

CAPÍTULO 3.2.1.

ACARAPISOSIS DE LAS ABEJAS MELÍFERAS (INFESTACIÓN DE LAS ABEJAS MELÍFERAS POR *ACARAPIS WOODI*)

RESUMEN

La acarapisosis es una enfermedad de la abeja adulta de la miel *Apis mellifera* L. y de otras especies de *Apis*. Está causada por el ácaro Tarsonémido *Acarapis woodi*, conocido como ácaro traqueal. La hembra adulta del ácaro tiene un tamaño aproximado de 150 μm y es un parásito interno del sistema respiratorio, que vive y se reproduce sobre todo en las grandes tráqueas protorácicas de la abeja. A veces, se encuentra también en los sacos aéreos de la cabeza y en los torácicos y abdominales y también puede hallarse en la base de las alas de la abeja. Los ácaros se alimentan de la hemolinfa de su hospedador.

Los efectos patológicos en las abejas infestadas dependen del número de ácaros en la tráquea. Los mitos pueden causar daños mecánicos y disfunciones fisiológicas derivadas de la obstrucción de los conductos aéreos, las lesiones en las paredes traqueales y el descenso de la hemolinfa. A medida que aumenta la población de ácaros, las paredes traqueales, que normalmente son blancas y traslúcidas, se vuelven opacas y descoloridas con manchas eruptivas negras, probablemente debidas a incrustaciones de melanina.

Algunas cepas de abejas son más susceptibles a la infestación por *A. woodi*. La mortalidad en las abejas infestadas puede variar de moderada a alta. Las primeras manifestaciones de la infestación suelen pasar desapercibidas y, solo cuando la infestación es masiva, se hace aparente. Suele ocurrir en primavera. El ácaro se extiende por contacto directo. En general, las abejas adultas de menos de 4 días post-eclosión son más susceptibles. La reproducción tiene lugar dentro de la tráquea de las abejas adultas, donde las hembras del ácaro pueden depositar hasta 14 huevos. Normalmente, hay más hembras que machos, aunque el cociente puede variar. El desarrollo dura 11–12 días en los machos y 14–15 días en las hembras.

Detección e identificación del agente: Los ácaros se detectan solo mediante los métodos de laboratorio y la microscopía, o por detección molecular.

En el caso de la microscopía, tienen que observarse ácaros dentro de las tráqueas o extraerlos de ellas para la observación microscópica.

Se diseccionan los tórax de las abejas sospechosas para exponer la tráquea. Se examina cada tráquea con un microscopio de disección ($\times 40$ -60), donde se pueden ver los ácaros a través de la pared transparente como pequeños cuerpos ovales.

Alternativamente, se pueden prensar u homogeneizar en agua muestras mayores de abejas sospechosas y después filtrar la suspensión y centrifugarla. El precipitado se trata con ácido láctico sin diluir durante 10 minutos y, luego se prepara para el examen microscópico.

Los ácaros se pueden teñir mediante técnicas histológicas, de modo que se observen dentro de la tráquea de la abeja. Se separan las tráqueas, se clarifican con 8% de hidróxido potásico, y se tiñen con 1% de azul de metileno. Este es el mejor método (método del disco torácico) cuando hay que analizar un gran número de muestras.

Para la detección molecular, pueden utilizarse métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tanto convencionales como en tiempo real, que detectan el gen de la citocromo I oxidasa de *Acarapis woodi*. Los amplicones obtenidos con la PCR convencional deben ser secuenciados para poder confiar en la detección de *A. woodi*, a diferencia de los ácaros relacionados *A. dorsalis* y

A. externus. Se obtiene una muestra de 105 abejas de una colonia y se les quita el abdomen y se desecha. Se realizan siete extracciones de ADN por separado, con 15 abejas cada una, en las que las abejas se homogeneizan en tampón de lisis y el ADN extraído se somete a la PCR. La PCR en tiempo real es útil cuando se procesa un gran número de muestras. Es posible que se produzcan falsos positivos en la detección de *A. externus* y *A. dorsalis*, por lo que es necesario realizar pruebas de confirmación por microscopía.

Pruebas serológicas: No se dispone de pruebas serológicas.

Requisitos para las vacunas: No se dispone de vacunas.

A. INTRODUCCIÓN

La acaraposis (o acarosis o enfermedad acarina) es una enfermedad de la abeja adulta de la miel *Apis mellifera* L. y de otras especies de *Apis*, causada por el ácaro Tarsonémido *Acarapis woodi* (Rennie). La hembra adulta del ácaro tiene un tamaño aproximado de 150 μm (Figura 1) y es un parásito interno del sistema respiratorio. Estos ácaros traqueales entran, viven y se reproducen principalmente en la gran tráquea protorácica de todas las abejas, alimentándose de la hemolinfa de su hospedador. A veces se encuentran también en los sacos aéreos de la cabeza, tórax y abdomen (Giordani, 1965; Wilson et al., 1997).

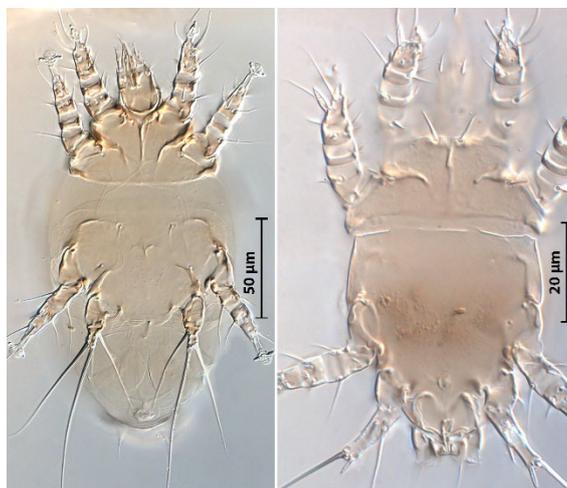


Fig. 1. *Acarapis woodi* (Rennie). Vistas ventrales de la hembra (izquierda) y el macho adultos.

Las alteraciones patógenas en las abejas individuales dependen del número de ácaros que haya en la tráquea y se deben tanto a los daños mecánicos como a las disfunciones fisiológicas derivadas de la obstrucción de los conductos aéreos, las lesiones en las paredes traqueales y el descenso de la hemolinfa. A medida que aumenta la población de parásitos, las paredes traqueales, que normalmente son blancas y translúcidas, se vuelven opacas y descoloridas con manchas eruptivas negras, probablemente debidas a incrustaciones de melanina (Giordani, 1964).

Las tasas de pérdida de colonias pueden variar, pero estas pérdidas pueden llegar a ser muy altas cuando el ácaro se establece por primera vez en poblaciones de abejas nunca antes expuestas. Los primeros signos de la infestación pueden pasar desapercibidos, excepto en lo que se refiere a una pequeña disminución en el tamaño de la colonia. La infestación solo se manifiesta cuando es masiva. Esto suele ocurrir en primavera, después del período invernal de agrupamiento, cuando los ácaros se reproducen y se multiplican sin problemas en las abejas que sobreviven al invierno. Algunas especies de abejas, como las abejas Buckfast (Brother Adam, 1968) y algunas cepas higiénicas son menos susceptibles a la infestación por *A. woodi*. Los ácaros se transmiten entre Abejas por contacto directo. En general, solo las Abejas adultas jóvenes (de menos de 4 días tras la eclosión) son susceptibles. Los intentos de cultivar artificialmente *A. woodi* han tenido poco éxito (Bruce et al., 1991). Puede lograrse una infestación controlada de Abejas inmaduras (Giordani, 1970) y ha permitido la determinación del ciclo de vida del ácaro, así como sus hospedadores preferidos y la resistencia a los mismos, y el efecto de los ácaros en las abejas adultas. La reproducción de los ácaros se lleva a cabo dentro de las tráqueas de las abejas adultas, donde las hembras pueden depositar de 8 a 20 huevos. Se producen de 2 a 4 veces más hembras que machos; el desarrollo dura 11–12 días para los machos y 14–15 días para las hembras.

No hay síntomas clínicos fiables para el diagnóstico de la acarapisosis debido a que los signos de la infestación no son específicos y la abeja se comporta de modo muy semejante a como lo hacen las abejas afectadas por otras enfermedades o trastornos. Giran sobre sí mismas cerca del enjambre y se suben a las briznas de hierba, incapaces de volar. Se puede presentar disentería. Las infestaciones fuertes por ácaros en los meses de invierno afectan a la capacidad de las colonias de regular su temperatura de grupo, lo cual conduce a enfriamiento, algo que, a su vez, puede constituir una causa importante de muerte (Otis y Scot-Dupree,1992)

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos de análisis disponibles y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infestación en la población	Demostrar ausencia de infestación en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infestación – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección e identificación del agente						
Microscopía – disección de abejas	+++	-	+++	+++	++	-
Microscopía – muestra a granel	+	-	+	++	+	-
PCR convencional	+	-	+	++	+	-
PCR en tiempo real	++	-	++	++	++	-

Clave: +++ = recomendada para este propósito; ++ = recomendada pero con limitaciones; + = adecuada en muy pocas circunstancias; - = no adecuada para este propósito.
PCR = reacción en cadena de la polimerasa.

1. Detección e identificación del agente

La acarapisosis solo se puede detectar en el laboratorio mediante el examen microscópico o por métodos moleculares. El número de abejas en la muestra determina el umbral de detección del método. Se ha comprobado que se puede detectar una tasa de infestación del 1 al 2% utilizando 50 abejas. Hay datos disponibles sobre muestreo secuencial (Frazier *et al.*, 2000; Tomasko *et al.*, 1993). El mejor tiempo para coger abejas de muestra es a principios de primavera o en la última fase del otoño, cuando las poblaciones de *Acarapis* son elevadas. La observación de los ácaros es más fácil en las abejas viejas, que tienen una mayor cantidad.

Aunque los zánganos tienen una mayor abundancia de ácaros por abeja (Dawicke *et al.*, 1992), la casta más importante afectada por *A. woodi* es la población de abejas obreras, que superan con creces a los zánganos y están presentes en la colonia durante todo el año, incluidas las estaciones en las que la colonia es más vulnerable, es decir, el invierno y el principio de la primavera.

1.1. Microscopía – disección de abejas aisladas

La microscopía es la técnica más sencilla y fiable para el diagnóstico de laboratorio de la acarapisosis, ya que permite detectar las infestaciones tempranas y establecer la tasa de infestación. Incluso las infestaciones leves pueden detectarse con un microscopio de disección (40-60×). Sólo en casos muy excepcionales será necesario emplear aumentos mayores para hacer un diagnóstico. Sin embargo, los

métodos de detección mediante microscopía son técnicas exigentes y requieren mucho tiempo, especialmente cuando hay que procesar un gran número de muestras.

Debe tomarse al azar una muestra de 50 abejas (véase más arriba) de la colonia, 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 o en un congelador (-20°C) durante un máximo de 48 horas; las abejas muertas muestreadas no deben llevar muertas más de 2–3 días, a menos que se hayan mantenido a 4°C hasta 4 semanas o a -20°C varios meses. Pueden conservarse de modo indefinido en una solución de conservante tal como la de Oudemann: ácido acético glacial (80 ml); glicerol (50 ml); etanol al 70% (870 ml).

1.1.1. Procedimiento analítico: preparación directa (Milne, 1948; Lorenzen y Gary, 1986)

- i) Se ponen las abejas bajo el microscopio de disección sobre el dorso y se sujetan con pinzas o alfileres de entomología, luego se retira la cabeza y el primer par de patas del tórax con una hoja de bisturí.
- ii) Se retira el esclerito protorácico (cuello) con unas pinzas.
- iii) Se exponen los dos troncos traqueales torácicos del mesotórax (Figura 2). El diagnóstico positivo consiste en la presencia de melanización de una o ambas tráqueas o, en caso de infestación leve, en la presencia de cuerpos ovalados translúcidos (huevos, etc.) fácilmente visibles dentro de las tráqueas.
- iv) Para el examen microscópico posterior, especialmente para confirmar la infestación leve, se retiran las tráqueas y se colocan en un portaobjetos, con una gota de agua. Medio de Hoyer: agua destilada (50 mm), hidrato de cloral (200 g), glicerina (20 ml) y goma arábiga cristalina (30 g). Al microscopio, con un aumento de $100\times$, pueden reconocerse los ácaros adultos, así como sus distintas fases de desarrollo.



Trachea = tráquea; Thoracic spiracle = espiráculo torácico; Muscles = músculos

Fig. 2. Primer par torácico de tráqueas expuesto en el mesotórax de una abeja (en esta muestra no hay *Acarapis woodi*)

1.1.2. Procedimiento analítico: método del disco torácico (Peng y Nasr, 1985; Sammataro *et al.*, 2013)

- i) Se depositan las abejas sobre el dorso y se sujetan con pinzas.
- ii) Se quita la cabeza y las patas delanteras con otras pinzas. Así quedan expuestas las tráqueas en el mesotórax.
- iii) Con una hoja de bisturí afilada u hoja de afeitar, se corta el tórax por delante del par central de patas para crear un corte torácico fino de 1–1,5 mm (disco). De esta forma se pueden

preparar muchos discos torácicos y refrigerarse a 4°C, o congelarse, antes de seguir con la preparación.

- iv) El músculo se elimina del disco torácico calentándolo a 60°C en una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 5–10% durante 2 horas.
- v) Se eliminan los restos enjuagando los cortes bajo agua corriente en un tamiz fino.
- vi) Los cortes se vuelven a colocar en una solución de hidróxido de potasio al 5–10% y se calientan a 60 °C durante 1 hora. Los cortes se volverán transparentes en el centro, dejando sólo los tergitos esclerotizados y los troncos traqueales principales.
- vii) Los cortes se lavan suavemente bajo el agua corriente en un tamiz fino para eliminar cualquier residuo.
- viii) Los cortes se transfieren a una placa de Petri que contiene agua destilada y unas gotas de azul de metileno acuoso al 1%; se tiñen durante 5 minutos.
- ix) Una vez finalizada la tinción, se sacan los cortes de la solución de tinción y se transfieren a un microscopio de disección para su evaluación visual. Examinar con un aumento de 20–40×, con iluminación desde abajo. Los ácaros se ven fácilmente a través de la pared transparente como cuerpos pequeños y ovalados (Figura 3).
- x) Los tergitos esclerotizados pueden arrancarse con unas pinzas para hacer más visible la tráquea. A continuación, las tráqueas pueden montarse en un portaobjetos de vidrio y transferirse a un microscopio compuesto para una visualización más detallada de los ácaros (con un aumento de aproximadamente 100×; Figura 3C).

1.2. Microscopía – preparación de muestra a granel y cribado basado en la morfología del ácaro (Colin *et al.*, 1979)

Se toma al azar una muestra de 200 abejas de la colonia sospechosa. Se quitan del tórax de cada abeja las patas y las alas, y se juntan los cuerpos en un recipiente de 100 ml lleno de agua hasta la cuarta parte. Esta suspensión se homogeneiza tres veces, varios segundos cada vez, en un homogeneizador a 10.000 rpm añadiendo más agua. La solución resultante se pasa a través de un filtro (malla de 0,8 mm) y el filtro se lava con agua hasta un volumen final de unos 50 ml. El filtrado se centrifuga a 1.500 *g* durante 5 minutos y se elimina el sobrenadante. Se añaden unas cuantas gotas de ácido láctico sin diluir el precipitado, que contiene los ácaros. Se deja reposar durante 10 minutos para que se disuelvan las fibras musculares, y luego se hace un montaje bajo un cubre para su examen microscópico. Esta técnica es más rápida que la disección, pero menos exacta. A menudo en el cuello y el tórax de las abejas sanas se encuentran ácaros externos como *A. externus* y *A. dorsalis*, que son morfológicamente semejantes a *A. woodi* y que pueden confundirse fácilmente con él (Delfinado-Baker *et al.*, 1982). Sin embargo, no parecen ocasionar ningún daño serio a las abejas o a sus cuidadores. Por tanto, este método debería elegirse solo cuando lo que se necesita es una estimación aproximada del grado de infestación en una región. No resulta apropiado para detectar una incursión en una región.

1.3. Detección molecular de infestación por *Acarapis woodi* en *Apis mellifera*

La detección de la infestación por *Acarapis woodi* en las colonias de abejas mediante métodos de PCR es más rápida y eficaz que la microscopía, y puede ser más sensible. Sin embargo, hay que tener cuidado al interpretar los resultados de las pruebas de PCR debido a las similitudes genómicas entre *A. woodi* y sus parientes cercanos *A. dorsalis* y *A. externus*, que en el caso de ciertos genotipos raros pueden conducir a detecciones falsas de *A. woodi*. Las detecciones positivas requieren la confirmación por microscopía

1.3.1. Extracción de ácido nucleico de *Apis mellifera* para la detección de *Acarapis woodi* (Delmiglio *et al.*, 2016)

Debe utilizarse un tamaño de muestra conservador de 105 abejas por colonia, aunque pueden utilizarse tamaños de muestra más pequeños si se prevé que hay una infestación elevada de ácaros. Se puede utilizar un número máximo de 15 abejas en una sola extracción de ADN, lo que garantiza que se pueda detectar una sola abeja con un nivel bajo de infestación (<10 ácaros). Se requiere un mínimo de siete extracciones de ADN para analizar una muestra de colonia de 105 abejas.

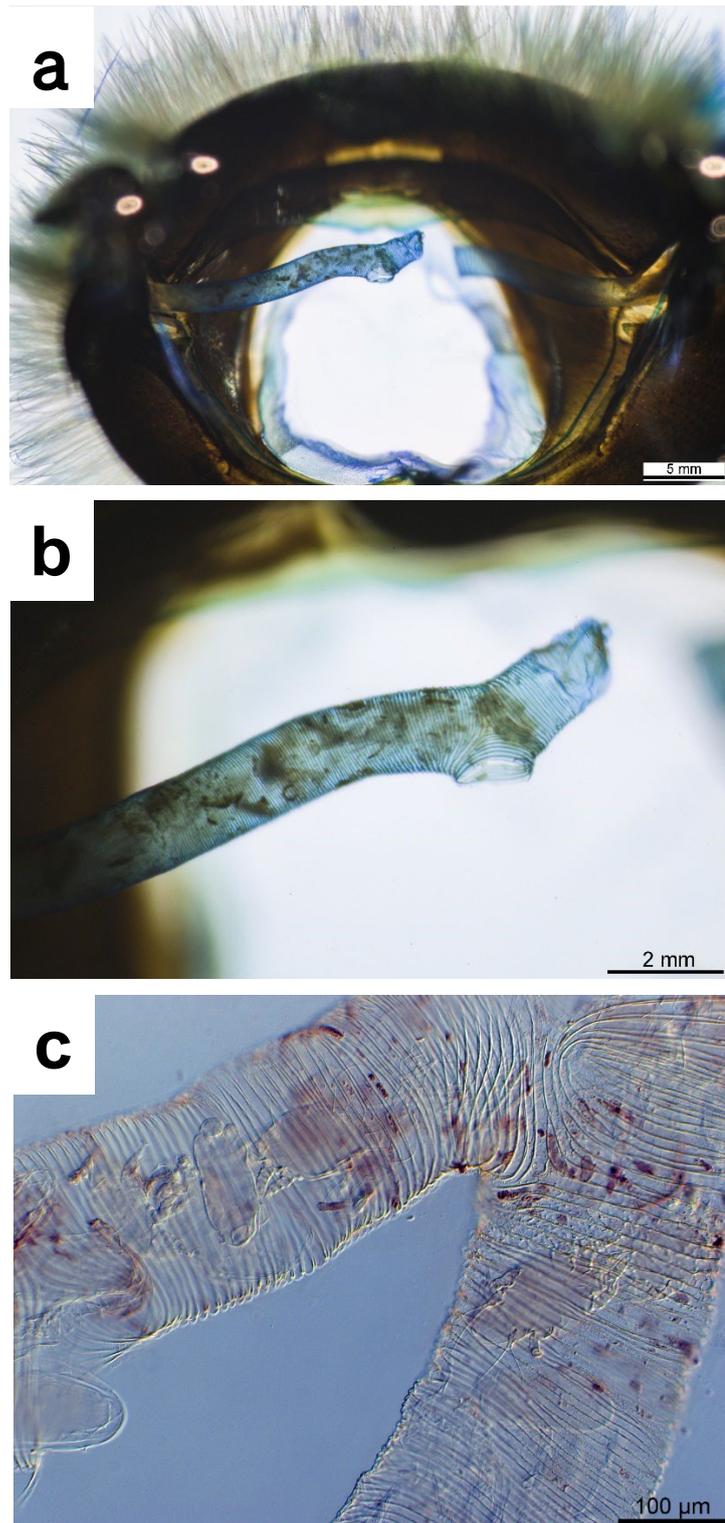


Fig. 3. (a) Presencia de *Acarapis woodi* en tráqueas de abejas melíferas, reveladas con el método del disco torácico y un microscopio de disección; (b) a mayores aumentos; (c) presencia de *Acarapis woodi* en tráqueas observadas con un microscopio compuesto.

- i) Se agitan 105 abejas en agua caliente en una batidora orbital durante 20 minutos para desprender los ácaros externos.
- ii) Se retira el abdomen de cada abeja con un bisturí limpio y se colocan las cabezas y los tórax en bolsas de malla filtrante para separar los fragmentos de exoesqueleto tras la maceración.

Se añaden 0,5 ml de un tampón de lisis de ácidos nucleicos por abeja; para la extracción de ADN, existen tampones comerciales de extracción de ácidos nucleicos que contienen sales caotrópicas, como, por ejemplo, tiocianato de guanidina.

- iii) Las abejas se maceran en el tampón de lisis utilizando una trituradora o una batidora de paletas, y se colocan 600 µl de lisado en un tubo de reacción limpio con 30 µl de proteinasa K (concentración) y se incuban a 65°C durante 30 minutos con mezclado.
- iv) El lisado se somete después a una centrifugación a 8000 *g* durante 1 minuto.
- v) El sobrenadante resultante se aspira y se somete a la extracción de ADN; existen kits comerciales de extracción de ADN y los kits seleccionados deben ser validados para fines de diagnóstico antes de su uso, como, por ejemplo, métodos de separación de partículas con perlas magnéticas, o separación basada en columnas de afinidad.

1.3.2. PCR convencional (Evans *et al.*, 2007; Kojima *et al.*, 2011; Navajas *et al.* 1996)

Existen enfoques convencionales de PCR para la detección de *Acarapis woodi*, pero requieren una secuenciación confirmatoria de los amplicones para poder confiar en la detección. La extracción de ácido nucleico puede realizarse mediante el método descrito en la Sección B.1.3.1, pero se han utilizado técnicas alternativas de extracción de ADN para los métodos convencionales de PCR, como la extracción de ADN de ácaros individuales de especies de *Acarapis sp.*

Evans *et al.* (2007) utilizan la amplificación del gen mitocondrial de la citocromo oxidasa I (Navajas *et al.*, 1996) para detectar *Acarapis sp.*, con secuenciación del amplicón para proporcionar la determinación a nivel de especie de *A. woodi*, *A. externus* y *A. dorsalis*. También se dispone de cebadores de PCR anidada que pueden aumentar la sensibilidad de la detección.

Tabla 2. Secuencias de los cebadores de la PCR

Cebador/Sonda	Secuencia (5'-3')	Longitud del amplicón*	Región
MitCOI.F	AGT-TTT-AGC-AGG-AGC-AAT-TAC-TAT	559 pb*	Citocromo oxidasa I
MitCOI.R	TAC-AGC-TCC-TAT-AGA-TAA-AA		
AcwdCOI.F	TCA-ATT-TCA-GCC-TTT-TAT-TCA-AGA	377 pb*	Citocromo oxidasa I
AcwdCOI.R	AAA-ACA-TAA-TGA-AAA-TGA-GCT-ACA-ACA		

*Inferido a partir de la alineación del cebador con los accesos a GenBank KX790788 y LC512730.

Si se utiliza un kit de PCR comercial, es posible que los reactivos necesarios ya estén incluidos. Compruebe y siga las instrucciones del fabricante.

Las reacciones de PCR con cebadores MitCOI (Evans *et al.*, 2007; Navajas *et al.*, 1996) se preparan en un volumen total de 25 µl, como sigue:

- i) 1-5 µl de ADN molde (véase la sección B.1.3.1);
- ii) cebador directo (MitCOI.F) y cebador inverso (MitCOI.R), ambos a 0,2 µM;
- iii) cada una de las dNTP a 1 mM;
- iv) MgCl₂ 2 mM;
- v) 1 U de Taq polimerasa en el tampón de PCR adecuado.

Utilizando las siguientes condiciones de termociclado: 30 ciclos de 94°C (1 minuto), 52°C (1 minuto) y 72°C (1 minuto); y un ciclo final de 72°C (5 minutos).

Una PCR anidada posterior en el amplicón utilizando las mismas condiciones de reacción pero con cebadores internos directos (AcwdCOI.F) e inversos (AcwdCOI.R) puede proporcionar una mayor sensibilidad para la detección, y Evans *et al.* (2007) describen que este método de PCR anidada puede utilizarse para determinar la especie de *Acarapis* de un solo ácaro aislado. Los pesos moleculares de los amplicones pueden determinarse mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% y tinción con un colorante intercalante de ADN. El tamaño del amplicón no es suficiente para la asignación a nivel de especie de *Acarapis*, y se requiere la secuenciación del amplicón con la comparación con las secuencias de referencia en las bases de datos genéticas para tener confianza al asignar una detección a una de las tres especies de *Acarapis*.

Los amplicones pueden purificarse utilizando un método comercial, como la ligadura con resina o la digestión enzimática de fragmentos de <100 pb, y luego los amplicones se secuencian utilizando el método Sanger, o uno de secuenciación alternativo. La secuencia de los amplicones debe alinearse con las secuencias de *Acarapis* sp. de las bases de datos genéticas y construirse un árbol filogenético para determinar el pariente más cercano.

Existe una serie alternativa de cebadores para la detección de *Acarapis* sp. (Kojima *et al.*, 2011), pero no se han probado contra *A. dorsalis* y, por lo tanto, se desconoce su utilidad para distinguir *A. dorsalis* de *A. woodi*.

1.3.3. PCR en tiempo real (Delmiglio *et al.*, 2016)

La detección específica de *A. woodi* mediante PCR en tiempo real puede lograrse mediante la amplificación de una región variable única de 113 nt dentro del gen mitocondrial de la citocromo oxidasa I (COI) (Delmiglio *et al.*, 2016). Se ha observado que una pequeña proporción de *A. externus* genéticamente diferentes presenta reacciones cruzadas con este ensayo. Por lo tanto, si se registra un resultado positivo de la PCR en tiempo real en una población de abejas en la que no se haya notificado antes la presencia de *A. woodi*, debería realizarse una prueba de confirmación mediante microscopía.

Tabla 3. Secuencias de cebadores para la PCR en tiempo real

Cebador/Sonda	Secuencia (5'-3')	Longitud del amplicón	Región
aw_F1-flap	AAT-AAA-TCA-TAA-TGA-TAT-CCC-AAT-TAT-CTG-AGT-AAT-G	113 bp	Citocromo oxidasa I
aw_R3	AAT-ATC-TGT-CAT-GAA-GAA-TAA-TGT-C		
aw_LNAprobe	6-FAM-ACC[+T]GT[+C]AA[+T]CC[+A]CCTAC-BHQ1		

*[+] bases de ácidos nucleicos bloqueadas

Si se utiliza un kit de PCR comercial, es posible que los reactivos necesarios ya estén incluidos. Compruebe y siga las instrucciones del fabricante.

Las reacciones de PCR (modificadas a partir de Delmiglio *et al.*, 2016) se preparan en un volumen total de 10 µl, como sigue:

- i) 1 µl de ADN molde (véase la sección B.1.3.1);
- ii) cebador directo (aw_F1-flap) y cebador inverso (aw_R3), ambos a 0,3 µM;
- iii) sonda a 0,1 µM (aw_LNAprobe);
- iv) cada dNTP a 1 mM;
- v) MgCl₂ a 3,5 mM;

- vi) 0,3 µg de albúmina de suero bovino
- vii) 1 U de Taq polimerasa en el tampón de PCR apropiado

Utilizando las siguientes condiciones de termociclado: 95°C (2 minutos), 35 ciclos de 95°C (10 segundos), 59°C (45 segundos).

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

No existen vacunas.

AGRADECIMIENTOS

Las fotografías, cortesía de Qing Hai Fan, se han reproducido con su permiso.

REFERENCIAS

- BROTHER ADAM (1968). 'Isle of Wight' or acarine disease: its historical and practical aspects. *Bee World*, **49**, 6–18.
- BRUCE W.A., HENEGAR R.B. & HACKETT K.J. (1991). An artificial membrane for *in vitro* feeding of *Varroa jacobsoni* and *Acarapis woodi*, mite parasites of honey bees. *Apidologie*, **22**, 503–507.
- COLIN M.A., FAUCON J.P., GIANFERT A. & SARRAZIN C. (1979). A new technique for the diagnosis of Acarine infestation in honey bees. *J. Apic. Res.*, **18**, 222–224.
- DAWICKE B.L., OTIS G.W., SCOTT-DUPREE C. & M. NASR (1992). Host preference of the honey bee tracheal mite (*Acarapis woodi* [Rennie]). *Exp. App. Acarol.*, **15**, 83–98.
- DELFINADO-BAKER M. & BAKER E.W. (1982). Notes on honey bee mites of the genus *Acarapis* Hirst (Acari: Tarsonemidae). *Int. J. Acarol.*, **8**, 211–226.
- DELMIGLIO C., FAN Q-H., GEORGE S., WARD L., BUDGE G., FLYNN A. & KUMARASINGHE L. (2016). Development and evaluation of a real-time PCR assay for the detection of *Acarapis woodi* (tracheal mites) in *Apis mellifera*. *Apidologie*, **47**, 691–702.
- SCOTT-DUPREE C.D. & OTIS G.W. (1992). The efficacy of four miticides for the control of *Acarapis woodi* (Rennie) in a fall treatment program. *Apidologie, J. Apic. Res.* **23**, 97–106.
- EISCHEN F.A., PETTIS J.S. & DIETZ A. (1986). Prevention of *Acarapis woodi* infestation in queen honey bees with amitraz. *Am Bee J.*, **126**, 498–500.
- EVANS J.D., PETTIS J.S. & SMITH I.B. (2007). A diagnostic genetic test for the honey bee tracheal mite, *Acarapis woodi*. *J. Apic. Res.*, **46**, 195–197.
- FRAZIER M.T., FINLEY J., HARKNESS W. & RAJOTTE E.G. (2000). A sequential sampling scheme for detecting infestation levels of tracheal mites (Heterostigmata: Tarsonemidae) in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *J. Econ. Entomol.*, **93**, 551.
- GIORDANI G. (1964). Recherches au laboratoire sur *Acarapis woodi* (Rennie), agent de l'acariose des abeilles (*Apis mellifera* L.). Note 3. *Bull. Apic.*, **7**, 43–60.
- GIORDANI G. (1965). Recherches au laboratoire sur *Acarapis woodi* (Rennie), agent de l'acariose des abeilles (*Apis mellifera* L.). Note 4. *Bull. Apic.*, **8**, 159–176.
- GIORDANI G. (1970). Ricerche di laboratorio su *Acarapis woodi* (Rennie), agente dell'acarosi delle api mellifiche (*Apis mellifera* L.) Nota 6. *Ann. Acc. Naz. Agric.*, **90**, 69–76.

HOOD W.M. & MCCREADIE J.W. (2001). Field tests of the Varroa Treatment Device using formic acid to control *Varroa destructor* and *Acarapis woodi*. *J. Agric. Urban Entomol.*, **18**, 87.

KOJIMA Y., YOSHIYAMA M., KIMURA K. & KADOWAKI T. (2011). PCR-based detection of a tracheal mite of the honey bee *Acarapis woodi*. *J. Invertebr. Pathol.*, **108**, 135–137.

LORENZEN K. & GARY N.E. (1986). Modified dissection technique for diagnosis of tracheal mites (Acari: Tarsonemidae) in honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.*, **79**, 1401–1403.

MILNE P.S. (1948). Acarine disease of bees. *J. UK Ministry Agriculture Fisheries*, **54**, 473–477.

NAVAJAS M., FOURNIER D. LAGNEL J. GUTIERREZ J. & BOURSO P. (1996). Mitochondrial COI sequences in mites: Evidence for variations in base composition. *Insect Mol. Biol.*, **5**, 281–285.

OTIS G.W. & SCOTT-DUPREE C.D. (1992). Effects of *Acarapis woodi* on Overwintered Colonies of Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) in New York. *J. Econ. Entomol.*, **85**, 40–46.

PENG Y. & NASR M.E. (1985). Detection of honey bee tracheal mites (*Acarapis woodi*) by simple staining techniques. *J. Invertebr. Pathol.*, **46**, 325–331.

PETTIS J.S., COX R.L. & WILSON W.T. (1988). Efficacy of fluvalinate against the honey bee tracheal mite, *Acarapis woodi*, under laboratory conditions. *Am. Bee J.*, **128**, 806.

SAMMATARO D. & NEEDHAM G.R. (1996). Host-seeking behaviour of tracheal mites (Acari: Tarsonemidae) on honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Exp. Appl. Acarol.*, **20**, 121–136.

SAMMATARO D., DE GUZMAN L., GEORGE S., OCHOA R. & OTIS G. (2013). Standard methods for tracheal mite research. *J. Apic. Res.*, **52**, 1–20.

TOMASKO M., FINLEY J., HARKNESS W. & RAJOTTE E. (1993). A sequential sampling scheme for detecting the presence of tracheal mite (*Acarapis woodi*) infestations in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Penn. State Agric. Exp. Stn Bull.*, **871**.

WILSON W.T., PETTIS J.S, HENDERSON C.E. & MORSE R.A. (1997). Tracheal mites. *In: Honey Bee Pests, Predators and Diseases*, Third Edition. AI Root publishing, Medina, Ohio, USA, pp 255–277.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la infestación de las abejas melíferas por *Acarapis woodi* (puede consultarse la página web de la OIE:

<https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)

Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE si desea más información sobre las pruebas de diagnóstico y los reactivos para la acaraposis de las abejas melíferas.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989 COMO ACARIASIS DE LAS ABEJAS MELÍFERAS.
ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2022.