PROTOCOLO

PARA LA TOMA DE MUESTRAS DE **ABEJAS MELÍFERAS** (***Apis mellifera L.***) U OTROS MATERIALES DE LA COLMENA, CON DESTINO A **ANÁLISIS TOXICOLÓGICO Y SANITARIO**

ANDI
Cámara Procultivos

Y su programa:
CuidAgro®
PROGRAMA DE MANEJO RESPONSABLE

PROTOCOLO

PARA LA TOMA DE MUESTRAS
DE **ABEJAS MELÍFERAS** (***Apis mellifera L.***)
U OTROS MATERIALES DE LA COLMENA,
CON DESTINO A **ANÁLISIS TOXICOLÓGICO**
Y SANITARIO

Introducción » 03

1. Toma de muestras para análisis toxicológico » 05

1.1 Toma de muestras de matrices endógenas a la colmena con destino a análisis toxicológico » 06

1.1.1 Condiciones de muestreo de abejas para análisis toxicológico » 06

1.1.2 Recolección de las muestras para análisis toxicológico » 07

1.2 Toma de muestra de matrices exógenas a la colmena » 08

1.3 Rotulado de la muestra » 08

1.4 Embalaje de la muestra » 09

1.5 Almacenamiento de muestras antes y durante el transporte » 09

1.6 Transporte de las muestras » 09

2. Toma de muestras para análisis sanitario » 09

2.1 Extracción de muestras para Varroasis de las abejas melíferas » 10

2.2 Extracción de muestras para Acarapisosis de las abejas » 11

2.3 Extracción de muestras para Nosemosis » 11

2.4 Extracción de muestras para determinar la infestación por el escarabajo de las colmenas (*Aethina tumida*) » 12

2.5 Extracción de muestras para determinar Loque americana (*Paenibacillus larvae*) » 14

Laboratorios en donde se pueden realizar los análisis » 15

Literatura citada » 16

ANDI
Cámara Procultivos

Y su programa:
CuidAgro
PROGRAMA DE MANEJO RESPONSABLE

PROTOCOLO PARA LA TOMA DE MUESTRAS DE ABEJAS MELÍFERAS (*Apis mellifera* L.) U OTROS MATERIALES DE LA COLMENA, CON DESTINO A ANÁLISIS TOXICOLÓGICO Y SANITARIO

Introducción

Se han identificado más de 20.000 especies de abejas a nivel mundial, algunas de las cuales son utilizadas para la producción de miel, cera y resinas, entre otros productos (Pantoja 2014). El servicio de polinización que prestan muchos organismos, entre ellos las abejas, genera ingresos incalculables en los sistemas productivos y en el ecosistema a nivel mundial. La especie de abeja más reconocida es *Apis mellifera* L. o abeja melífera, la cual fue introducida en América durante la colonización europea (Pantoja *et al.* 2014).

En Colombia, el número estimado de colmenas de *Apis mellifera* para el 2018 es de 114.509, 4000 más que para el 2017 y una producción de miel estimada de 3893 toneladas/año (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural 2018). La mayor cantidad de colmenas se registran en las regiones Andina y Atlántica; los departamentos más reconocidos por la producción de miel de abejas en el país son Sucre, Bolívar, Córdoba y Huila; en otros como Antioquia y Magdalena y los de la región Orinoquía, se está incrementando el número de colmenas, gracias a proyectos relacionados principalmente con procesos de sustitución de cultivos ilícitos, disminución del impacto ambiental por minería y otras actividades y aprovechamiento de cultivos forestales como el de *Acacia magnium* (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural 2018).

Hay versiones encontradas sobre la dinámica de las abejas en los últimos años: estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO 2018) muestran que desde 1995 las poblaciones de abejas melíferas han aumentado un 10% en Europa, 8% en América del Norte, 43% en América del Sur, 43% en Asia y 19% en África, es decir que a nivel mundial representa un aumento del 26%. Por otra parte, Pantoja *et al.* (2014) indican que, desafortunadamente, en todos los continentes (excepto en la Antártida), se ha documentado la disminución de poblaciones y especies de abejas y otros polinizadores en los agroecosistemas y áreas naturales, lo cual ha generado una gran preocupación, tanto a nivel ambiental como económica.

Algunas investigaciones han establecido que en los últimos 20 años las poblaciones relativas de algunas especies de *Bombus* Latreille en Norteamérica ha disminuido hasta en un 96% y los rangos de distribución original se han reducido hasta en un 87% (Pantoja *et al*., 2014). Múltiples son las causas atribuibles al fenómeno de "crisis de los polinizadores" o "crisis de la polinización"; Pantoja *et al.* (2014) indican que se basa en la introducción de especies que compiten o son portadoras de parásitos nuevos para los polinizadores nativos, a la presencia de algunas plantas invasivas que modifican la composición florística, a la deforestación y al uso de intensivo e indiscriminado de agroquímicos. Según Klein *et al*. (2018), los factores ambientales más estresantes para las abejas son los plaguicidas y elementos pesados, los parásitos y patógenos (Invernizzi *et al.* 2011; Klein *et al*. 2017) y la malnutrición.

Los agentes patógenos causantes de enfermedades en las abejas *Apis mellifera* pueden influir negativamente en la productividad de las colonias y en su supervivencia (Woyke 1984). Los principales parásitos externos que afectan directamente a las abejas son el ácaro *Varroa destructor,* el piojo *Braula coeca,* el ácaro *Tropilaelaps* y el coleóptero *Aethina tumida* (Velásquez y Vargas. 2016). Dentro de los parásitos internos se reporta al ácaro *Tarsonemidae Acarapis woodi,* el

Según la Organización Mundial de Sanidad Animal 0IE (2018), las enfermedades de declaración obligatoria para las abejas en el 2018 son: *Melissococcus plutonius* (Loque europea), *Paenibacillus larvae* (Loque americana), *Acarapis woodi*, *Tropilaelaps* spp., infestación de las abejas melíferas por *Varroa* spp. (Varroasis) y *Aethina tumida* (Escarabajo de las colmenas).

En Colombia, Tibatá (2016) encontró que Varroa se encuentra en una frecuencia alta (92%), pero su índice de infestación (IVA) es bajo: 4,6%. Igualmente reporta la presencia de cuatro virus asociados con el ácaro Varroa: Virus de Alas Deformes (DWV) 19%, Virus de Parálisis Aguda (ABPV) 7,2%, Virus de la cría Ensacada (SBV) 21%, y Virus de la Celda Real Negra (BQCV) 17%.

En el país no existen estadísticas oficiales que documenten el número de colmenas muertas ni las razones que las expliquen. Sin embargo, el colectivo abejas vivas reporta la muerte de más de 20.000 colmenas durante el último año y medio. Existe una información fragmentada sobre las posibles causas que explicarían algunos de esos eventos y corresponde a resultados de análisis practicados a las abejas muertas por parte de los apicultores en laboratorios registrados ante el Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Los análisis indican la presencia de moléculas de uso agropecuario, pero se desconoce la forma en la cual esas moléculas llegaron a las abejas o si es la única causa de su deceso.

Por lo anterior, ante un episodio de muerte de colmenas, es necesario tener en cuenta el análisis de factores tanto químicos como biológicos y ambientales que puedan explicar esta situación, así.

a. Un examen toxicológico se refiere a diversas pruebas que determinan el tipo y la cantidad aproximada de compuestos químicos presentes en una matriz (ver definición abajo). De esta manera, el análisis toxicológico de las abejas o de otros componentes de la colmena, puede brindar información valiosa sobre los factores de riesgos químicos para las abejas y otros polinizadores y generar un punto de partida para el diseño de estrategias que mitiguen dichos riesgos.
b. Un examen de diagnóstico sanitario, es un grupo de pruebas que pueden ofrecer información sobre la presencia de parásitos y patógenos en la colmena, los cuales puedan estar causando afectaciones relevantes a la misma.
c. El análisis de las condiciones climáticas imperantes en la región durante la muerte de las colmenas, tales como bajas o altas temperaturas, también es fundamental para establecer los riesgos a los que están sometidas las abejas.

Algunos de los factores que pueden ayudar a determinar el tipo de análisis que debe practicar el apicultor son:

- **Toxicológico**: muerte súbita y cuantiosa de abejas adultas o presencia de un gran número de abejas moribundas, con comportamiento diferente al usual, especialmente con temblor, desorientación o dificultad para ingresar a la colmena.
- **Diagnóstico sanitario**: disminución paulatina del vigor de la colmena, pérdida de productividad sostenida, entre otros.
- **Climático**: presencia de humedad al interior de la colmena, especialmente en la cría, la cual se puede ver seca o excesivamente húmeda; los cuadros pueden verse húmedos o con moho.
- **Factores antrópicos aledaños a la colmena.** Presencia de cultivos cercanos a la colmena, especialmente si se conoce que en éstos se hace uso irresponsable de plaguicidas.

Dos o más de estos factores pueden presentarse de manera simultánea y causar alteración de la salud, el bienestar y el desarrollo de la colmena, por cuanto la información aquí suministrada es solo una guía y no se constituye en un diagnóstico "*a priori*" de las causas de muerte de la colmena.

En este documento se presenta una guía de obtención de material (matrices) adecuado para ser procesado correctamente en los laboratorios registrados ante el ICA y que sus resultados sean confiables.

1. Toma de muestras para análisis toxicológico

Es deseable tomar la muestra lo más pronto posible, ojalá inmediatamente después de ocurrido el incidente (ANDI-Cámara Procultivos 2018). El tiempo transcurrido entre la muerte de las abejas y la toma de la muestra es fundamental para determinar las moléculas implicadas; esto debería hacerse en un plazo máximo de 48 horas de la muerte de las abejas (ANDI-Cámara Procultivos 2018). Los resultados analíticos de muestras tomadas después de este tiempo pueden arrojar resultados no concluyentes, por lo que la información será de valor limitado (ANDI-Cámara Procultivos 2018).

Definición de la matriz a muestrear

"Matriz" es cualquier componente de la colmena o fuera de ella que es susceptible de muestreo.

Matrices inherentes a la colmena: La colmena tiene diferentes componentes que pueden ser muestreados. Los más comunes son: las abejas propiamente dichas (obreras, reina, cría), la miel, el polen, la cera, el alimento que emplea el apicultor para nutrir a la colmena, la madera externa de la colmena, la madera interna de los cuadros, entre otros.

Algunos de estos materiales, tales como el alimento y las abejas propiamente dichas, ofrecen información más reciente sobre las sustancias con las cuales han estado en contacto. Otras matrices en cambio, como la miel, la cera, el polen de trampa, pan de abeja y la madera de la colmena, se elaboran durante un largo tiempo y con elementos variados, por lo que sus componentes ofrecen una historia de sustancias con las que las abejas han estado en contacto. Por lo tanto, es más recomendable hacer muestreos de los materiales más "frescos" como los primeros.

Matrices externas a la colmena: Debido a la amplitud de plantas documentadas como susceptibles de forrajeo por parte de las abejas, es importante considerar tomar muestras de materiales ajenos a la colmena pero que puedan ser informativos en las sustancias químicas que contienen y que se pueda contrastar con las encontradas en las abejas. Estas matrices externas corresponden generalmente a tejidos vegetales que han sido asperjados con agroquímicos, o que, por su localización, están expuestos a la deriva de los agroquímicos empleados en los cultivos. Estas matrices pueden ser: hojas, ramas, flores, etc., tanto del cultivo que se presume fue asperjado con productos que afectan a las abejas o de las arvenses florecidas que pudieran haber sido visitadas por las mismas en una distancia no mayor a 10 metros cuando se realizaron aplicaciones terrestres de plaguicidas al cultivo, o a 100 metros si el cultivo fue tratado por vía aérea.

Elementos para la toma de muestras

Los elementos requeridos son:

- Guantes nuevos; el material puede ser nitrilo, plástico, látex u otros que aseguren la asepsia de la muestra.
- Bolsas plásticas negras, nuevas, resellables, de diferentes capacidades: de un kilo para la muestra de abejas; de cinco kilos para madera y de media libra para polen
- Frascos de vidrio o plástico estéril de 100 ml.
- Frasco de vidrio nuevo, con capacidad para 500 ml para muestras de miel o de alimento (jarabe)
- Bolsas transparentes para proteger la información de la muestra
- Nevera de polipropileno o de similar consistencia, con capacidad para guardar las muestras y conservar la cadena de frío.
- Herramientas para retirar los opérculos de los panales con miel (cuchillo, navaja o desoperculador debidamente desinfectados).
- Hielo seco u otro material para garantizar la conservación del material biológico
- Alcohol etílico al 70% (comercial de farmacia)
- Marcador indeleble
- Papel bond
- Lápiz de grafito
- Cinta de embalaje

Tamaño de la muestra y sitio de obtención de la misma

El tamaño de muestra depende de la matriz a muestrear, así:

1.1. Toma de muestras de matrices endógenas a la colmena con destino a análisis toxicológico:

1.1.1. Condiciones de muestreo de abejas para análisis toxicológico

- Se requiere recolectar una cantidad mínima de 100g y máxima de 200g para este tipo de análisis.

- Es preferible tomar muestras individuales por cada colmena afectada, de lo contrario, la muestra puede provenir de diferentes colmenas con la respectiva consideración del efecto que esto pueda tener en los resultados.
- Tomar muestras de abejas preferiblemente moribundas o muertas recientemente, así se evita analizar las que presenten algún grado de descomposición.
- Tomar la muestra de las abejas que no estén en contacto directo con sustratos distintos a los de la colmena, puede ser de la piquera, dentro de la colmena o mediante barrido de un cuadro, entre otros. Especialmente evitar recoger las abejas que estén en contacto con el suelo, agua, recipientes, entre otros.
- Depositar la cantidad de abejas requeridas en la bolsa resellable, marcar el material con los datos de colecta escritos con lápiz de grafito en el papel bond y sellar la bolsa inmediatamente. Poner la bolsa resellable dentro de una bolsa negra para evitar descomposición por foto-degradación.

1.1.2. Recolección de las muestras para análisis toxicológico

Recolección de polen de trampa

Tome mínimo 20 gramos de polen (un poco más de dos cucharadas soperas colmadas).

Condiciones de muestreo de polen

- Recoja el polen directamente de las trampas atrapa-polen que están en las colmenas.
- Asegúrese que el material de polen muestreado es el que corresponde a los últimos días de forrajeo. De no tener certeza que es un material fresco, es conveniente excluirlo del análisis puesto que los datos que arroje serán poco informativos de los episodios agudos sucedidos en la colmena.
- Deposite el polen en la bolsa resellable, marque el material con los datos de colecta escritos con lápiz de grafito en el papel bond y selle inmediatamente. Ponga la bolsa resellable dentro de una bolsa negra para evitar descomposición por foto-degradación y coloque el papel bond con los datos en el intermedio de estas dos bolsas.
- Si la toma de la muestra es realizada por una persona con experiencia o entrenamiento, las matrices en la colmena (néctar, polen, cera) deben prepararse separadamente fuera de los panales en un lugar seco, limpio y enviarse como muestras separadas. Si no se dispone de personal entrenado, se deben tomar muestras y enviar los segmentos completos de los panales con néctar y polen.

Recolección de miel para análisis toxicológico

- Tome entre 250 y 500 ml de miel directamente de los panales, depositándola en el frasco de vidrio previamente esterilizado.

Condiciones de muestreo de miel

- Con ayuda de una herramienta desinfectada, abra los opérculos de los panales e inclínelos para extraer la miel directamente en el frasco estéril.

- Selle y marque el frasco inmediatamente. Póngalo dentro de una bolsa negra para evitar descomposición por foto-degradación.

Recolección de cera para análisis toxicológico

- Tenga en cuenta que la muestra de cera es el resultado de una acumulación de tiempo de trabajo de la colmena; incluso, si se utilizan láminas estampadas, estas pueden contener cera de otras colmenas y sustancias diferentes a la misma cera que puede ser no relevante al momento del análisis de los resultados. Sin embargo, si decide tomar las muestras, considere las siguientes recomendaciones.
- Tome una muestra de 100 gramos de cera directamente de los panales de la colmena.

Condiciones de muestreo de cera

- Extraiga la muestra de marcos que no contengan cría de abejas (larvas).
- Deposite la muestra en las bolsas resellables o en un frasco de vidrio estéril, marque el recipiente y selle inmediatamente.

Recolección del alimento

- Tome entre 250 ml y 500 ml del alimento que el apicultor le proporciona a las abejas. Deposítelo en un frasco esterilizado previamente y póngalo dentro de una bolsa negra para evitar degradación por foto-descomposición.

Condiciones de muestreo de alimento

- Retire la cantidad requerida directamente de los recipientes alimentadores de la colmena y deposítelos en un frasco de vidrio aséptico. Selle y marque el frasco inmediatamente.

1.2 Toma de muestra de matrices exógenas a la colmena:

Se deben tomar muestras de la vegetación espontánea y del cultivo donde probablemente las abejas pudieron intoxicarse. La vegetación espontánea corresponde a plantas con flores abiertas o malezas en las áreas tratadas o circundantes que pudieron haber sido expuestas a los productos agroquímicos asperjados, teniendo en cuenta las distancias descritas a continuación.

Condiciones de muestreo de la vegetación aledaña

Tome 500 gramos de la vegetación objetivo. Coloque la muestra vegetal en toallas de cocina y luego en papel periódico e introdúzcala en una bolsa resellable con los respectivos datos de campo escritos con lápiz de grafito en la hoja de papel bond. La muestra puede limitarse a lo reglamentado por la ley para este tema: cuando se realizaron aplicaciones terrestres, tomar muestras de la vegetación indicada máximo a 10 m con respecto al cultivo y para aplicaciones aéreas, tomar muestras de la vegetación indicada hasta 100 m con respecto al cultivo (Decreto 1843 de 1991).

1.3 Rotulado de la muestra:

Cada muestra debe ir acompañada de una etiqueta que contenga toda la información sobre la localización del apiario de donde se extrajo la muestra y las características del material enviado. Los datos mínimos que debe contener una muestra son:

> Departamento. Municipio. Vereda. Nombre de la Finca donde está ubicado el apiario. Geoposición del sitio de toma de muestra. Nombre del apicultor. Identificación de la colmena de donde se extrajo la muestra. Elemento muestreado (cera, miel, polen, etc.). Nombre completo del colector. Fecha de recolección de la muestra (día, mes, año, el mes debe colocarse en letras).

La identificación de la muestra debe hacerse con lápiz, con letra legible, en papel bond y colocarlo tanto interna como externamente en la muestra. Los datos que se ubican en el exterior del contenedor, junto con la nota de entrega de la muestra deben colocarse en una bolsa protectora transparente.

Se debe anexar una hoja con información relevante del incidente:

- Fecha de la última visita del apicultor al apiario
- Descripción de cultivos vecinos y distancia aproximada.
- Si conoce a ciencia cierta si en los cultivos se aplican agroquímicos, indicar el nombre comercial o el ingrediente activo.
- Describir los tratamientos químicos aplicados a la colmena, con el nombre comercial y del ingrediente activo del producto empleado, frecuencia de aplicación y fecha de la última aplicación.
- Fotos del sitio del envenenamiento, así como de los alrededores
- Describir la sintomatología con la que encuentra a las abejas, lo más detallado posible.
- Describir el estado sanitario de la colmena, especialmente la información que indique si la colmena se encuentra en condiciones de producción adecuadas, si las abejas se comportan conforme a los parámetros estándares de una producción sana o si, por el contrario, se registra disminución de la producción o condiciones anormales en la colmena.

1.4 Embalaje de la muestra.

Las muestras deben empacarse en material de embalaje (nevera de icopor o similares) nuevo o completamente limpio y estar suficientemente refrigerada para asegurar su conservación hasta el destino final.

1.5 Almacenamiento de muestras ante y durante el transporte

- Si el tiempo para el envío es de algunas horas, la muestra debe mantenerse en un lugar fresco.
- Si el tiempo de almacenamiento previo al envío es más prolongado (1-2 días o más), la muestra debe colocarse en un congelador a una temperatura igual o inferior a -18 ° C. Bajo esta condición, la muestra puede, si es necesario, almacenarse durante varias semanas antes de enviarse para su análisis (ANDI-Cámara Procultivos 2018).

1.6. Transporte de las muestras

Todas las muestras deben ser enviadas por un servicio de mensajería y asegurar el mantenimiento de la cadena de frío.

2. Toma de muestras para análisis sanitario

Aquí se exponen los métodos de evaluación y toma de muestras para los problemas sanitarios de mayor impacto económico y aquellos referidos por la OIE.

2.1. Extracción de muestras para Varroasis de las abejas melíferas

Los síntomas clínicos del ataque por Varroa pueden observarse en cualquier momento de la vida de la colmena. Esencialmente, el ataque de Varroasis puede dañar la cría. Las abejas y su descendencia infestada durante la fase de cría muestran varios tipos de daños: acortamiento de la vida, cambios en el comportamiento y un incremento en la sensibilidad a las enfermedades. Otros síntomas dependen del número de ácaros que se introduzcan en la celdilla para reproducirse. Solo en las etapas letales inmediatamente antes de la desintegración de las colonias aparecen los signos clínicos, tales como la atrofia de las alas (figura 1) y el acortamiento del abdomen. Esto se debe a una elevada sensibilidad al virus que deforma las alas y provoca parálisis aguda así como a la infección de heridas y pérdida de hemolinfa.
Según la OIE (2013), hay tres técnicas de diagnóstico de Varroasis; la más recomedable y ampliamente utilizada, por su facilidad de implementación es:

Figura 1. Fotografía: Bayer- Bee Care Center

a) Examen de la abeja (Infestación de Varroa en abejas adultas)

Se extraen aproximadamente 200–250 abejas de panales con cría abierta. La muestra debe tomarse de ambos lados de, al menos, tres panales de cría no operculados. Para estimar el porcentaje de infestación de un apiario, es necesario recoger y analizar muestras individuales a partir de al menos el 10% de las colmenas y determinar posteriormente la tasa de infestación media basada en estos resultados individuales.

Procedimiento de la prueba

- Se sacrifican las abejas en un frasco trasparente, limpio con tapa sumergiéndolas en alcohol etílico al 70% (de farmacia), teniendo precaución de no atrapar a la reina
- Se agita el contenedor durante 10 minutos para que caigan los ácaros.
- Se separan las abejas de los ácaros mediante un tamiz con un tamaño de malla de aproximadamente 2–3 mm. En algunos casos, el ácaro Varroa puede confundirse con el piojo de la abeja, *Braula coeca*. Este último es redondo, no ovalado, y al ser un insecto, sólo tiene tres pares de patas.
- Se debe revisar el frasco y las abejas en busca de ácaros que no hayan caído para sumarlos al conteo.
  Se cuentan, la cantidad de abejas, la cantidad de Varroas y se aplica la ecuación:
  %IVA= No. de Varroas/No. de abejas * 100
  para determinar el porcentaje de infestación en Varroa adulta.

Ciertas especies diferentes de ácaros pueden asociarse con los ácaros Varroa en las abejas, pero se diferencian fácilmente. Además, otros ácaros parásitos, tales como *Tropilaelaps* spp., se sabe que causan daños en las colonias de las abejas similares a los producidos por Varroa.

Extracción de muestras para Acarapisosis de las abejas melíferas

Según la OIE (2013a) no existen signos clínicos confiables para determinar la acarapisosis debido a que no son específicos y las abejas se comportan de modo muy semejante a como lo hacen las abejas afectadas por otras enfermedades o trastornos. En general, la OIE indica que giran sobre sí mismas cerca del enjambre y se suben a las briznas de hierba, incapaces de volar y se puede presentar disentería.

Para el análisis en el laboratorio, la OIE (2008a) recomienda tomar una muestra de 50 abejas de las colonias sospechosas, principalmente de abejas que se arrastran y son incapaces de volar, que se encuentren dentro de un área de unos 3 metros delante de la colmena. Las abejas pueden estar vivas, moribundas o muertas. Las vivas se sacrifican primero con alcohol etílico al 70%[1]. Las abejas no deben llevar muertas más de 2-3 días, a menos que estén conservadas entre 4°C y -20°C por varios meses.

[1] Este alcohol corresponde al alcohol antiséptico de uso médico, puede ser adquirido en cualquier farmacia.

2.3 Extracción de muestras para Nosemosis (figura 2)

Se toman 50 abejas adultas de la entrada de la piquera, las cuales se introducen en un frasco de vidrio o plástico con alcohol etílico al 70 % para su conservación hasta su posterior análisis en el laboratorio (Velásquez y Vargas 2016). Velásquez y Vargas (2016) recomiendan recolectar 100 y Tibatá (2016) 200 abejas adultas de los cuadros centrales de cada colmena y que contengan cría (Velásquez y Vargas 2016). Las abejas se introducen en un frasco de vidrio o plástico con 100 ml de alcohol etílico al 70% para preservarlas (Velásquez y Vargas 2016).

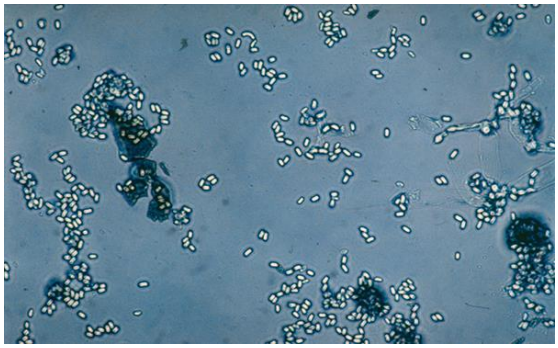

Figura 2. Fotografía de *Nosema apis*: Microsporido unicelular parasítico. Fotografía: Bayer-Bee Care Center

2.4 Extracción de muestras para determinar la infestación por el escarabajo de las colmenas (*Aethina tumida*)

El primer signo de la infestación de *Aethina tumida* es la presencia de adultos en la colmena. *Aethina tumida* es un escarabajo (Coleoptera) de la familia Nitidulidae; su cuerpo puede alcanzar los 5 mm de largo y 3 mm de ancho; las hembras son ligeramente más grandes que los machos (Ellis *et al*., 2001) (figura 3A). Los adultos son de un color entre marrón oscuro y negro (más claro después de la eclosión). Durante las inspecciones, los escarabajos adultos huyen de la luz, se esconden y se pueden ver corriendo para ponerse a cubierto en las esquinas o, de forma similar, sobre los panales (OIE 2013b). Los adultos pueden confundirse con otros escarabajos nitidúlidos, que también pueden asociarse a las colonias (OIE 2013b).

Según la literatura citada por la OIE (2013b), los huevos son blancos y miden unos 1,4 × 0,26 mm, más o menos de las 2/3 partes del tamaño de un huevo de abeja melífera (figura 3B); son puestos en la tabla que sirve de fondo a la colmena, en los panales y debajo de los opérculos de las celdillas de la progenie (OIE 2013b). Las larvas son de color blanquecino, pueden medir hasta 1 cm y tienen tres pares de patas y espículas dorsales (figura 4C). Las infestaciones larvarias se asocian con un olor a podrido debido a la muerte de la progenie de abejas melíferas o a la fermentación de la miel almacenada (OIE 2013b) (figura 4D).

Según la OIE (2013b), es difícil encontrar huevos de escarabajo en una colonia, sobre todo cuando los niveles de infestación son bajos; no 0obstante, sugiere buscarlos en las fisuras de alrededor del nido o en los opérculos de las celdillas de la progenie, lo cual posiblemente indique que el escarabajo hembra ha pinchado el opérculo y ha puesto huevos en el interior de la celdilla. Pueden hallarse pupas del pequeño escarabajo de las colmenas tamizando suelo de alrededor de la colonia y buscando las cámaras de las pupas o las pupas en sí.

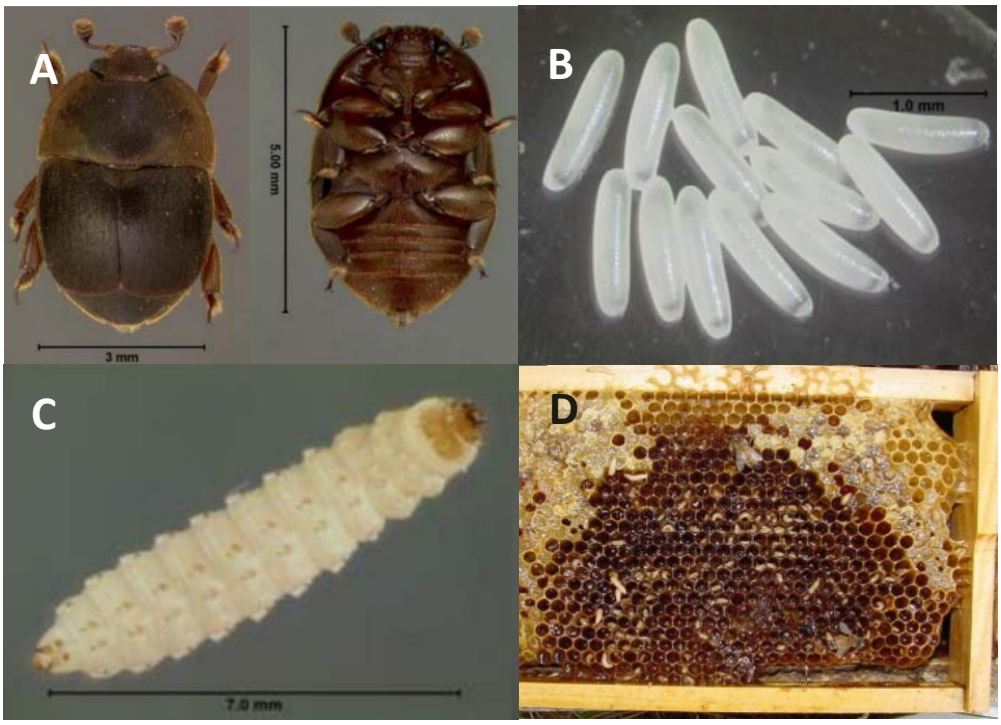

Figura 4. A. Vista dorsal (izquierda) y ventral (derecha) de un adulto de *A. thumida*. Fotografías de Lyle Buss (izda.) y Josephine Ratikan (dcha.), Universidad de Florida (tomado de OIE 2013). B. Huevos. Fotografía de Josephine Ratikan, Universidad de Florida. C. Vista dorsal de la larva. Fotografía Josephine Ratikan, Universidad de Florida. D. Daños al panal atribuidos a *A. thumida.* Fotografía Universidad de Georgia.

Después de observar estados de desarrollo de insectos compatibles con *A. thumida*, es necesario tomar las muestras de los escarabajos adultos y enviarlos al laboratorio. Se recomienda tomar una muestra con más de 10 escarabajos. Los frascos con alcohol deben rotularse con los datos de campo, conforme se ha explicado para otras matrices.

La OIE sugiere que, después de comprobar si las colonias de las abejas melíferas están infestadas por el pequeño escarabajo de las colmenas, se realice la evaluación de la colmena para detectar los primeros indicios de infestación, bajo dos metodologías:

A. Examen manual de la colonia. (recomiendan que sea efectuado por dos personas):

- Aplicar humo ligeramente a la colonia.
- Retirar la tapa de la colonia y se golpear la tapa sobre el contrachapado (para desprender todas las abejas y escarabajos adultos adheridos a la tapa)
- Pasar la mano o un palo pequeño por las abejas y recoger todos los escarabajos adultos observados, mediante un aspirador.
- Inspeccionar todas las abejas que queden sobre el contrachapado puesto que grupos de abejas pueden ocultar fácilmente algunos escarabajos
- Retirar el marco exterior del alza superior que contiene las abejas y agitar las abejas para que caigan del marco al contrachapado
- Volver a repetir la recolección de escarabajos.
- Una vez las abejas hayan sido agitadas para desprenderlas del marco, debe darse la vuelta al marco y golpearlo contra el contrachapado para desprender los escarabajos adultos del panal. Este paso deberá repetirse dos a tres veces para ambas caras del marco.
- Volver a recoger los escarabajos
- Golpear cada uno de los marcos del alza superior y el alza vacía contra el contrachapado. Este paso deberá repetirse para todas las alzas, todos los marcos y la tabla que sirve de fondo a la colmena.

El aspirador bucal empleado en esta metodología, también sirve para la toma de muestras para envío al laboratorio. En caso de no contar con él, también se puede hacer uso de un pincel que se impregna en el alcohol antiséptico de contiene el recipiente para la toma de muestras.

B. Examen de la colonia mediante uso de planchas y trampas

Este método es menos laborioso. Las planchas empleadas tienen agujeros que permiten a los escarabajos esconderse en los pliegues, pero impiden la entrada de las abejas. Puede colocarse en la tabla que sirve de fondo a la colmena. Para detectar los escarabajos, se coloca una tira de cartón corrugado o material similar (15 cm × 15 cm), una de cuyas superficies se ha pelado para dejar al descubierto los pliegues, sobre la tabla que sirve de fondo a la colmena con el lado de los pliegues mirando hacia abajo. Se cubre con una madera que se ajusta a la tabla que sirve de fondo a la colmena por debajo de los cuadros de la misma. Se deja la plancha en la colonia durante ≤ 3 días, se retira y se examina para ver si hay adultos y larvas de escarabajo. Se ha observado que con una plancha similar de plástico se detectan escarabajos adultos a nivel de la colmena y que ello puede servir para predecir las tasas de infestación por escarabajos adultos.

2.5 Extracción de muestras para determinar Loque americana (*Paenibacillus larvae*) (figura 5)

La OIE (2016) indica que, siempre que sea posible, debe enviarse un marco entero al laboratorio, para evitar el riesgo de deformación durante el transporte. Como alternativa, señalan que las crías se muestrean cortando un trozo de panal de un tamaño de unos 20 cm^2, que contenga la mayor cantidad posible de crías muertas o que presenten cambio de color; cuando la muestra la toma una

persona experimentada, se puede recoger restos de larva o de pupa infectados directamente de las celdas con un hisopo estéril, en cuyo caso el tamaño de la muestra puede ser más reducido, facilitándose así el embalaje y el transporte de la muestra al laboratorio. La misma organización indica que se deben considerar como sospechosas todas las colonias ubicadas en las proximidades de un caso sospechoso de padecer la Loque Americana y debe tomarse una amplia variedad de muestras para la confirmación. Varios autores, citados por OIE (2016), sugieren que para detectar la presencia de esporas de , pueden utilizarse, además de las muestras de crías, reservas de alimento (miel [Ritter y Kiefer, 1995; von der Ohe y Dustmann, 1997], polen [Gochnauer y Corner, 1987] y jalea real), obreras adultas (Lindström y Fries, 2005) y restos de cera (Bzdil, 2007; Titera y Haklova, 2003). Las muestras de miel pueden recogerse de las celdas próximas a las crías con cucharas desechables distintas para prevenir la contaminación cruzada de las muestras; no obstante, en el momento del muestreo, puede que la miel haya estado depositada en el panal durante meses. Las abejas adultas pueden recogerse sacudiendo o cepillando los panales de la cámara de cría o de las alzas melarias para que caigan en un saco o recipiente de plástico. La OIE indica que, para obtener resultados confiables, deben analizarse abejas del nido de las crías (y no de las alzas melarias) y los restos de cera pueden recogerse del fondo de la colmena durante todo el año.

Cuando se emplean abejas adultas para la muestra, éstas pueden congelarse o sumergirse en recipientes bien cerrados con etanol al 70%, aunque también son adecuadas las abejas secas; cada muestra debe contener al menos 30 abejas. En caso de tomar muestras de miel, la cantidad mínima para poder detectar esporas viables de *P. larvae* es de 50 g.

Figura 5. Celdillas afectados por Loque americana. Fotografía: Bayer-Bee Care Center

Embalaje de la muestra para determinar Loque americana:

Según la OIE, se debe envolver el panal de cría en una bolsa de papel, una toalla de papel o un periódico y colocarse en una caja de madera o cartón duro para el transporte; es necesario evitar los envoltorios de plástico, para prevenir el crecimiento fúngico. Los hisopos que contienen restos de larvas pueden introducirse en tubos de ensayo adecuados con tapón. Las provisiones alimenticias se pueden introducir en un tubo de ensayo o en un tarro adecuado o envolverse en una bolsa de plástico junto con la cuchara. Debe evitarse la fuga o la contaminación cruzada de las muestras. En

lo posible, las muestras frescas deben enviarse refrigeradas al laboratorio. Los detritus y la cera de las colmenas deben embalarse en una bolsa de papel, un bote de plástico tapado con una tapa de papel o en tubos de papel tapados con una tapa de plástico. El embalaje secundario consiste en una bolsa de plástico a modo de protección frente a la contaminación cruzada. En el caso de las muestras a granel, se pueden conservar incluso en un embalaje terciario (cajas de cartón grandes) que proteja frente a los posibles daños mecánicos.

Condiciones de muestreo de abejas para análisis de parásitos y patógenos:

Las condiciones de asepsia, rotulación, empaque, embalaje y demás factores para el envío de muestras son consideradas en el punto 1 de este documento.

Laboratorios en donde se pueden realizar análisis

Análisis toxicológicos

Los laboratorios que están registrados ante el ICA y a los que se les puede enviar las muestras para análisis toxicológico pueden ser consultados en el siguiente enlace: https://www.ica.gov.co/Areas/laboratorios/Laboratorios-Registrados-ICA-2-1

Análisis sanitarios

Para el análisis de patógenos, se debe consultar el procedimiento a seguir al Laboratorio nacional de diagnóstico Veterinario del ICA: recepcion.diagnostico@ica.gov.co

Detección de patógenos o enfermedades exóticas

Cuando un productor o ciudadano normal conozcan de un primer reporte de una enfermedad no presente en el país, está obligado a declarar esta situación ante la Autoridad competente, que en el país es el Instituto Colombiano Agropecuario ICA, bajo la Resolución No. 003714 del 20 de octubre de 2015, *"Por la cual se establecen las enfermedades de declaración obligatoria en Colombia",* la cual puede ser consultada en el siguiente enlace: https://www.ica.gov.co/getattachment/3188abb6-2297-44e2-89e6-3a5dbd4db210/2015R3714.aspx

Literatura citada

ANDI-Cámara Procultivos. 2018. Guía para la toma de muestra de abejas muertas para diagnóstico. 5pp. Información sin publicar.

Colectivo Abejas Vivas. 2017. Protocolo para la toma de muestras de abejas muertas para análisis toxicológico. 5pp. Sin publicar.

Ellis, J.D.; Delaplane, K.S.; y Hood, W.M. 2001. Small hive beetle (*Aethina tumida*) weight, gross biometry, and sex proportion at three locations in the southeastern United States. Am. Bee J., 142 (7), 520–522.

Food and Agriculture Organization of the United States. 2018. Live Animals. Último ingreso 19 noviembre de 2018. http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA

Invernizzi, C.; Antúnez, K.; Campa, J.P.; Harriet, J.; Mendoza, Y.; Santos, E.; Zunino, P. 2011. Situación sanitaria de las abejas melíferas en Uruguay. Veterinaria, (Montevideo) 47 (181) 15-27 pp.

Klein, S.; Cabirol, A.; Devaud, JM.; Barron, A.; Lihoreau, M. 2017. Why the bees are so vulnerable to enviromental stressores. Trends in Ecology & evolution. Cell Press.Tree 2201 11pp.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. 2018. Informe Sectorial. Cadena Productiva de las abejas y la Apicultura. 37 pp.

Organización Mundial de Sanidad Animal- OIE. 2013.Varroosis de las abejas melíferas. En: Manual de la OIE sobre animales terrestres. Capítulo 2.2.1. Versión adoptada en la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE en mayo de 2008. 463-467pp.

Organización Mundial de Sanidad Animal- OIE . 2013a. Acarapisosis de las abejas melíferas. En: Manual de la OIE sobra animales terrestres. Capítulo 2.2.1. Versión adoptada en la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE en mayo de 2008. 424-430 pp.

Organización Mundial de Sanidad Animal- OIE 2013b. Infestación por el escarabajo de las colmenas (*Aethina tumida*). En. Manual de la OIE sobre animales terrestres. Capítulo 2.2.5. 7pp.

Organización Mundial de Sanidad Aminal OIE. 2018. http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2018/ último ingreso 4 noviembre de 2018.

Organización Mundial de Sanidad Animal- OIE . 2016. Loque americana de las abejas melíferas (infección de las abejas melíferas por *Paenibacillus larvae)*. Versión adaptada de la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE. 19 pp.

Pantoja, A.; Smith-Pardo, A.; García, A.; Saénz, A.; Rojas, F. 2014. Principios y avances sobre polinización como servicio ambiental para la agricultura sostenible en países de Latinoamética y El Caribe. FAO. 56 pp.

Tibatá Rodríguez, V.M. 2016. Detección de patógenos causantes de enfermedades de impacto en apicultura y determinación de los mitotipos de africanización en tres regiones de Colombia. Tesis PhD Ciencias Veterinarias – Salud y Producción Animal. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Bogotá, Colombia 2016. 315 pp.

Velásquez Gutiérrez, D.; Vargas, G. 2016. Diagnóstico de enfermedades parasitarias en abejas africanizadas *Apis mellifera* en el municipio de Marsella, Risaralda, Colombia. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/1618/1945. Último ingreso 4 nov 2018.

PUBLICACIÓN
PROCULTIVOS ANDI
2019

ANDI
Cámara Procultivos

Y su programa:
CuidAgro®
PROGRAMA DE MANEJO RESPONSABLE