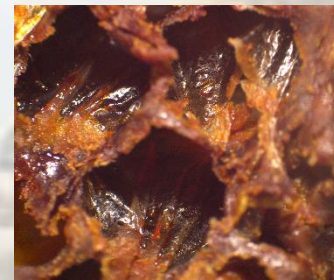
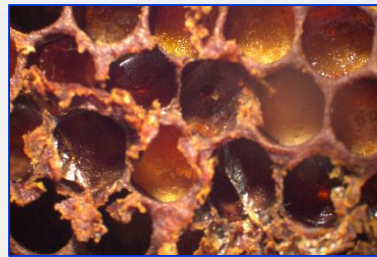
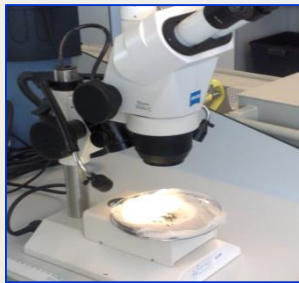


Enfermedades de Abejas: Otros patógenos

Virus de la cría ensacada:

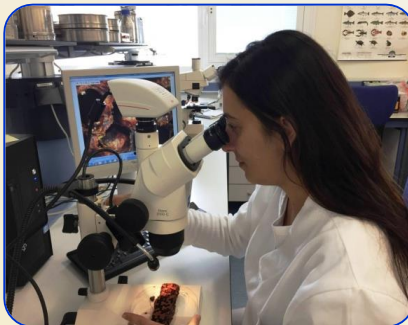
Muestra de elección: panal de cría, larvas

Diferencial con LA/LE



Blanchard et al. 2014

Vespa velutina: Identificación morfológica



Vespa velutina

Vespa cabrio



Enfermedades de Abejas: MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Enfermedad diana	Patógeno	Método de laboratorio	Método diagnóstico recomendados
Varroosis	<i>V. destructor</i>	Detección de la presencia del parásito	OIE
		Lavado de abejas	OIE
Loque americana	<i>P. larvae</i>	Diagnóstico bacteriológico	OIE (validado EURL)
		Identificación molecular por PCR	OIE (validado EURL)
Loque europea	<i>M. plutonius</i>	Diagnóstico bacteriológico	OIE (validado EURL)
		Identificación molecular por PCR	OIE (validado EURL)
Nosemosis	<i>N. apis</i>	Detección y cuantificación de esporos de <i>Nosema spp</i> por microscopía óptica	OIE
	<i>N. ceranae</i>	Diferenciación molecular de especies de <i>Nosema apis/ Nosema ceranae</i> por PCR	EURL adaptadas de las recomendaciones de la OIE
Virus de la Parálisis Crónica	CBPV	Diagnóstico molecular: detección y cuantificación (RT-qPCR)	EURL
Virus de las Alas Deformadas	DWV	Diagnóstico molecular: detección (RT-PCR)	EURL
Virus de la Parálisis Aguda	ABPV	Diagnóstico molecular: detección (RT-PCR)	EURL



Enfermedades de Abejas: MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Enfermedad diana	Patógeno	Método de laboratorio	Método diagnóstico recomendados
<i>Aethina tumida</i> (SHB)	<i>A. tumida</i>	Detección durante el lavado de las abejas	OIE / EURL
		Detección durante el examen de muestras sintomáticas	
		Identificación del escarabajo adulto, larva por examen morfológico	
		Identificación molecular por PCR del escarabajo adulto, larva o huevo	
<i>Tropilaelaps spp.</i>	<i>Tropilaelaps spp</i>	Detección durante el lavado de las abejas	OIE / EURL
		Detección durante el examen de muestras sintomáticas	
		Identificación por examen morfológico directo de los ácaros	
Ascospferosis	<i>Ascospaera apis</i>	Detección por microscopía óptica	Bee Book
Acarapisosis	<i>Acarapis woodi</i>	Detección por microscopía óptica	OIE
		Detección por digestión enzimática	
		Identificación del parásito por microscopía óptica	



**Muchas gracias por vuestra
atención**

