

NOSEMOSIS DE LAS ABEJAS MELÍFERAS

RESUMEN

Hasta este momento se han descrito dos parásitos microsporidianos de las abejas: *Nosema apis* (Zander) y *Nosema ceranae* (Fries). *Nosema apis* es un parásito de la abeja europea (*Apis mellifera*) y *Nosema ceranae* lo es de la abeja asiática (*Apis cerana*) y de la abeja europea. Ambos parásitos causan infección cruzada entre las especies hospedadoras. *Nosema ceranae* se ha detectado recientemente en varias poblaciones de abejas europeas geográficamente separadas en Europa, Sudamérica, Norteamérica y Asia. No se conocen bien las consecuencias patológicas de *N. ceranae* en *Apis mellifera*. Ambos tipos son presumiblemente muy similares, pero *N. ceranae* parece ser más sensible a las bajas temperaturas y capaz de reproducirse incluso a altas temperaturas. *Nosema apis* y *N. ceranae* invaden las células epiteliales del ventrículo de las abejas adultas. Las infecciones se contraen por la entrada de las esporas durante la alimentación o la limpieza. La enfermedad se presenta en todo el mundo, pero el tratamiento de las abejas puede ayudar a prevenir la propagación de la infección a las colonias de abejas no infectadas.

Los niveles de *Nosema* en general aumentan cuando las abejas están confinadas, como sucede en otoño y en invierno en los climas más fríos. La enfermedad se transmite entre las abejas mediante la ingestión de agua y del material contaminado de los panales y por la trofalaxis; los depósitos de miel y las abejas infectadas que queden aplastadas pueden jugar así mismo un papel importante en la transmisión de la enfermedad. Las esporas se expulsan con las heces. La importancia relativa de las heces, la miel y los cadáveres como reservorios de las esporas infectivas no se conoce del todo. Las esporas de *N. apis* se inactivan con ácido acético o a 60°C durante 15 minutos. Para que estos tratamientos sean eficaces, pueden combinarse con el aporte de alimento a las colonias medicado con fumagilina, con el fin de eliminar las infecciones en las abejas vivas. Muchos países prohíben el uso de tratamientos antibióticos en abejas melíferas.

Identificación del agente etiológico: En algunos casos agudos se observan marcas fecales marrones en el panal y en el frontal de la colmena, con abejas enfermas o muertas en sus proximidades. Sin embargo, la mayoría de las colonias no muestran signos claros de infección, ni siquiera cuando la enfermedad es suficiente para causar pérdidas significativas en la producción de miel y en la eficiencia de la polinización. Durante el invierno, puede haber un incremento de la mortalidad de las abejas. En las abejas afectadas, el ventrículo, que es normalmente marrón, puede ser blanco y muy frágil. Los exámenes microscópicos (a 400 aumentos) de los homogenados de los contenidos abdominales de las abejas afectadas revelarán la presencia de las esporas ovales de *Nosema* spp., que miden aproximadamente 5–7 × 3–4 µm, con un contorno oscuro (*Nosema ceranae* es ligeramente más pequeña, pero es difícil distinguir entre especies empelando la microscopía óptica, sobre todo porque tienen lugar infecciones mixtas). Sus contenidos internos se pueden diferenciar después de teñir con la tinción de Giemsa. Las esporas de *Nosema* spp. tienen un aspecto característico, con una pared gruesa no teñida y el interior azul sin rasgos distintivos. Los núcleos del interior de las esporas no son visibles. Este método puede ayudar a diferenciar *Nosema* spp. de otros microorganismos encontrados en las abejas.

El aspecto de las esporas de *Nosema* spp. puede confundirse con el de levaduras, esporas fúngicas, cuerpos grasos y calcíferos o quistes de *Malpighamoeba mellificae*. Estos últimos son similares en tamaño a las esporas de *Nosema* spp., de 6–7 µm de diámetro, pero son totalmente esféricos en vez de ovales.

Únicamente se pueden realizar identificaciones positivas observando las esporas típicas en el ventrículo o en las heces. Es posible que no se puedan demostrar las infecciones muy leves. La extensión de la infección se puede determinar mediante el recuento de las esporas en una rejilla

cuadrículada de microscopio y calculando el número medio de esporas por área, y a partir de esto se puede estimar el número de esporas por abeja. La identificación hasta el nivel de especie es difícil mediante microscopía óptica; para este fin son preferibles las reacciones en cadena de la polimerasa.

Pruebas serológicas: No existen pruebas serológicas que puedan aplicarse.

Requisitos para las vacunas: No se dispone de vacunas.

A. INTRODUCCIÓN

Los microsporidios *Nosema apis* (Zander, 1909) y *N. ceranae* (Fries *et al.*, 1996) son parásitos exclusivos de las células epiteliales del ventrículo de las abejas adultas, y ambos tienen lugar en todo el mundo (Klee *et al.*, 2007). Gracias a las pruebas moleculares, se ha podido incluir a los microsporidios en el grupo de los hongos (Adl *et al.*, 2005); así, taxonómicamente, los microsporidios son hongos parasitarios muy especializados. La infección se produce por la ingestión de esporas con el alimento (Bailey, 1981; Webster, 1993), por la trofalaxis (Webster, 1993) o quizás después de la limpieza de los pelos del cuerpo (Bulla, 1977; Fries, 1993; Webster, 1993).

Ambos parásitos invaden en primer lugar las células del epitelio de la parte posterior del ventrículo. Producen una infección totalmente desarrollada por todo el epitelio en un plazo máximo de 2 semanas. La enfermedad se transmite entre abejas por la ingesta de material del panal y agua contaminados, y por trofalaxis; la acumulación de miel y de abejas infectadas aplastadas también puede intervenir en la transmisión de la enfermedad. El mecanismo de infección de los parásitos microsporidios se basa en la inyección mecánica de un filamento polar que protruye de la espora en germinación. Con fuerza física, el filamento penetra la membrana de una célula hospedadora hacia el interior de la misma (células epiteliales ventriculares en el caso de *N. apis* y de *N. ceranae*). Mediante el filamento, el esporoplasma infeccioso es introducido en el citoplasma de la célula hospedadora, donde se inicia la replicación del parásito, y más tarde la producción de esporas (Larsson, 1986). Pueden tener lugar autoinfecciones al mismo tiempo que nuevas infecciones. Tres días después de la infección, empiezan a desarrollarse esporas maduras en grandes cantidades en el caso de *N. apis*, y aproximadamente un día después en el caso de *N. ceranae* (Forsgren & Fries, 2010). Ambos parásitos tienen una tasa de multiplicación que depende de la temperatura. Los niveles de *Nosema* spp. En general aumentan cuando las abejas viven en confinamiento durante mucho tiempo, lo cual aumenta el riesgo de defecación dentro de la colmena. En primavera, los niveles de infección pueden aumentar rápidamente porque las abejas limpian los panales para la puesta de huevos de la reina (Bailey, 1955) y un mayor porcentaje de las abejas está expuesto a las temperaturas de la progenie, a las cuales la replicación del parásito es óptima, al menos en el caso de *N. apis* (Lotmar, 1943). *Nosema ceranae* puede crecer mejor a temperaturas ligeramente inferiores, en comparación con *N. apis* (Fenoy *et al.*, 2009).

Cualquier defensa natural inherente de una colonia de abejas frente a una infección fuerte por el parásito depende tanto del tamaño de la colonia como de las condiciones climáticas al comienzo del otoño del año previo (Steche, 1985). Si estas condiciones no son favorables, se reduce la esperanza de vida del conjunto de la colonia. Esto puede conducir a la muerte prematura de las abejas durante el invierno o el inicio de la primavera. En un caso típico de una colonia mermada debido a la infección por *Nosema*, se puede observar a la reina rodeada por unas pocas abejas, atendiendo confusamente a la progenie que ya está operculada.

En los excrementos, las esporas de *N. apis* pueden permanecer viables durante más de 1 año (Bailey, 1962). También pueden seguir viables durante más de 4 meses después de la inmersión en miel (White, 1919) y durante más de 4,5 años en los cadáveres de las abejas infectadas (Steche, 1985). Las esporas pueden perder viabilidad después de tan solo 3 días al encontrarse sumergidas en miel a la temperatura de la colmena (Morgenthaler, 1939). Es probable que la contaminación fecal de la cera, en especial en los panales utilizados para la cría, o de otras superficies interiores de la colmena, proporcione suficiente inóculo para que *N. apis* se transmita con éxito a la nueva generación de abejas y es probablemente la principal fuente de infección (Bailey, 1955). En el caso de *N. ceranae*, la durabilidad de las esporas en distintas situaciones todavía tiene que estudiarse, pero parecen resistir la desecación y el calor mejor que las esporas de *N. apis* (Fenoy *et al.*, 2009) mientras que son más sensibles a las temperaturas de congelación (Forsgren & Fries, 2010). La importancia relativa de las heces, la miel y los cadáveres como reservorios de las esporas infecciosas no se conoce del todo y parece ser que la temperatura puede tener un considerable efecto en las tasas a las que las esporas pierden viabilidad, independientemente del medio en que se encuentren (Morgenthaler, 1939).

Las esporas de *N. apis* se pueden destruir calentando las herramientas y el equipamiento de la colmena a una temperatura de al menos 60°C durante 15 minutos. Los panales pueden esterilizarse calentándolos a 49°C durante 24 horas (Cantwell & Shimanuki, 1970). Este método no puede utilizarse en el caso de *N. ceranae*, que puede sobrevivir a temperaturas de incluso 60°C (Fenoy *et al.*, 2009). Los vapores procedentes de una solución de ácido acético como mínimo del 60% inactivarán las esporas de *N. apis* en unas pocas horas dependiendo de su concentración; concentraciones mayores son incluso más eficaces y destruirán las esporas en unos pocos

minutos (Bailey, 1957). No se dispone de los datos correspondientes para *N. ceranae*. Tales procedimientos se encuentran bajo la jurisdicción de las autoridades de control nacional, con protocolos que varían de un país a otro. Se puede llevar a cabo la desinfección, por ejemplo, colocando una solución de ácido acético en recipientes con esponjas que pueden empaparse del líquido en la parte superior de un montón de cajas con panales cerrado herméticamente. Tras la desinfección después de un brote, se aconseja ventilar a fondo todos los panales durante al menos 14 días antes de su utilización. También se puede conseguir la supresión de la enfermedad por *Nosema* proporcionando a la colonia un antibiótico, la fumagilina, en forma de jarabe de azúcar (Cantwell & Shimanuki, 1970). El uso de antibióticos en abejas melíferas está prohibido en muchos países y en la Unión Europea.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente

En las formas agudas de la infección, en especial al inicio de la primavera, pueden detectarse en el panal y en el frontal de la colmena marcas fecales marrones (Bailey, 1967). En *N. ceranae* se ha documentado la ausencia de prevalencia estacional y de signos como depósitos fecales (Higes *et al.*, 2008). En la entrada de la colmena, se pueden observar abejas enfermas y muertas, aunque se deberían eliminar otras posibles causas, tales como el envenenamiento por pesticidas y enfermedades de las abejas adultas (como la acarapisosis) si este es el caso. La detección de estas enfermedades infecciosas requiere un examen microscópico. Durante el invierno, las colonias infectadas por *N. apis* pueden verse muy mermadas de abejas o totalmente extinguidas. La mayoría de las colonias infectadas por *N. apis* aparecerán normales, carentes de signos claros de la enfermedad incluso cuando esta sea suficiente para causar pérdidas significativas en los niveles de producción de miel y de eficiencia de la polinización (Anderson & Giacón, 1992; Fries *et al.*, 1996). Solo se puede realizar un diagnóstico exacto mediante el examen microscópico del abdomen o ventrículo de la abeja adulta, por medios moleculares (reacción en cadena de la polimerasa [PCR]) o por microscopía electrónica de transmisión (MET). Para diagnosticar una infección causada por *Nosema* spp. mediante microscopía, se extrae con unas pinzas el par posterior de segmentos abdominales para poner al descubierto el ventrículo completo con los tubos de Malpighi, el intestino delgado y el recto. Normalmente, el ventrículo es marrón pero, después de una infección por *Nosema*, puede volverse blanco y muy frágil. Sin embargo, este aspecto puede ser debido a otras causas de problemas intestinales, por ejemplo, por alimentarse de depósitos de comida no digeribles, tales como jarabe que contenga levaduras en crecimiento activo. Para un diagnóstico fiable, se aconseja examinar varias abejas en cada muestra. Por ejemplo, una muestra compuesta de 60 abejas permitirá detectar un nivel de infección del 5% con una probabilidad del 95%.

1.1. Microscopía

Es necesario tratar de distinguir entre una infección debida a *Nosema* spp. y la causada por *Malpighamoeba mellifica* (Webster, 1993). Con bastante frecuencia existe un indicio de disentería en una infección por *N. apis*. En una infección por *M. mellifica*, puede haber diarrea, frecuentemente de un color amarillo sulfuroso y de un olor peculiar. Las características de los quistes de *M. mellifica* se describen más adelante. Pueden aparecer infecciones mixtas secundarias (Morgenthaler, 1939). Un método no cuantitativo y simple que permite detectar la infección debida a *Nosema* spp. es el siguiente: se debe obtener la muestra de abejas de la entrada de la colmena para evitar el muestreo de abejas de corta edad que presenten menor probabilidad de infección. Se aconseja recoger al menos 60 abejas con el fin de detectar el 5% de las abejas enfermas con un 95% de confianza (Fries, 1993). Antes de enviarlas al laboratorio, estas abejas se deben fijar en formol al 4%, en alcohol etílico al 70% o congelarlas en un congelador estándar, para evitar que se descompongan y mejorar su recepción y organización en el laboratorio. Se separan los abdomenes de las abejas que van a ser examinadas y se trituran en 5 ml de agua. A continuación, se añade agua hasta un total de 1 ml por cada abeja de la muestra. Se instila una gota de la suspensión en un porta bajo un cubre y se examina a 400 aumentos en un microscopio de campo claro o de contraste de fases.

Las esporas miden aproximadamente 5–7 µm de largo y 3–4 µm de ancho (*Nosema ceranae* es ligeramente más pequeña que *Nosema apis*). Son completamente ovaladas y poseen un contorno oscuro. No se pueden observar sus contenidos, que constan de núcleo, esporoplasma y tubo polar. Habitualmente no son necesarios los colorantes. Se deben diferenciar las esporas de *Nosema* spp. de las levaduras, las esporas fúngicas, los cuerpos grasos y calcíferos y de los quistes de *M. mellifica*, que son esféricos y de un diámetro aproximado de 6–7 µm.

Después de secar al aire, los frotis del tejido infectado fijados con etanol se tiñen con la tinción de Giemsa (al 10% en tampón fosfato 0,02 M) durante 45 minutos. Las esporas de *Nosema* spp. tendrán un aspecto característico, con paredes gruesas no teñidas y un interior azul sin rasgos distintivos y sin núcleo visible. Las células de los insectos, las esporas fúngicas y otros protozoos teñidos de esta

forma generalmente tendrán paredes más delgadas, citoplasma azul/púrpura y núcleos de color magenta.

Para cuantificar el nivel medio de infección, pueden emplearse recuentos de esporas en un hemocitómetro (Cantwell, 1970) o bien pueden diagnosticarse abejas individualmente para determinar la proporción de abejas infectadas. Un protocolo adecuado es el que se indica a continuación:

Se toma una muestra de abejas obreras adultas de la entrada de la colmena o de zonas periféricas si el tiempo no facilita las condiciones de vuelo. Se maceran los abdómenes de 60 individuos en 5 ml de agua con un mortero y se añaden 50 ml de agua para llegar a un volumen total de 1 ml por abeja (más adelante se añaden 5 ml). Cuando los trozos de tejido son suficientemente pequeños, se filtra la suspensión a través de dos capas de gasa (fina tela de tejido flojo de algodón) colocadas en un embudo, vertiendo el filtrado a un tubo graduado de centrífuga. Se utilizan otros 5 ml de agua para lavar la mano de mortero, recoger el contenido del interior del mortero y verter la submuestra a través del embudo. Cuando parece que la solución ya es homogénea tras la agitación, se toma una muestra para llenar el volumen calibrado situado bajo un cubre de un hemocitómetro (cámara cuentaglóbulos). Después de unos minutos, las esporas habrán precipitado al fondo de la cámara. Las esporas de *Nosema* spp. tienen un aspecto transparente pero con un contorno oscuro peculiar y miden 5–7 µm de largo y 3–4 µm de ancho. Se observan muy bien a 400 aumentos en un microscopio de campo claro o de contraste de fases. Se cuentan las esporas de cada cuadrícula. Si una espora se sitúa sobre el borde de una cuadrícula, sólo se cuentan las que se sitúan en los bordes izquierdo y superior de la cuadrícula y no las que se encuentran en los bordes derecho e inferior. El tamaño de estas cámaras puede variar según el fabricante, pero básicamente consisten en dos cámaras independientes, cada una de las cuales tiene un volumen definido (0,1 mm³) que contiene una rejilla de recuento dibujada, de un área de 1 mm². El total de la rejilla consiste en 3 × 3 cuadros grandes, separados por líneas triples. Cada cuadro grande está a su vez dividido en 16 cuadros más pequeños, separados por líneas dobles, en total 144 cuadros. Las esporas se cuentan en los cuadros más pequeños, cuyo área es de 1/25 mm². Cuando el recuento termina, aplicando la siguiente fórmula puede calcularse el número de esporas por abeja en la muestra en cuestión:

$$Z = \alpha / \beta \times \delta \times 250,000$$

Donde

Z = número de esporas por abeja
 α = total de esporas contadas
 β = número de cuadros observados
 δ = factor de dilución

El número 250.000 se utiliza porque el volumen en cada cuadro observado es de 1/250.000 ml y la ecuación emplea el número medio de esporas por cuadro observado. Si no se observan esporas, el resultado debe considerarse como “no detectado”, pero, esto no significa que las abejas no estén infectadas. Los organismos reguladores correspondientes decidirán sobre el nivel de infección útil para sus propósitos.

Existe un método de laboratorio para la detección simultánea de esporas de *Nosema* spp. y quistes de *M. mellifica* que consiste en el examen individual de las colonias utilizando 60 abejas por colonia. Se prepara una suspensión de los abdómenes de abejas muertas macerándolos con 5–10 ml de agua; el volumen de agua depende del número y trastorno de las abejas. Se debe filtrar la suspensión para eliminar los residuos que interferirían en el examen, primero a través de un filtro de 100 µm y después a través de otro de 40 µm. Ciertas partes de los tubos de Malpighi pasan a través del filtro de 100 µm, pero se recogen en el de 40 µm. Se colocan en un porta o en una cámara de recuento de bacterias y se examinan a 400 aumentos. Después de una infección por *M. mellifica*, solo unos pocos tubos están llenos de quistes. En este caso no es visible la estructura normal de los tubos de Malpighi. Únicamente los quistes que se sitúan en el interior de estos tubos pueden considerarse como un resultado positivo, porque con frecuencia los quistes de *M. mellifica* se confunden con esporas fúngicas y levaduras.

1.2. Cultivo

Se ha observado que varias líneas celulares de lepidópteros son susceptibles a la infección tanto de *N. apis* como de *N. ceranae*. Recientemente se ha comprobado la susceptibilidad de las siguientes líneas (Gisder *et al.*, 2010): MB-L2 (*Mamestra brassicae*), Sf-158 y Sf-21 (*Spodoptera frugiperda*), SPC-BM-36 (*Bombyx mori*), IPL-LD-65Y (*Lymantria dispar*), y BTI-Tn-5B1-4 (*Trichoplusia ni*). Todas estas líneas celulares pueden obtenerse en colecciones nacionales de cultivos celulares, junto con

protocolos sobre cómo mantenerlas y realizar los pases de las líneas celulares. No obstante, los protocolos de los que se dispone todavía no permiten la propagación continua de *Nosema* spp. en cultivo celular. Así pues, todavía no es posible sustituir la infección de abejas para producir suspensiones de esporas.

1.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se han desarrollado diferentes métodos para distinguir *N. apis* de *N. ceranae*. A continuación se describe una PCR múltiple por medio de la cual se pueden identificar claramente los dos agentes patógenos, así como *Nosema bombi*, al mismo tiempo (Fries *et al.*, 2013).

1.3.1. Preparación de la muestra para la PCR

Se introduce un máximo de 30 abejas en una bolsa de triturado y filtro. Se añaden 0,5 ml de ddH₂O (sin ADNasa/ARNasa) por abeja y se homogeneiza la mezcla mediante un homogeneizador. Se puede congelar instantáneamente con nitrógeno líquido antes de la homogeneización para ayudar a romper mecánicamente células abiertas. Si no se dispone de un robot, puede emplearse un mortero para aplastar el tejido de las abejas (tejido congelado si así se ha procedido) con el fin de generar un homogenado homogéneo. Se transfieren 100 µl del homogenado líquido a un tubo de centrifuga y se centrifugan durante 3 minutos a 16.100 **g** para precipitar los microsporidios y demás material celular. Se desecha el sobrenadante. Se congela el precipitado con nitrógeno líquido y se aplasta con una mano de mortero hasta que queda pulverizado (para romper paredes abiertas de esporas de *Nosema*), y se repite 2–3 veces para que se diluya el ADN de *Nosema*. La extracción del ADN se puede llevar a cabo fácilmente aplicando procedimientos de rutina o kits comerciales. Se termina el paso de elución final en 100 µl de tampón AE.

1.3.2. PCR Múltiple

Para la amplificación de fragmentos génicos de ARNr de 16S (= ARNr SSU) mediante PCR múltiple, puede utilizarse la siguiente combinación de cebadores. Los cebadores se diseñaron en base a la alineación de todos los datos de secuencia de los que se disponía en GeneBank del gen ARNr de 16S de *N. apis*, *N. bombi* y *N. ceranae*.

Mnceranae-F	cebador directo: 5'-CGT-TAA-AGT-GTA-GAT-AAG-ATG-TT-3'
Mnapis-F	cebador directo: 5'-GCA-TGT-CTT-TGA-CGT-ACT-ATG-3'
Mnbombi-F	cebador directo: 5'-TTT-ATT-TTA-TGT-RYA-CMG-CAG-3'
Muniv-R:	cebador inverso: 5'-GAC-TTA-GTA-GCC-GTC-TCT-C-3'

Obsérvese que el cebador Mnbombi contiene puntos variables para explicar la diversidad de secuencias observada en esta especie.

Tamaño del producto de la PCR:

para <i>N. ceranae</i> :	143 bp
para <i>N. bombi</i> :	171 bp
para <i>N. apis</i> :	224 bp

Condiciones de la PCR:

1 µl de ADN (ca. 1 ng)
 0,5 U de polimerasa Taq
 Tampón de reacción Taq 2x (MgCl₂ 3 mM)
 Cada una de las dNTP 0,3 mM (mezcla de dNTP)
 0,4 µM de Mnceranae F
 0,4 µM de MnapisF
 0,5 µM de Mnbombi-F
 0,5 µM de Muniv-R
 en un volumen total de 10 µl

La amplificación se lleva a cabo en un termociclador en las siguientes condiciones: Paso inicial de desnaturalización a 95°C de 2 minutos, 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 60 segundos, con un paso final de extensión de 72°C durante 5 minutos. La visualización de los productos de la amplificación se lleva a cabo empleando procedimientos estándar.

2. Pruebas serológicas

No se dispone de pruebas serológicas.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y

No se dispone de productos biológicos.

BIBLIOGRAFÍA

- ADL S.M., SIMPSON A.G.B., LANE C.E., LUKEŠ J., BASS D., BOWSER S.S., BROWN M.W., BURKI F., DUNTHORN M., HAMPL V., HEISS A., HOPPENRATH M., LARA M., LE GALL L., LYNN D.H., MCMANUS H., MITCHELL E.A.D., MOZLEY-STANRIDGE S.E., PARFREY L.W., PAWLOWSKI J., RUECKERT S., SHADWICK L., SCHOCH C.L., SMIRNOV A. & SPIEGEL F.W. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **52**, 399–451.
- ANDERSON D.L. & GIACON H. (1992). Reduced pollen collection by honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies infected with *Nosema apis* and sacbrood virus. *J. Econ. Entomol.*, **85**, 47–51.
- BAILEY, L. (1955) The epidemiology and control of *Nosema* disease of the honey-bee. *Ann. Appl. Biol.* **43**, 379–389.
- BAILEY L. (1957). Comb fumigation for *Nosema* disease. *Am. Bee J.*, **97**, 24–26.
- BAILEY L. (1962). Bee diseases. In: Report of the Rothamsted Experimental Station for 1961, Harpenden, UK, 160–161
- BAILEY L. (1967). *Nosema apis* and dysentery of the honey bee. *J. Apic. Res.*, **6**, 121–125.
- BAILEY L. (1981). Honey Bee Pathology. Academic Press, London, UK.
- BULLA (1977). In: Comparative Pathobiology. Vol. 1: Biology of *Microsporidia* (1976); Vol. 2: Systematics of the *Microsporidia*, Lee A. & Cheng T.C., eds. Plenum Press, New York, USA, and London, UK.
- CANTWELL G.E. (1970). Standard methods for counting *Nosema* spores. *Am. Bee J.*, **110**, 222–223.
- CANTWELL G.E. & SHIMANUKI H. (1970). The use of heat to control *Nosema* and increase production for the commercial beekeeper. *Am. Bee J.*, **110**, 263.
- FENOY S., RUEDA C., HIGES M., MARTÍN-HERNÁNDEZ R. & DEL AGUILA C. (2009). High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 6886–6889. Epub 2009 Sep 4.
- FORSGREN E. & FRIES I. (2010) Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Vet. Parasitol.*, **170**, 212–217.
- FRIES I. (1993) *Nosema apis* - a parasite in the honey bee colony. *Bee World*, **74**, 5–19.
- FRIES I., CHAUZAT M.-P., CHEN Y.-P., DOUBLET V., GENERSCH E., GISDER S., HIGES M., MCMAHON D.P., MARTÍN-HERNÁNDEZ R., NATSOPOULOU M., PAXTON R.J., TANNER G., WEBSTER T.C. & WILLIAMS G.R. (2013). Standard methods for *Nosema* research. In: The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research, Dietemann V., Ellis J.D. & Neumann P., eds. *J. Apic. Res.*, **52** (1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.14>
- FRIES I., FENG F., DA SILVA A., SLEMENDA S.B. & PIENIAZEK N.J. (1996). *Nosema ceranae* n.sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a Microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *Eur. J. Protistol.*, **32**, 356–365.
- GISDER S., MÖCKEL N., LINDE A. & GENERSCH E. (2010). A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environment. Microbiol.*, **13**, 404–413.

HIGES M., MARTÍN-HERNANDEZ R., BOTIAS C., BAILON E.G., GONZALES-PORTO A., BARRIOS L., DEL NOZAL M.J., PALENCIA P.G. & MEANA, A. (2008) How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environment. Microbiol.*, **10**, 2659–2669.

KLEE J., BESANA A.M., GENERSCH E., GISDER S., NANETTI A., TAM D.Q., CHINH T.X., PUERTA F., RUZ J.M., KRYGER P., MESSAGE D., HATJINA F., KORPELA S., FRIES I., PAXTON R.J. (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.*, **96**, 1–10.

LARSSON R. (1986). Ultrastructure, function, and classification of Microsporidia. *Progr. Protistol.*, **1**, 325–390.

LOTMAR R. (1943). Über den Einfluss der Temperatur auf den Parasiten *Nosema apis*. *Beih. Schweiz. Bienenztg.*, **1**, 261–284.

MARTIN-HERNANDEZ R., MEANA A., PRIETO L., SALVADOR A.M., GARRIDO-BAILON E. & HIGES M. (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 6331–6338.

MORGENTHALER D. (1939). Die ansteckende Frühjahrsschwindsucht (*Nosema-Amoeben-Infektion*) der Bienen. Erweiterter Sonderdruck aus der Schweizerischen Bienenzeitung Heft 2, 3 und 4.

STECHE W. (1985). Revision of ZANDER & BOTTCHER. Nosematose. *In: Krankheiten der Biene, Handbuch der Bienenkunde.*

WEBSTER T.C. (1993). *Nosema apis* spore transmission among honey bees. *Am. Bee J.*, **133**, 869–870.

WHITE G.F. (1919). *Nosema* Disease. United States Department of Agriculture Bull., No. 780, 54 pp.

ZANDER E. (1909). Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Münch. Bienenztg.* **31**, 196–204.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la nosemosis de las abejas melíferas (puede consultarse la página web de la OIE:

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

Para más información sobre las pruebas de diagnóstico y los reactivos para la nosemosis de las abejas melíferas, por favor contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989 COMO NOSEMATOSIS DE LAS ABEJAS.
ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2013.