



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE AGRICULTURA,
ALIMENTACIÓN Y MEDIO
AMBIENTE

DIRECCION GENERAL
DE SANIDAD DE LA PRODUCCION
AGRARIA

SUBDIRECCION GENERAL
DE SANIDAD E HIGIENE ANIMAL Y
TRAZABILIDAD

**PROTOCOLO PROGRAMA DE VIGILANCIA
PILOTO SOBRE LAS PÉRDIDAS DE COLONIAS DE
ABEJAS
2014-2015**

17 de septiembre 2014



1. PRINCIPIOS GENERALES

1.1. Objetivos

1.2. Implementación

1.3. Definiciones preliminares

2. ENFERMEDADES Y TRANSTORNOS EN LOS APIARIOS DURANTE LA VISITA OTOÑAL

2.1. Mortalidad invernal de las colonias de abejas

2.2. Mortalidad en la estación de verano de las colonias de abejas

2.3. Infestación por varroa y varroosis

2.3.1. Tasa de infestación de varroa

2.3.2. Varroosis

2.4. Virus de las alas deformadas (DWV), virus de la parálisis aguda (ABPV) y factores de riesgo de mortalidad invernal

2.4.1. DWV y ABPV

2.4.2. Investigación de factores de riesgo de mortalidad invernal

2.5. Nosemosis

2.6. Parálisis crónica

2.7. Loque americana y loque europea

2.7.1. Loque americana

2.7.2. Loque europea

2.8. Parásitos exóticos: *Aethina tumida* y *Tropilaelaps spp*

2.8.1. *Aethina tumida*

2.8.2. *Tropilaelaps spp*

2.9. Fitosanitarios tóxicos para las abejas

3. MÉTODO PRÁCTICO PARA LA IMPLEMENTACIÓN DEL PROTOCOLO

3.1. Muestreo y control de las colonias

3.1.1. Número de colonias a muestrear

3.1.2. Selección de las colonias

3.2. Calendario de visitas



3.3. Síntomas clínicos, muestras y solicitud de análisis

3.4. Curso práctico de las visitas

- 3.4.1. Visita 1 antes del periodo invernal
- 3.4.2. Visita 2 después del periodo invernal
- 3.4.3. Visita 3 durante la estación de producción de miel

ANEXO I: Selección de las colmenas dentro de un colmenar de forma Simple Aleatoria.

ANEXO II: INSTRUCCIONES PARA LA TOMA, IDENTIFICACIÓN, EMBALAJE, CONSERVACIÓN Y ENVÍO DE MUESTRAS

ANEXO III: LISTADO DE EQUIPO PARA LA VISITA



1. PRINCIPIOS GENERALES

1.1. Objetivos

Los objetivos del programa de vigilancia piloto son proponer procedimientos de vigilancia que permitan llevar a cabo una estimación adecuada de las pérdidas de colonias de abejas en los países europeos seleccionados para este estudio.

Además, el programa de vigilancia dará soporte a la implementación de estudios de prevalencia en las principales enfermedades y desórdenes de las abejas. El protocolo estimará la incidencia siguiendo procedimientos armonizados utilizando indicadores epidemiológicos comunes.

Los objetivos de esta investigación están encaminados a:

- Estimar la tasa de mortalidad invernal de las colonias de abejas.
- Estimar la tasa de mortalidad durante el periodo de cosecha de miel.
- Estimar la tasa de infestación por Varroa destructor antes de la estación invernal.
- Estimar la tasa de infestación y caracterización de Nosema spp antes de la estación invernal
- Estimar la prevalencia clínica de las principales enfermedades de las abejas antes y después de la estación invernal y durante el periodo de actividad apícola: Loque americana, loque europea; varroosis, nosemosis, virus DWV, virus ABPV y virus de la parálisis crónica (CBPV).
- Asegurar una alerta temprana en el caso de la detección de dos artrópodos exóticos, Aethina tumida y Tropilaelaps spp.
- Censo de los apiarios con elevado riesgo de introducción de artrópodos exóticos.
- Vigilancia de los fitosanitarios recogidos en la Directiva 2010/21/UE de la Comisión de 12 de marzo de 2010 por la que se modifica el anexo I de la Directiva 91/414/CEE por lo que respecta a las disposiciones específicas relativas a la clotianidina, el tiametoxam, el fipronil y el imidacloprid, con posibilidad de ampliar la vigilancia a otras sustancias activas para verificar la exposición real de las abejas a las mismas.



1.2. Implementación

El programa de vigilancia sobre la mortalidad de las colonias de las abejas se basa en:

- Una vigilancia activa apoyado en las visitas llevadas a cabo en un periodo específico por inspectores apícolas, que tendrán una formación adecuada, sobre un número representativo de colmenares seleccionados.

Para el resto del documento, por **inspector apícola** se entenderá el agente sanitario, veterinario de ads/asociación de apicultores, veterinario oficial o cualquier otra persona oficialmente encargada de la realización de las visitas a los apiarios.

Las visitas se llevarán a cabo en diferentes periodos, en el **intervalo máximo de un mes**, con el objetivo obtener resultados comparables. Cada CCAA, dada la diversidad climatológica a nivel nacional, definirá el mejor mes para la realización del muestreo en su comunidad:

Otoño de 2014: visita antes del periodo invernal (octubre; noviembre).

Primavera 2015: visita al final del periodo invernal/inicio de la primavera (febrero, marzo, abril).

Verano de 2015: visita durante el periodo de cosecha de miel (mayo, junio, julio).

Población objetivo del muestreo:

En otoño de 2014 se seleccionarán al azar "**x colmenares**" por unidad geográfica. (Ver Programa de Vigilancia Piloto de las Enfermedades de las abejas).

- 2/3 de los colmenares se seleccionarán de nuevo al azar.
- 1/3 de los colmenares serán seleccionados de los colmenares que participaron de forma consecutiva durante los programas 2012-2013 y 2013-2014 manteniendo en la medida de lo posible las colonias que fueron seleccionadas al azar con la misma identificación. En el caso de que el apicultor rehúse a participar de nuevo, se elegirá a otra explotación de la campaña 2013-2014. *En caso de que algunas de las colonias seleccionadas al azar hayan desaparecido (muerte, venta, unión, etc) se elegirán otras nuevas al azar.*



	Nº apiarios objeto de vigilancia	Apiarios del programa 2013-2014	Selección de nuevos apiarios
ANDALUCÍA	44	15	29
ARAGÓN	10	3	7
ASTURIAS	2	1	1
ISLAS BALEARES	0	0	0
CANARIAS	2	1	1
CANTABRIA	0	0	0
CLM	14	5	9
CyL	32	10	22
CATALUÑA	8	3	5
EXTREMADURA	36	12	24
GALICIA	8	3	5
MADRID	0	0	0
MURCIA	8	3	5
NAVARRA	2	0	2
PAÍS VASCO	3	1	2
LA RIOJA	2	1	1
VALENCIA	32	11	21
TOTALES	203	69	134

Dentro de cada colmenar seleccionado se elegirán “y colonias” al azar durante la primera visita en otoño (que permita detectar la prevalencia esperada en cada colmenar). (Ver anexo I)

Censo colmenas	Muestra 95/20
≤ 8	todas
9-10	8
11-20	10
21-30	11
31-60	12
>61	13

Los mismos colmenares y colonias serán visitados durante las tres visitas.



1.3 Definiciones preliminares

- **Apicultor:** persona física o jurídica, propietario o titular de una o varias colmenas.
- **Abeja:** abeja doméstica (*Apis mellifera*)
- **Colonia de abejas:** grupo de abejas criadas con el objetivo de producir miel u otros productos de las colmenas.
- **Colmena:** la unidad de hábitat de una colonia de abejas
- **Apiario/Colmenar:** Colmena o grupo de colmenas cuyo manejo permite considerarlo como una única unidad epidemiológica.



2. ENFERMEDADES Y TRANSTORNOS EN LOS APIARIOS DURANTE LAS VISITAS

2.1. Mortalidad invernal de las colonias de abejas

■ Objetivos.

Estimar la tasa de mortalidad invernal.

■ Definición de caso de mortalidad invernal de colonia de abejas.

Una colonia de abejas se considera que ha sufrido mortalidad invernal si:

- Durante la visita de otoño de 2014 (antes del periodo invernal), la colonia se registró como viva por el inspector apícola.
- Durante la visita de primavera de 2015 (después del periodo invernal):
 - o La colonia presenta algunas abejas pero se considera no viable (casi muerta: menos de 500 abejas en la colonia) y no tiene el vigor suficiente para desarrollarse durante el periodo activo de pecoreo, según la experiencia del inspector.
 - o **Ó** la colonia de abejas se encuentra en una de estas situaciones:
 - todas las abejas están muertas en el interior de la colmena;
 - todas las abejas están muertas y la colmena está vacía;
 - la colonia de abejas está sin reina y presenta abejas obreras ponedoras sin oportunidad de criar una nueva

Con el objetivo de evaluar la tasa de mortalidad invernal, la visita realizada después del periodo otoñal **deberá realizarse con la suficiente prontitud**, antes del gran incremento de población característico de las abejas que tiene lugar en primavera. La fecha deberá adaptarse a las condiciones meteorológicas de las áreas objeto de vigilancia.

■ Observaciones durante la primera visita (otoño de 2014)

- Para conseguir una buena organización durante la visita: debe preguntarse al apicultor cualquier información acerca de la actividad apícola necesaria para establecer una fecha adecuada para la visita.
- Se recomienda rellenar la parte sobre datos generales del formulario de inspección antes de comenzar la inspección.



- Anotar el número total de colonias presentes en el colmenar
- Dibujar un croquis del asentamiento (recomendable)
- Seleccionar una muestra al azar de “**y colonias**” e identificarlas claramente y de forma indeleble. Se sugiere la utilización de *crotales* para ello con la identificación individual que se fijará en la cámara de cría de la colmena.
- Abrir las colonias seleccionadas y rellenar la parte del formulario que corresponde a la inspección de las colmenas. Deberá realizarse con especial atención dado que se trata de una información crucial para los siguientes análisis de datos.
- Si la colonia seleccionada al azar se considera que está muerta se elegirá otra colmena al azar con el objetivo de alcanzar el número total de colmenas objeto de muestreo. En este caso, la determinación de que una colonia esté muerta o no la realizará el apicultor/inspector apícola conforme a su experiencia.
- En el resto de casos (colmenas débiles) se mantendrán en el muestreo.

Nota importante: no es adecuado descartar ninguna colonia que esté en malas condiciones incluso si el inspector piensa que la colonia no sobrevivirá el invierno. Si no se hace de esta manera se introducirá un sesgo en el muestreo.

■ Observaciones durante la segunda visita (primavera de 2015)

- Anotar el número total de colonias presentes en el colmenar.
- Abrir y examinar cada colmena seleccionada e identificada para el estudio.
- Rellenar el formulario para la visita 2.
- Por favor, también indicar en relación a las colonias seleccionadas:
 - El número de colonias que han sido vendidas, movidas del emplazamiento o partidas en el intervalo de estas visitas.
 - El número de colonias que se han unido entre las dos visitas especificando los motivos.
 - El número de colonias muertas

Nota importante: Además, la *tasa de mortalidad observada por el apicultor* puede registrarse en el formulario tanto si está relacionada específicamente con el apiario como con la explotación apícola en general.

Por lo tanto, se registrarán dos tasas de mortalidad de las colonias de abejas:



- Una para las colonias que son objeto de muestreo (aquéllas que están identificadas).
- Una dada por el apicultor en relación tanto del apiario como de la explotación apícola en general.

■ **Desarrollo de datos:**

Indicador epidemiológico: número de colonias seleccionadas que sufre de mortalidad invernal (ver definición de caso) / Número de colonias muestreadas que fueron registradas vivas por el inspector apícola durante la primera visita (otoño 2014).

Esto se registrará como *tasa de mortalidad de las colonias por colmenar*.

2.2. Mortalidad primaveral de las colonias de abejas

■ **Objetivos:**

Estimar la mortalidad durante la estación primaveral.

■ **Definición de caso de mortalidad durante la estación de actividad apícola (primaveral)**

Una colonia se considera que sufre de mortalidad primaveral si:

- Durante la segunda visita (primavera 2015), la colonia se registró viva por el inspector apícola y fue previamente valorada como viable para sobrevivir el invierno.
- Durante la tercera visita (verano 2015):
 - La colonia presenta algunas abejas pero se considera no viable (casi muerta: menos de 500 abejas en la colonia) y no tiene el vigor suficiente para continuar la actividad apícola, según la experiencia del inspector.
 - **Ó** la colonia de abejas se encuentra en una de estas situaciones:
 - todas las abejas están muertas en el interior de la colmena.
 - todas las abejas están muertas y la colmena está vacía.
 - la colonia de abejas está sin reina y presenta abejas obreras ponedoras.
 - **Ó** la colonia ha sido unida entre la visita 2 y la visita 3.



■ **Observaciones durante la tercera visita (verano 2015):**

- Anotar el número total de colonias en el apiario.
- **Abrir y examinar cada colonia seleccionada e identificada previamente.**
- Rellenar el formulario para la visita 3.
- Por favor, también indicar de entre las colmenas seleccionadas:
 - El número de colonias que se han vendido, movido o dividido entre las dos visitas.
 - El número de colonias que se han unido entre las dos visitas especificando los motivos.
 - El número de colonias muertas seleccionadas.

Nota importante: La *tasa de mortalidad durante la estación primaveral observada por el apicultor* puede indicarse en el formulario de inspección tanto en el caso de que esté específicamente relacionado con el colmenar como con la explotación apícola en general.

Por consiguiente, se registrarán dos tasas de mortalidad de las colonias de abejas:

- Una para las colonias que son objeto de muestreo (aquéllas que están identificadas).
- Una dada por el apicultor en relación tanto del apiario como de la explotación apícola en general.

■ **Desarrollo de datos**

Indicador epidemiológico:

Número de colonias seleccionadas que sufren de mortalidad durante la primavera/ [número de colonias muestreadas registradas vivas por el inspector apícola durante la segunda visita (inicio primavera 2015) – número de colonias vendidas entre la visita 2 y 3].

El resultado se registrará como *tasa de mortalidad primaveral por colmenar*.

2.3. Infestación por Varroa destructor y varroosis

■ **Objetivos**

- Evaluar la infestación en los colmenares por Varroa destructor antes del invierno.
- Evaluar la infestación de las colonias a nivel de colmenar por Varroa destructor antes del invierno.



- Estimar la *prevalencia clínica de la varroosis* durante las tres visitas.

2.3.1. Tasa de infestación por Varroa destructor

▪ Definición de caso

Una colonia se considera infestada por Varroa destructor cuando al menos se ha encontrado una varroa en una muestra de una colonia de abejas.

Comentario: **Medida del grado de infestación por varroa.**

La infestación de la colonia se mide evaluando el número de ácaros varroa que se desprenden de las abejas adultas.

▪ Información, muestras y observaciones

• Información sobre el tratamiento utilizado contra la varroosis:

- Nombre del producto comercial/ principio(s) activo(s).
- Fecha(s) de lo(s) tratamiento(s) realizados durante el año 2014.
- Modos de aplicación.

• Muestras

- Muestrear 300 abejas adultas en las colonias seleccionadas al azar, de uno o varios cuadros de cría sin opercular (**sólo en la primera visita**).

- **Observación:** rellenar el formulario (XX) con los síntomas clínicos de varroosis observados (mirar más adelante la forma de presentación de la enfermedad).

• Análisis laboratoriales

Los ácaros varroa deben de contarse en las muestras de abejas recogidas del interior de la colmena, basado en el método de diagnóstico de la OIE. Este método se basa en el lavado de abejas para desprender los parásitos foréticos que se encuentran sobre las abejas.

http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.02.07.%20Varroosis.pdf

Nota importante: si durante la realización del cálculo de la tasa de parasitación por varroa en muestras de abejas se detectase la presencia de una reina se dará aviso inmediato al apicultor para que pueda reponerla lo



antes posible para minimizar el perjuicio que pueda ocasionarse en la colonia de abejas.

- **Desarrollo de datos**

Indicadores epidemiológicos:

Tasa de infestación:

- Número de colmenares controlados infestados por Varroa destructor durante la visita 1/ Número total de apiarios controlados.
- Número de colonias infestadas por Varroa destructor durante la visita 1/ Número total de colonias muestreadas por colmenar.
- Número de varroas/ 100 abejas/ colonia.

2.3.2. Varroosis

■ Definición de caso

Un apiario se considera positivo si la varroosis ha sido diagnosticada en una o más colonias.

Sospecha:

Cualquier colonia que presente signos clínicos, **con o sin detección de parásitos** en la colonia, se considerará sospechosa de padecer varroosis.

- Signos clínicos en abejas adultas:
 - Presencia de ácaros de varroa sobre las abejas (varroas foréticas que también pueden verse sobre los panales).
 - Abejas con alas deformadas y/o alas atrofiadas.
 - Abejas que presenten abdomen reducido.
- Signos clínicos en la cría de abeja:
 - Cría de abeja en mosaico/ cría salteada.
 - Presencia de parásitos (de color marrón en el caso de las hembras maduras, con estadios inmaduros de color blanquecino).
 - Presencia de opérculos con pequeños agujeros.
 - Presencia de larvas de color marrón claro a marrón (ausencia de aspecto viscoso propio de la loque americana).
 - Larvas muertas secas.
 - Abejas muertas con alas deformadas en celdillas selladas/pupas muertas/abejas muertas emergiendo de las celdillas (sólo emerge la cabeza, con la lengua sacada hacia fuera).



- Canibalismo de la larva o pupa.

Nota importante: Algunos casos con signos clínicos de varroosis son similares a los signos ocasionados por la presencia de la loque americana o el ácaro *Tropilaelaps spp.* El registro de los datos clínicos observados debe realizarse lo más preciso y completo posible.

Confirmación:

Una colonia se considera que es positiva a varroa si a nivel de campo se registran signos clínicos típicos (ver forma de presentación de la enfermedad), y /o si un diagnóstico de laboratorio confirma la presencia del parásito (ver más adelante las condiciones para el muestreo).

■ **Muestras y observaciones**

- Muestras de cría de abeja: el muestreo debería realizarse únicamente en caso de que se observen signos clínicos en la cría aunque no haya detección del ácaro varroa durante la observación (sospecha de otras enfermedades asociadas, por ejemplo loque americana, *Tropilaelaps spp.*):
 - o Muestra de cría sintomática: trozo de panal de 10 x 10 cm.
 - o Si el muestreo compromete la viabilidad de la colonia (por ejemplo, si la cantidad de cría es muy pequeña), podrán tomarse elementos de la muestra sintomática (por ejemplo larvas enfermas) en tubos Eppendorf.
- Observación: rellenar el formulario (XX) con los signos clínicos observados.

■ **Análisis laboratoriales:**

El diagnóstico laboratorial se basa en una aproximación sintomática: observaciones de campo combinado con el examen de muestras de cría.

Se deben de llevar a cabo análisis complementarios con el objetivo de buscar otras enfermedades asociadas.

■ **Desarrollo de datos:**

Indicadores epidemiológicos:

- Varroosis:



- Número de apiarios que presentan varroosis/ número total de apiarios controlados.

2.4. Virus de las alas deformadas (DWV), virus de la parálisis aguda (ABPV)

■ Objetivos

- Estimar la prevalencia clínica de ABPV y DWV en los *colmenares*

■ Definición de caso

Se considera que un colmenar está infectado por DWV si cualquier colonia seleccionada presenta signos clínicos típicos y se ha confirmado laboratorialmente la presencia de DWV.

Se considera que un colmenar está infectado por ABPV si cualquier colonia seleccionada presenta signos clínicos típicos y se ha confirmado laboratorialmente la presencia de ABPV.

Sospecha:

Cualquier colonia que esté infectada con DWV y que presente signos clínicos compatibles con DWV es considerada sospechosa.

Cualquier colonia que esté infectada con ABPV y que presente signos clínicos compatibles con ABPV es considerada sospechosa.

Síntomas clínicos del DWV:

- *Presencia de abejas con malformaciones, abdómenes reducidos, alas rotas.*

Síntomas clínicos del ABPV:

- Las abejas presentan temblores, las abejas se arrastran.
- Abejas muertas delante de la colmena.
- Abejas negras y de pequeño tamaño, brillantes y sin pelo, rechazadas de la colmena por abejas guardianas (observación en la piquera).
- Piquera ocupada por un gran número de abejas.
- Diarrea.

■ Muestras y observaciones



Se recogerán en un recipiente aparte 60 abejas adultas del interior de las colonias seleccionadas al azar, en uno o preferiblemente varios cuadros de cría no operculada (sólo durante la visita 1) siempre que se detecten síntomas compatibles con estos virus.

■ Análisis laboratoriales

Se llevará a cabo la detección de DWV y ABPV por PCR.

■ Desarrollo de los datos

Indicadores epidemiológicos:

- Número de colmenares que presentan DWV sobre número total de colmenares controlados.
- Número de colmenares que presentan ABPV sobre número total de colmenares controlados.

2.5. Infestación por *Nosema spp* y nosemosis

2.5.1. Tasa de infestación por *Nosema spp*

- **Objetivo:** Estimar la presencia y tasas de infestación de *Nosema spp* antes del periodo invernal en 1/3 de los colmenares

- **Definición de caso**

Una colonia se considerará infestada por *Nosema spp* cuando al menos se ha detectado la presencia de un espora en una muestra de una colonia de abejas.

Comentario: **Medida del grado de infestación por *Nosema spp***

- **Información, muestras y observaciones**

Muestras

Muestrear 60 abejas internas adultas en las colonias seleccionadas al azar, de los **cuadros de cría periféricos (sólo en la primera visita)**, solo de colmenares que han sido objeto de vigilancia durante el periodo 2012-2014.

Observación: rellenar el formulario (XX) con los síntomas clínicos de nosemosis observados (mirar más adelante la forma de presentación de la enfermedad)



▪ **Análisis laboratoriales**

Se llevará a cabo la detección y cuantificación de esporos de *Nosema spp* por microscopía óptica sobre las abejas según el método recogido por la OIE:

http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.02.04.%20Nosemosis%20de%20las%20abejas.pdf

Se llevará a cabo la diferenciación de especies (*Nosema apis*, *Nosema ceranae*) por PCR.

• **Desarrollo de datos**

Indicadores epidemiológicos:

Tasa de infestación:

- Número de colmenares controlados infestados por *Nosema spp* durante la visita 1/ Número total de apiarios controlados
- Número de colonias infestadas por *Nosema spp* durante la visita 1/ Número total de colonias muestreadas por colmenar
- Tasa de infestación por abeja/colonia

2.5.2. Nosemosis

▪ **Objetivo**

- Estimar la prevalencia clínica de la enfermedad de nosemosis en los colmenares investigados.

▪ **Definición de caso**

Se considera que un colmenar es positivo a nosemosis si cualquier colonia seleccionada presenta signos clínicos típicos y se ha detectado la presencia de *Nosema spp*.

Sospecha:

Cuando cualquier colonia seleccionada infestada por *Nosema spp* y presenta signos clínicos se considera sospechosa de padecer nosemosis.

Criterios sintomáticos:



- Presencia de abejas muertas delante de la colmena.
- Presencia de abejas arrastrándose, subiendo por la hierba.
- Restos de diarrea fuera o dentro de la colmena.
- Despoblamiento.

Nota importante: algunos síntomas clínicos son similares a otras enfermedades tal como la parálisis crónica (CBPV).

Confirmación:

Una colonia se considera positiva a nosemosis si se registran signos típicos (ver forma de presentación de la enfermedad) y se han detectado y cuantificado esporos de *Nosema spp.*

■ Muestras/Observaciones

Muestras con síntomas: en el caso de que se sospeche la presencia de nosemosis (enfermedad). Se tomarán al menos 30 abejas sintomáticas o moribundas de la **piquera**.

En ausencia de suficientes abejas sintomáticas (menos de 10) y presencia de abejas muertas recientes (menos de una semana) pueden tomarse muestras de estas abejas y analizarse de forma independiente a las anteriores.

■ Análisis laboratoriales

Se llevará a cabo la detección y cuantificación de esporos de *Nosema spp.* por microscopía óptica sobre las abejas según el método recogido por la OIE:

http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.02.04.%20Nosemosis%20de%20las%20abejas.pdf

Se llevará a cabo la diferenciación de especies (*Nosema apis*, *Nosema ceranae*) por PCR.

Nota importante: el diagnóstico de la enfermedad de nosemosis se concluirá teniendo en cuenta la presencia de signos clínicos Y de los resultados analíticos de esta enfermedad.

■ Desarrollo de datos

Indicadores epidemiológicos:



- Número de colmenares que presentan nosemosis/ Número total de colmenares muestreados.

2.6. Parálisis crónica

■ Objetivos

- Estimar la prevalencia clínica del virus de la Parálisis crónica (CVPV)

■ Definición de caso

Un colmenar se considerará positivo si la parálisis crónica se ha diagnosticado en al menos una colonia.

Sospecha:

Cualquier colonia infectada con CBPV y que presente signos clínicos es considerada sospechosa de sufrir parálisis crónica.

Criterios sintomáticos (sospecha):

- Las abejas presentan temblores, las abejas se arrastran
- Abejas muertas delante de la colmena
- Abejas negras y de pequeño tamaño, brillantes y sin pelo, rechazadas de la colmena por abejas guardianas (observación en la piquera)
- Piquera ocupada por un gran número de abejas
- Diarrea

Confirmación:

Cualquier colonia que presente signos clínicos y esté infectada con CBPV con una concentración viral superior a 10^8 copias de genoma viral por abeja se considera que presenta parálisis crónica.

■ Muestras/Observaciones

Se deben muestrear al menos 30 abejas sintomáticas (con temblores) o abejas moribundas de la **piquera**.

En ausencia de suficientes abejas sintomáticas (menos de 10) se podrán recoger abejas muertas recientemente (menos de una semana), estas últimas deberán tomarse y analizarse de forma independiente a las muestras de abejas vivas.



■ Análisis laboratoriales

Se llevará a cabo por la detección y cuantificación de la carga viral por PCR a tiempo real.

Nota importante: la conclusión analítica dependerá de la carga viral por abeja Y por la presencia de signos clínicos.

■ Desarrollo de datos

Indicadores epidemiológicos:

Número de colmenares que padecen parálisis crónica/número total de colmenares controlados.

Nota importante: la sintomatología clínica de la parálisis crónica normalmente aparece durante la primavera y a comienzos del verano. Normalmente es una enfermedad esporádica y desaparece rápidamente. Por lo tanto, la observación de los colmenares por el apicultor es esencial para detectar de forma temprana sus signos clínicos. El chequeo debería incluir un rápido pero cuidadoso examen de la piquera sin que sea necesario examinar el interior de la colmena.

2.7. Loque americana y loque europea

■ Objetivos

- Estimar la prevalencia clínica de la loque americana y la loque europea.

2.7.1. Loque americana

■ Definición de caso:

Un colmenar se considera positivo si la loque americana se ha detectado en al menos una colonia.

Sospecha:

Cualquier colonia seleccionada que presente signos clínicos se considera sospechosa de padecer loque americana.

Criterios sintomáticos (sospecha):

- Cría salteada/ Cría en mosaico



- Opérculos con colores diferentes/opérculos oscuros y hundidos/opérculos agujereados
- Larvas viscosas (prueba del palillo)
- Larvas de color café
- Escamas pegajosas
- Olor agrio de las larvas enfermas

Confirmación:

Cualquier colonia que presente signos clínicos y esté infectada con Paenibacillus larvae se considera que padece loque americana.

■ **Muestras/Observaciones**

Muestrear cría con síntomas (trozo de panal con cría de 10 x 10 cm) o, si este muestreo compromete la viabilidad de la colmena (presenta una pequeña cantidad de cría), sólo muestrear elementos que presenten síntomas (larvas enfermas) e introducirlas en tubos Eppendorf.

■ **Análisis laboratoriales**

La presencia de Paenibacillus larvae debería confirmarse por métodos bacteriológicos (microscopía óptica y cultivo de medios específicos). Si fuera necesario, este examen puede completarse con un análisis por PCR para identificar el agente patógeno de la loque americana.

El diagnóstico se realizará conforme al manual de diagnóstico de la OIE:

http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.02.02.%20Loque%20americana.pdf

■ **Desarrollo de datos**

Indicadores epidemiológicos:

Número de colmenares positivos a loque americana/ número total de colmenares controlados.

2.7.2. Loque europea

■ **Definición de caso:**

Un colmenar se considera positivo si la loque europea se ha detectado en al menos una colonia.



Sospecha:

Cualquier colonia seleccionada que presente signos clínicos se considera sospechosa de padecer loque europea.

Criterios sintomáticos (sospecha):

- Cría salteada/ Cría en mosaico.
- Opérculos agujereados.
- Presencia de larvas que se desprenden con facilidad.
- Presencia de larvas de color amarillento a color marrón en **celdillas no operculadas**. Diagnóstico diferencial con Ascosferosis, que en sus primeros estadios presenta también estos síntomas.
- Olor agrio de las larvas enfermas.

Confirmación:

Cualquier colonia que presente signos clínicos y esté infectada con *Melissococcus plutonius* se considera que padece Loque europea.

■ **Muestras/Observaciones**

Muestrear cría con síntomas (trozo de panal con cría de 10 x 10 cm) o, si este muestreo compromete la viabilidad de la colmena (presenta una pequeña cantidad de cría), sólo muestrear elementos que presenten síntomas (larvas enfermas) e introducirlas en tubos Eppendorf.

■ **Análisis laboratoriales**

La presencia de *Melissococcus plutonius* debería confirmarse por métodos bacteriológicos (microscopía óptica y cultivo de medios específicos). Si fuera necesario, este examen puede completarse con un análisis por PCR para identificar el agente patógeno de la loque europea.

El diagnóstico se realizará conforme al manual de diagnóstico de la OIE:

http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.02.03.%20Loque%20europea.pdf

■ **Desarrollo de datos**

Indicadores epidemiológicos:

Número de colmenares positivos a loque europea/ número total de colmenares controlados.



2.8. Parásitos exóticos: *Aethina tumida* y *Tropilaelaps spp*

■ Objetivos

- Asegurar la alerta precoz en caso de detección de estos dos artrópodos exóticos, *Aethina tumida* y *Tropilaelaps spp*.
- Estimar el censo de los colmenares seleccionados) que presenten un elevado riesgo de introducción de artrópodos exóticos.

Con el objetivo de tener en cuenta el censo de colmenares con elevado riesgo de introducción de artrópodos exóticos, se deberá investigar la presencia de un aeropuerto o puerto internacional cercano al colmenar o si realizan importación de reinas.

2.8.1. *Aethina tumida*

■ Definición de caso

Sospecha

Detección de escarabajos sospechosos, huevos o larvas .

Criterios de sospecha:

La detección de escarabajos sospechosos, huevos o larvas durante el examen de la colmena.

Detección de signos característicos de infestación por el Pequeño escarabajo de la colmena:

- Observación de escarabajos foréticos, larvas o huevos.
- Galerías excavadas en los cuadros.
- Presencia de cría destruida.
- Modificación del color de la miel y presencia de miel fermentada.

Nota importante: Debe recordarse que estos signos clínicos ocurren en un estadio avanzado de la infestación. Por lo tanto, resulta crucial detectar escarabajos atípicos, huevos o larvas.

Estas comprobaciones pueden realizarse en colmenas con abejas y en colmenas vacías, ya que los escarabajos se sienten atraídos por el olor de las colmenas.

Confirmación:

Identificación de *Aethina tumida* a nivel nacional Y confirmación a nivel del Laboratorio Europeo de Referencia.



■ Muestras/Observaciones

Toma de muestras de escarabajos, larvas y huevos de cualquier espécimen sospechoso.

Nota importante: Cada EEMM debe implementar exhaustivamente el Reglamento de la Comisión (EU) nº 206/2010 de 12 de marzo de 2010 para evitar la introducción de estos dos parásitos exóticos y asegurar una alerta precoz en caso de introducción. Este Reglamento implica, en el caso de España, una participación activa de las CCAA que en último término deben de proceder al envío de abejas acompañantes junto con el material de los envíos de importaciones de abejas reinas a el Laboratorio Nacional de Referencia de Algete para su análisis.

■ Análisis laboratoriales

Se debe de proceder a la identificación morfológica junto con identificación molecular. Los resultados deben de ser confirmados por el Laboratorio Europeo de Referencia.

Nota importante: En caso de detección, la alarma debe elevarse a escala nacional y europea. Se deben implementar procedimientos de emergencia adecuados y restricciones de sanidad animal (La autoridad competente deberá ser informada de forma inmediata ante la sospecha de la presencia de éstos dos parásitos). Seguir procedimiento establecido en el Manual Práctico de Operaciones de Lucha contra *Aethina tumida* y *Tropilaelaps spp.*

[http://rasve.mapa.es/Recursos/Ficheros/Manuales/MARM/38 Manual Práctico Operaciones de Lucha contra Aethina tumida y Tropilaelaps spp %20abril 2012.pdf](http://rasve.mapa.es/Recursos/Ficheros/Manuales/MARM/38_Manual_Práctico_Operaciones_de_Lucha_contra_Aethina_tumida_y_Tropilaelaps_spp_%20abril_2012.pdf)

■ Desarrollo de datos.

Indicadores epidemiológicos:

Número de brotes sospechosos por año.

Número de brotes confirmados por año.

2.8.2. Tropilaelaps spp

■ Definición de caso

Sospecha

Detección macroscópica de ácaro(s) distintos a varroa en las abejas, cría de abejas o en la piquera de la colmena.



Criterios de sospecha:

La detección de ácaros atípicos/sospechosos, distintos a varroa durante el examen de la cría de abejas, abejas o en la piquera.

Nota importante: los signos clínicos de la infestación producida por Tropilaelaps spp son similares a los signos clínicos de varroosis:

- Presencia de abejas con alas deformadas.
- Abdómenes de abejas deformados.
- Opérculos con pequeños agujeros.
- Cría salteada.
- Cría muerta.

Sin embargo, es preciso recordar que estos signos clínicos tienen lugar en estadios avanzados de la infestación. Por lo tanto, resulta crucial la detección de ácaros atípicos con anterioridad.

Confirmación:

Identificación de Tropilaelaps spp a nivel nacional Y confirmación a nivel del Laboratorio Europeo de Referencia.

Muestras/Observaciones

Toma de muestras de cualquier ácaro sospechoso.

- La detección puede ocurrir durante el recuento de varroa sobre las muestras sistemáticas de abejas.
- Para el caso de apiarios que presenten un elevado riesgo de introducción de artrópodos exóticos:
 - o Tomar una muestra de cría (10 x 10 cm).
 - o Verificar la presencia de ácaros sospechosos en la piquera cuando aparezcan signos clínicos inesperados de este parásito. Este requisito no excluye la comprobación de ácaros inusuales incluso en el caso de la observación de varroa.

Observación: Tropilaelaps spp también se buscará en las muestras sintomáticas sospechosas de estar parasitadas por Varroa destructor.

Nota importante: Cada EEMM debe implementar exhaustivamente el Reglamento de la Comisión (EU) nº 206/2010 de 12 de marzo de 2010 para evitar la introducción de estos dos parásitos exóticos y asegurar una alerta precoz en caso de introducción. Este Reglamento implica en el caso de España una participación



activa de las CCAA que en último término deben de proceder al envío de abejas acompañantes junto con el material de los envíos de importaciones de abejas reinas al Laboratorio Nacional de Referencia de Algete.

■ Análisis laboratoriales

Se debe de proceder a la identificación morfológica. Los resultados deben de ser confirmados por el Laboratorio Comunitario de Referencia.

Nota importante: En caso de detección, la alarma debe elevarse a escala nacional y europea. Implementación de procedimientos de emergencia adecuados y de restricciones de sanidad animal (La autoridad competente deberá se informada de forma inmediata). Seguir procedimiento establecido en el Manual Práctico de Operaciones de Lucha contra *Aethina tumida* y *Tropilaelaps spp.*

[http://rasve.mapa.es/Recursos/Ficheros/Manuales/MARM/38 Manual Práctico Operaciones de Lucha contra Aethina tumida y Tropilaelaps spp %20abril 2012.pdf](http://rasve.mapa.es/Recursos/Ficheros/Manuales/MARM/38_Manual_Práctico_Operaciones_de_Lucha_contra_Aethina_tumida_y_Tropilaelaps_spp_%20abril_2012.pdf)

■ Desarrollo de datos.

Indicadores epidemiológicos:

Número de brotes sospechosos por año.

Número de brotes confirmados por año.

2.9. Fitosanitarios tóxicos para las abejas

■ Objetivos

- Verificar la exposición real de las abejas a los mismos para dar cumplimiento a la **Directiva 2010/21/UE** de la Comisión de 12 de marzo de 2010 por la que se modifica el anexo I de la Directiva 91/414/CEE por lo que respecta a las disposiciones específicas relativas a la clotianidina, el tiametoxam, el fipronil y el imidacloprid.
- Estimar la prevalencia clínica de intoxicaciones por fitosanitarios.

■ **Definición de caso.** Un apiario se considerará positivo cuando la presencia de uno o más fitosanitarios haya sido diagnosticada en una o más colmenas.

Sospecha de intoxicación por fitosanitarios: cualquier colmenar que presente signos clínicos se considerará sospechoso de padecer una intoxicación:

- Signos clínicos



- disminución significativa de abejas en los panales.
- alta mortalidad de las colonias, en un corto tiempo y de forma masiva.
- presencia de síntomas nerviosos, desorientación, con poco movimiento y nula agresividad.

■ Muestras y observaciones

- Ante un caso sospechoso de intoxicación por fitosanitarios se recogerán además de abejas, un trozo de panal con miel y polen de tamaño 10 x 10 cm².
- Las muestras se enviarán al Laboratorio Central de Veterinaria de Algete.

■ Análisis laboratoriales

- Análisis multiresiduos.



3. MÉTODO PRÁCTICO PARA LA IMPLEMENTACIÓN DEL PROTOCOLO

3.1. Muestreo y control de las colonias

3.1.1. Número de colonias a muestrear

Las colonias seleccionadas por colmenar nos permitirán detectar una prevalencia esperada del 20%. El número de colmenas a muestrear en función del tamaño del colmenar queda reflejado en la tabla siguiente.

Censo colmenas	Muestra 95/20
≤ 8	todas
9-10	8
11-20	10
21-30	11
31-60	12
>61	13

3.1.2. Selección de las colonias

- Número de colmenares visitados por cada CCAA ha quedado como sigue:

	Nº apiarios objeto de vigilancia	Apiarios del programa 2013-2014	Selección de nuevos apiarios
ANDALUCÍA	44	15	29
ARAGÓN	10	3	7
ASTURIAS	2	1	1
ISLAS BALEARES	0	0	0
CANARIAS	2	1	1
CANTABRIA	0	0	0
CLM	14	5	9
CyL	32	10	22
CATALUÑA	8	3	5
EXTREMADURA	36	12	24
GALICIA	8	3	5
MADRID	0	0	0
MURCIA	8	3	5
NAVARRA	2	0	2
PAÍS VASCO	3	0	3
LA RIOJA	2	1	1
VALENCIA	32	11	21
TOTALES	203	68	135



■ Selección al azar de las colonias (ver anexo I)

Durante la primera visita las colonias objeto de estudio se seleccionarán al azar sobre el total de número de colonias del colmenar. Si la colonia está muerta se elige una nueva, pero si está débil se mantienen en el muestreo.

Las colonias seleccionadas serán las que van a ser objeto de estudio durante las tres visitas. La visita de primavera (2ª visita), por razones prácticas, deberá realizarse antes del periodo de trashumancia

■ Detección de colonias con síntomas durante el examen externo.

Esta detección se lleva a cabo sobre la base de signos clínicos/anomalías de vuelo en la piquera o en el frente de la colmena: mortalidad, abejas con anomalías morfológicas (malformaciones, atrofia de las alas, color negro, presencia de abejas con poco pelo...), comportamientos anormales (temblores, abejas arrastrándose, aferradas a la hierba, abejas rechazadas por abejas guardianas), restos de diarrea sobre la colmena, actividad reducida en la entrada de la colmena.

Otras colonias pueden ser objeto de investigación a instancia del apicultor (por ejemplo colmenas que en las visitas anteriores se hayan detectado signos de loque americana, etc). Estas colonias no se considerarán dentro de la investigación sino han sido seleccionadas.

3.2. Calendario de visitas

La primera visita tendrá lugar al final del periodo de actividad apícola, antes del inicio del invierno (otoño de 2014). La segunda visita se realizará al final del periodo invernal / inicio de la primavera (2015). La tercera visita se realizará al final de la primavera/inicio del verano (2015).

Nota importante: El mes de muestreo será elegido por cada CCAA en función de sus características climáticas y eventual calendario de trashumancia. Todas las visitas de cada periodo de muestreo se llevarán a cabo en el **intervalo máximo de un mes**, con el objetivo de obtener resultados comparables.

3.3. Síntomas clínicos, muestras y solicitud de análisis

La siguiente tabla contiene un resumen sobre las muestras, los análisis y la implicación de los laboratorios.

La medida de la tasa de infestación por *Varroa destructor* se llevará a cabo en la primera visita con la recogida de muestras sistemáticas.



Cualquier otra toma de muestras sólo se llevará a cabo en caso de observarse síntomas clínicos. La pericia de los inspectores indicará los análisis solicitados de acuerdo con los síntomas clínicos.

El diagnóstico de varroosis (enfermedad) puede realizarse directamente en el campo por un inspector apícola, sin necesidad de confirmación por un laboratorio, en función de los síntomas clínicos detectados y las tasas de infestación del parásito que deberán de ser anotados en el formulario de inspección.

Nota importante: La toma de muestras clínicas se realizará de cada colmena enferma. No se mezclarán las muestras de varias colmenas enfermas.

Durante la visita, la toma de muestra de panal de cría, en ocasiones, podría comprometer la viabilidad de una colonia. En ese caso podrán tomarse muestras de elementos anormales o enfermos (larvas, pupas, escamas de loque americana...) que se pueden transportar en tubos Eppendorf. Todas las muestras deberán identificarse adecuadamente y relacionarse con el registro de las observaciones clínicas (es muy importante la formación del inspector apícola).

Deberá desinfectarse el material apícola entre inspección de colonias, **evitando el uso de lejía**, que por su capacidad de destrucción vírica podría afectar a las muestras que se recojan para la detección de virus



	MUESTRAS	COLONIAS OBJETO DE MUESTREO	INVESTIGACIONES	LABORATORIO IMPLICADO
Visita 1: antes del periodo invernal	Muestras sistemáticas			
	<ul style="list-style-type: none"> ■ Abejas del interior de la colmena; - Próximas al nido de cría (<i>Varroa destructor</i>) - Periferia (<i>Nosema spp</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Deben muestrearse todas las colonias seleccionadas 	<ul style="list-style-type: none"> ■ tasa infestación <i>Varroa destructor</i> ■ Detección de ácaros <i>Tropilaelaps spp</i>, <i>Aethina tumida</i> ■ <i>Nosema spp</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Laboratorios Oficiales de las CCAA (tasas de infestación de varroa) ■ Laboratorio Central de Veterinaria de Algete (<i>Nosema spp</i>) ■ LCV Algete y EU-RL para confirmación en caso de detección de <i>Tropilaelaps spp</i>, <i>Aethina tumida</i>
	Muestras en colonias con síntomas			
<ul style="list-style-type: none"> ■ Muestras de panal de cría 10 x 10 cm ■ Y/O muestras con elementos con síntomas en tubos eppendorf 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Colonias con signos clínicos en la cría de colmenas seleccionadas al azar 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Varroosis/ <i>Tropilaelaps spp</i> ■ Loque americana ■ Loque europea 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Laboratorio Central de Veterinaria de Algete 	



	<ul style="list-style-type: none"> ■ Muestras de abejas con síntomas (al menos 30) <ul style="list-style-type: none"> - Abejas internas: varroosis/Tropilaelaps spp - Abejas externas: Nosemosis, CBPV 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Colonias con signos clínicos en las abejas adultas de colmenas seleccionadas al azar 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Varroosis/ <u>Tropilaelaps spp</u> ■ Nosemosis ■ CBPV 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Laboratorio Central de Veterinaria de Algete ■ LCV Algete y EU-RL para confirmación en caso de sospecha de <u>Tropilaelaps spp</u>,
	<ul style="list-style-type: none"> ■ Muestras de abejas con síntomas (al menos 60), trozo de panal con miel y polen (10x10 cm) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Colonias con signos de intoxicación por fitosanitarios de las colonias seleccionadas al azar 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Fitosanitarios 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Laboratorio Central de Veterinaria de Algete para el envío de muestras ■ Laboratorio Arbitral Agroalimentario para el análisis posterior
	<ul style="list-style-type: none"> ■ Ácaro sospechoso (similar a <u>Tropilaelaps spp</u>) ■ Escarabajo(s), larva(s) o huevo(s) sospechoso(s) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Toda colonia con elementos sospechosos 	<ul style="list-style-type: none"> ■ <u>Tropilaelaps spp</u>, identificación ■ <u>Aethina tumida</u> identificación 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Laboratorio Central de Veterinaria de Algete ■ EU-RL para confirmación
<ul style="list-style-type: none"> ■ Visita 2 finales del invierno, principio de 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Muestras en colonias con síntomas 			



la primavera				
	<ul style="list-style-type: none"> ■ Muestras de panal de cría 10 x 10 cm ■ Y/O muestras con elementos con síntomas en tubos eppendorf 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Colonias con signos clínicos en la cría de colmenas seleccionadas al azar 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Varroosis/ <u>Tropilaelaps spp</u> ■ Loque americana ■ Loque europea 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Laboratorio Central de Veterinaria de Algete ■ EU-RL para confirmación en caso de detección de <u>Tropilaelaps spp</u>
	<ul style="list-style-type: none"> ■ Muestras de abejas con síntomas (al menos 30). - Abejas internas: varroosis/Tropilaelaps spp - Abejas externas: Nosemosis, CBPV 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Colonias con signos clínicos en las abejas adultas de colmenas seleccionadas al azar 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Varroosis/ <u>Tropilaelaps spp</u> ■ Nosemosis ■ CBPV 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Laboratorio Central de Veterinaria de Algete ■ EU-RL para confirmación en caso de detección de <u>Tropilaelaps spp</u>
	<ul style="list-style-type: none"> ■ Ácaro sospechoso (similar a Tropilaelaps spp) ■ Escarabajo(s), larva(s) o huevo(s) sospechoso(s) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Toda colonia con elementos sospechosos 	<ul style="list-style-type: none"> ■ <u>Tropilaelaps spp</u>, identificación ■ <u>Aethina tumida</u> identificación 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Laboratorio Central de Veterinaria de Algete ■ Confirmación por el EU-RL
	<ul style="list-style-type: none"> ■ Muestras de abejas 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Colonias con signos de 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Fitosanitarios 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Laboratorio Central de Veterinaria de



	con síntomas (al menos 60), trozo de panal con miel y polen (10x10 cm)	intoxicación por fitosanitarios de las colonias seleccionadas al azar		Algete para el envío de muestras <ul style="list-style-type: none"> ■ Laboratorio Arbitral Agroalimentario para el análisis posterior
Visita verano	3: Muestras en colonias con síntomas			
	<ul style="list-style-type: none"> ■ Muestras de panal de cría 10 x 10 cm ■ Y/O muestras con elementos con síntomas en tubos eppendorf 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Colonias con signos clínicos en la cría de colmenas seleccionadas al azar 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Varroosis/ <u>Tropilaelaps spp</u> ■ Loque americana ■ Loque europea 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Laboratorio Central de Veterinaria de Algete ■ EU-RL para confirmación en caso de detección de <u>Tropilaelaps spp</u>
	<ul style="list-style-type: none"> ■ Muestras de abejas con síntomas (al menos 30) -Abejas internas: varroosis/tropilaelaps spp -Abejas externas: Nosemosis, CBPV 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Colonias con signos clínicos en las abejas adultas de colmenas seleccionadas al azar 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Varroosis/ <u>Tropilaelaps spp</u> ■ Nosemosis ■ CBPV 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Laboratorio Central de Veterinaria de Algete ■ EU-RL para confirmación en caso de detección de <u>Tropilaelaps spp</u>
	<ul style="list-style-type: none"> ■ Ácaro sospechoso (similar a <u>Tropilaelaps spp</u>) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Toda colonia con elementos sospechosos 	<ul style="list-style-type: none"> ■ <u>Tropilaelaps spp</u>, identificación ■ <u>Aethina tumida</u> 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Laboratorio Central de Veterinaria de Algete ■ Confirmación por el EU-RL



	<ul style="list-style-type: none"> ■ Escarabajo(s), larva(s) o huevo(s) sospechoso(s) 		identificación	
	<ul style="list-style-type: none"> ■ Muestras de abejas con síntomas (al menos 60), trozo de panal con miel y polen (10x10 cm) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Colonias con signos de intoxicación por fitosanitarios de las colonias seleccionadas al azar 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Fitosanitarios 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Laboratorio Central de Veterinaria de Algete para el envío de muestras ■ Laboratorio Arbitral Agroalimentario para el análisis posterior

* Laboratorio previsto para el envío de estas muestras.



Análisis laboratoriales a llevar cabo durante el programa de vigilancia

Enfermedad diana	Patógeno	Método de laboratorio	MATRIZ
Infestación del colmenar por <u>Varroa destructor</u>	<u>V.destructor</u>	<ul style="list-style-type: none"> ■ Detección de <u>Varroa destructor</u> y recuento por lavado de abejas adultas (método de la OIE) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Abejas vivas del interior de la colmena (> 300) (cercanas a la puesta de cría)
Varroosis	<u>V.destructor</u>	<ul style="list-style-type: none"> ■ Examen de síntomas +/- detección de la presencia del parásito (OIE) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Cría con síntomas + abejas adultas del interior de la colmena (cercanas a la puesta de cría)
Loque americana	<u>P. larvae</u>	<ul style="list-style-type: none"> ■ Diagnóstico bacteriológico (Recomendaciones de la OIE) <u>completado si fuera necesario por identificación molecular por PCR</u> 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Cría con síntomas (panal 10 x 10) o muestras de larvas, escamas enfermas en tubos Eppendorf
Loque europea	<u>M. plutonius</u>	<ul style="list-style-type: none"> ■ Diagnóstico bacteriológico (Recomendaciones de la OIE) <u>completado si fuera necesario por identificación molecular por PCR</u> 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Cría con síntomas (panal 10 x 10) o muestras de larvas, escamas enfermas en tubos Eppendorf
Nosemosis	<u>N.apis</u> <u>N.ceranae</u>	<ul style="list-style-type: none"> ■ Detección y cuantificación de esporos de Nosema spp por microscopía óptica (método establecido por la OIE) ■ Diferenciación de especies de <u>Nosema</u> 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Muestras sistemáticas: al menos 60 abejas adultas recogidas en la zona periférica de interior de la colmena.



		<u>apis/ Nosema ceranae</u> (no será cofinanciado por la Comisión)	<ul style="list-style-type: none"> ■ Al menos 30 abejas externas adultas con síntomas ■ En ausencia de abejas sintomáticas se recogerán 30 abejas muertas (menos de una semana) <p>Observación: No mezclar abejas vivas con síntomas con las abejas</p>
Parálisis Crónica	CBPV	<ul style="list-style-type: none"> ■ Identificación molecular y cuantificación (RT-qPCR siguiendo las recomendaciones del EU-RL) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Al menos 30 abejas externas adultas con síntomas ■ En ausencia de abejas sintomáticas se recogerán 30 abejas muertas (menos de una semana) <p>Observación: No mezclar abejas vivas con síntomas con las abejas</p>
DWV	DWV	<ul style="list-style-type: none"> ■ Diagnóstico molecular: detección y/o cuantificación 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Abejas con síntomas del interior de las colmenas
ABPV	ABPV	<ul style="list-style-type: none"> ■ Diagnóstico molecular: detección y/o cuantificación 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Abejas con síntomas del interior y exterior de las colmenas
Aethinosis/ Pequeño escarabajo de la colmena	<u>A. tumida</u>	<ul style="list-style-type: none"> ■ Detección durante el lavado de las abejas ■ Detección durante el examen de muestras sintomáticas ■ Identificación del escarabajo por examen morfológico (recomendaciones de la OIE) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Abejas adultas recogidas del interior de las colmenas (> 300) ■ Formas adultas del escarabajo, larvas o huevos ■ Panales de cría/miel/polen dañados



		<ul style="list-style-type: none"> ■ Solicitud de validación analítica por el EU-RL 	
Tropilaelapsosis	<u>Tropilaelaps spp</u>	<ul style="list-style-type: none"> ■ Detección durante el lavado de las abejas ■ Detección durante el examen de muestras sintomáticas ■ Identificación por examen morfológico directo de los ácaros (recomendaciones de la OIE) ■ Solicitud de validación analítica por el EU-RL 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Abejas adultas recogidas del interior de las colmenas (> 300) ■ Ácaro sospechoso ■ Cría con síntomas
Residuos de fitosanitarios	<u>Fitosanitarios</u>	<ul style="list-style-type: none"> ■ El que determine el Laboratorio Arbitral Agroalimentario del MAGRAMA 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Ante sospecha de intoxicación: <ul style="list-style-type: none"> - Abejas con síntomas y/o muertas - Trozo de panal con miel y polen (10 x 10cm²)



3.4. Curso práctico de las visitas

3.4.1. Visita 1 antes del periodo invernal

1. Contactar previamente con el apicultor. Solicitar el envío previo de una fotocopia del **Libro de Explotación Apícola** al inspector(es) que vayan a realizar la visita, con el objetivo de agilizar la recogida de datos para rellenar el formulario de inspección
2. Al inicio de la visita hay que explicar al apicultor los objetivos y las formas de vigilancia así como recoger información relativa a las prácticas apícolas que lleva a cabo, localización de las colmenas e información medioambiental (ver formularios de visita).
3. Al llegar al colmenar es conveniente dibujar un croquis con la situación de las colmenas para asignarles un número. A continuación se realiza la selección de las colonias al azar.
 - a. Selección al azar de las colonias que serán seguidamente controladas
 - b. Marcado de las colonias con una referencia individual (uso de crotales). Rellenar el formulario con las referencias individuales.
4. Examen de las colonias elegidas al azar.
 - a. Se realizará un examen a cada colonia/colmena. Primero externo y luego interno.
 - i. Examen externo: se observará cada colonia con el propósito de detectar signos clínicos o alteraciones en la piquera o justo fuera de la colmena.
 - ii. Examen interno

Observación: Si la colonia seleccionada al azar está muerta, se elegirá al azar otra colonia para mantener el número total de colonias seleccionadas. En los demás casos (colonias débiles) se mantendrán para el muestreo.

Nota importante: el examen no debería comprometer la viabilidad de la colmena.

b. Toma de muestras:

i. En todas las colonias seleccionadas al azar:

1. se muestrearán **abejas del interior de la colmena** para estimar la tasa de infestación por *Varroa destructor*
 - a. 300 abejas para el análisis de *Varroa destructor* (preferentemente que ocupen panales con cría no operculada):



- b. 60 abejas para el análisis de *Nosema spp.* (preferentemente recogidas de la periferia)
 - ii. De las colonias seleccionadas al azar con síntomas: muestrear cría de abeja/ abejas/panal con miel y polen en función de los síntomas observados
 - c. Anotar en el formulario de inspección todas las observaciones, las muestras recogidas y las solicitudes de análisis para cada muestra.
5. Embalar y enviar las muestras al laboratorio competente junto con una copia del formulario de inspección (ver Anexo I: Instrucciones para la toma, identificación, embalaje y envío de muestras).
- a. Muestras sistemáticas (*Varroa destructor*):
 - i. Envío a **Laboratorio Oficial de las CCAA** junto con el formulario completo.
 - b. Muestras sistemáticas (*Nosema spp.*) y muestras clínicas:
 - i. Envío de muestras al **Laboratorio Central de Veterinaria de Algete** junto con el formulario completo

3.4.2. Visita 2 después del periodo invernal

1. Explicar algunos elementos en el contexto de la vigilancia y completar la parte simplificada del formulario de inspección sobre información general del apiario.
2. Examen externo del apiario:
 - a. Identificar las colmenas con posibles desórdenes o signos clínicos en la piquera o cerca de la colmena
3. En las colonias seleccionadas durante la primera visita:
 - a. Visitar las colonias y anotar la mortalidad invernal (ver definición de caso de mortalidad)
 - b. Anotar el número de colonias vendidas, dadas, movidas entre las dos visitas y el número de colonias fusionadas (especificando el motivo)
 - c. Tomar muestras de la cría con síntomas/ abejas en función de los signos clínicos detectados.
 - d. Anotar las observaciones en el formulario de inspección, las muestras y las solicitudes de análisis requeridos.
4. Empaquetar las muestras y enviarlas al Laboratorio Central de Veterinaria de Algete con una copia del formulario de inspección (ver Anexo II: Instrucciones para la toma, identificación, embalaje y envío de muestras)



3.4.3. Visita 3 durante la estación de producción de miel (inicio del verano)

1. Explicar algunos elementos en el contexto de la vigilancia y completar la parte simplificada del formulario de inspección sobre información general del apiario.
2. Examen externo del apiario:
 - a. Identificar las colmenas con posibles desórdenes o signos clínicos en la piquera o cerca de la colmena
3. En las colonias seleccionadas durante la primera visita:
 - a. Visitar las colonias y anotar la mortalidad estacional (ver definición de caso de mortalidad)
 - b. Anotar el número de colonias vendidas, dadas, movidas entre las dos visitas y el número de colonias fusionadas (especificando el motivo)
 - c. Tomar muestras de la cría con síntomas/ abejas en función de los signos clínicos detectados.
 - d. Anotar las observaciones en el formulario de inspección, las muestras y las solicitudes de análisis requeridos.
4. Empaquetar las muestras y enviarlas al Laboratorio Central de Veterinaria de Algete con una copia del formulario de inspección (ver Anexo I: Instrucciones para la toma, identificación, embalaje y envío de muestras)



ANEXO I: Selección de las colmenas dentro de un colmenar de forma Simple Aleatoria.

1. En el formulario de inspección se elaborará un croquis con la disposición de las colmenas en el colmenar.
2. Se enumeraran todas las colmenas de manera consecutiva.
 - Del 1 a 'N', siendo "N" el número total de colmenas que constituyen el colmenar.
3. Se calculará el número de muestras necesario 'n' en función de "N", tal y como se muestran en la tabla siguiente (tabla 1).

Censo colmenas	Muestra 95/20
≤ 8	todas
9-10	8
11-20	10
21-30	11
31-60	12
>61	13

(tabla 1).

4. Se seleccionaran las colmenas mediante el uso de la **tabla de números aleatorios** (Tabla 2).
 - Para elegir el número por el que vamos a iniciar a seleccionar la muestra, se deja caer un lápiz sobre la tabla de números aleatorios sin mirar.
 - A partir de ese número, hacia la derecha y en horizontal, se dividen los números de la tabla aleatoria en números de cifras iguales a los dígitos de "N" (número total de colonias del colmenar). Ej. Si N_80, se dividirán los números de la tabla de dos en dos
 - Las colmenas seleccionadas son aquellas cuyos números sean menores que el número total de colmenas 'N' y sin que se repitan los números.



Ejemplo. Seleccionar 10 colmenas de un apiario de 80 colmenas.

- En el croquis enumeramos las colmenas de manera consecutiva del 1 al 100.
- Dejamos caer un lápiz en la tabla y elegimos el número por el que vamos a iniciar la selección. Ej segundo número de segunda fila (7).
- Empezamos a seleccionar los números de dos cifras que forman nuestra muestra: 71, 83, 11, 38, 72, 41, 94, 88, 11, 38, 19, 18, 31, 14,.
- Los números mayores de 80 o aquellos repetidos se eliminarán. En nuestro caso el 11, por ser repetido y los números 83, 94, 88 por ser mayores de 80 serán eliminados.

En este caso las colmenas seleccionadas serán las colmenas numeradas con el 71, 11, 38, 72, 41, 38, 19, 18, 31, 14

Tabla de números aleatorios

0	3	4	2	0	6	9	0	5	4	3	3	3	5	2	9	0	7
8	7	1	8	3	1	1	3	8	7	2	4	1	9	4	8	8	1
1	3	8	1	9	1	8	3	1	1	4	5	9	9	4	8	3	1
1	2	0	2	9	5	9	4	0	1	0	0	4	6	4	8	3	2
3	8	4	0	8	9	9	2	4	4	7	9	5	1	1	5	1	5
6	2	3	5	7	5	4	8	0	7	3	0	0	3	2	8	5	9
7	9	7	2	0	0	4	4	5	9	5	9	1	6	0	8	1	6
6	6	6	6	5	7	2	3	3	9	9	2	9	7	5	2	4	5
9	0	3	8	1	1	8	1	9	7	3	0	8	2	0	7	0	3
6	1	8	0	0	7	2	3	3	2	8	2	5	1	9	0	6	7
8	7	6	5	6	7	5	1	1	2	2	2	1	6	3	5	3	1



ANEXO II: INSTRUCCIONES PARA LA TOMA, IDENTIFICACIÓN, EMBALAJE, CONSERVACIÓN Y ENVÍO DE MUESTRAS

Toma de muestras

■ Abejas

- Recuento de varroa + detección del ácaro *Tropilaelaps spp* + tasas de infestación y caracterización molecular de *Nosema spp*
 - Tomar una muestra de **abejas vivas del interior de la colmena**
 - 300 abejas para el análisis de varroa de uno o varios panales (preferentemente) sobre cría no operculada
 - 60 abejas para el análisis de *Nosema spp de panales de la periferia*
- Si se observan anomalías en las colonias
 - Muestrear prioritariamente abejas vivas con signos clínicos o que presenten comportamientos anormales (al menos 30 abejas)
 - Cuando el número de abejas con síntomas es muy pequeño (menos de 20 abejas) o cuando los signos clínicos no son específicos y/o solo se observa mortalidad, podrán tomarse abejas muertas recientemente (menos de una semana). Estas abejas muertas se analizarán de forma separada de las abejas con síntomas. De otra manera la calidad del resultado disminuiría. Muestrear al menos 30 abejas muertas recientemente, preferiblemente 60.
 - Las abejas muestreadas en el caso de sospecha de Nosemosis o Virus de la Parálisis Crónica (CBPV) serán siempre abejas externas, recogidas de la piquera.

Nota importante:

- Se debe tener cuidado con la conservación de las muestras de abejas muertas: si las abejas están secas o putrefactas, el análisis no debería de llevarse a cabo.
- Si fuera posible, conviene separar abejas con diferentes síntomas clínicos (especificando los signos que se observan en el formulario)

■ Cría

- Cortar un trozo de tamaño 10 x 10 cm de cría que contenga al menos 15 larvas y/o ninfas con un aspecto anormal.
- Muestrear larvas sintomáticas/ninfas u otros elementos sospechosos in tubos Ependorf (incluir una memoria detallada relativa a la muestra)



■ Parásitos sospechosos

- Tomar muestra de cualquier espécimen sospechoso

■ Panal con miel y polen

- Ante la sospecha de una intoxicación por fitosanitarios, además de muestras de abejas, se debe completar la toma de muestras con la recogida de un trozo de panal que contenga miel y polen (10 x 10 cm²)

Identificación de las muestras

Número de explotación apícola/ A13/ (para el otoño de 2014)/Nº de la colonia/ Matriz + número (=1, 2, 3....)

Abreviaturas de las matrices:

HB = Abejas (Honeybee)

BR =Cría (Brood)

PAR = Parásito (Parasite)

POL= Panal polen (muestras con síntomas)

SYS1 = Muestras Sistemáticas para la determinación de la tasa de infestación por varroa

SYS2= Muestras Sistemáticas Nosema spp

Ejemplo: ES28118000015/A13/7/HB1 (para la primera muestra de abejas con síntoma recogida de la colonia número 7 durante la primera visita (otoño de 2014))

Nota importante: si varios colmenares pertenecen al mismo apicultor, cada colmenar será identificado añadiendo un centenar al número de la colonia

Ejemplo:

- ES28118000015/A14/**107**/HB1 para la primera muestra de abejas recogida en el primer colmenar de la colonia número 7 durante la primera visita (otoño de 2014)
- ES28118000015/A14/**207**/HB1 para la primera muestra de abejas recogida en el segundo colmenar de la colonia número 7 durante la primera visita (otoño de 2014)

Embalaje

■ Abejas:



- Abejas con síntomas: las abejas se introducen en un envase de 50 ml con la referencia de la muestra y cerrado.
- Abejas del interior de las colmenas: utilizar envases (cajas de cartón, recipientes de plástico, cristal) Evitando aplastar las abejas

■ **Cría de abejas:**

- Utilizar papel de filtro y sobres, cajas de cartón, evitando aplastar el panal.
- Para pequeños elementos utilizar tubos Eppendorf

Nota importante: recomiendan el uso de envases de cristal o papel más que bolsas de plástico, para evitar que se produzcan maceraciones.

■ **Sospecha de parásitos:**

- Introducir los parásitos sospechosos en alcohol 99% en un frasco perfectamente cerrado.

■ **Panal de miel y polen**

- Utilizar papel de filtro y sobres, cajas de cartón, evitando aplastar el panal.



Envío de muestras

- Para el envío de muestras al Laboratorio Central de Veterinaria de Algete, contactar previamente con el laboratorio para la facilitar la recepción de las muestras en el laboratorio:
 - Contactar con Pilar Fernández Somalo (Jefa de Servicio del Departamento Abejas, Crustáceos y Peces).
 - mfsumalo@magrama.es.
 - Tfno contacto: 913479274
- Una vez tomada la muestra, debe utilizarse para su transporte un refrigerador para el transporte en menos de 48 horas al laboratorio de destino (4° C), así como cajas resistentes para evitar aplastamientos.
- Si no pueden enviarse las muestras refrigeradas en menos de 48 horas al laboratorio pertinente las muestras se almacenarán de forma general:
 - Sistema de frío: Si las muestras se congelan (-20° C, -80°C)
 - Sistema de conservación con etanol (99%): sólo para el caso de las muestras de parásitos
- **Se debe adjuntar todo el formulario de inspección al envío** (sin olvidar especialmente el listado de muestras que se han tomado en el colmenar y el análisis solicitado). La documentación deberá ir fuera del embalaje con el objetivo de evitar riesgos laborales por picaduras de abejas a su llegada al laboratorio.

■ MUESTRAS SISTEMÁTICAS:

- **Abejas para el cálculo de las tasas de infestación de varroosis:**
 - Se enviarán al Laboratorio Oficial de la CCAA refrigeradas a 4°C. Si no se van a procesar en el momento hay que congelarlas a -20°C.
- **Abejas para el cálculo de las tasas de infestación de Nosema spp:**
 - Se enviarán al Laboratorio Central de Veterinaria de Algete refrigeradas a 4°C. Si no se van a procesar en el momento hay que congelarlas a -20°C.

■ MUESTRAS CLÍNICAS.

- **Panales de cría (10x10cm):** se enviarán refrigerados a 4°C en menos de 48 horas al LCV Algete.
- **Abejas:** se enviarán refrigeradas a 4°C en menos de 48 horas al LCV Algete.



- **Abejas y panales de cría:** Si se congelan antes de su envío (a -20 °C, preferiblemente a -80°C), deberán enviarse en hielo seco para evitar su descongelación.
- **Panales con polen (10x10cm2):** Se enviarán refrigeradas a 4° C en menos de 48h al LCV de Algete debidamente protegidos para evitar su aplastamiento. Si se congelan antes de su envío (a -20 °C), deberán enviarse en hielo seco para evitar su descongelación
- **Parásitos:** se recogerán en tubos con etanol 99%.



ANEXO III: LISTADO DE EQUIPO PARA LA VISITA

- GPS
- Equipo de protección adecuado
- Material para el muestreo:
 - Sobres de papel kraft (de envolver), cajas de cartón, botes plástico, cristal, para las muestras de abejas (para todo tipo de análisis)
 - Grapadora para cerrar los sobres.
 - Cuchillo / escalpelo para la toma de muestras de la cría de abejas.
 - Cajas para las muestras de cría.
 - Papel vegetal para envolver las muestras de cría
 - Tubos con alcohol 99% para la recogida de parásitos sospechosos
 - Tubos con alcohol 99% para abejas para los análisis virales y parasitológicos
 - Tubos Eppendorf y palillos de plástico para el muestro de la cría.
 - Rotuladores para el marcaje de las muestras.
 - Marcadores para la identificación de las colmenas y grapas. Pueden utilizarse crotales.
 - Desinfectante para después del uso del material.
 - Pinzas