

INFESTACIÓN DE LAS ABEJAS MELÍFERAS POR *TROPILAEELAPS* SPP.

RESUMEN

Descripción e importancia de la enfermedad: Los ácaros del género *Tropilaelaps* son parásitos de las crías de las abejas melíferas. Su alimentación a base de larvas o de ninfas de las abejas causa malformaciones en las crías, la muerte de las abejas y un declive posterior o la fuga de las colonias. La enfermedad se desarrolla en aproximadamente una semana y los ácaros se dispersan sobre las abejas. Existen por lo menos cuatro especies del género *Tropilaelaps*. Cada especie está estrechamente relacionada con una abeja melífera gigante de Asia. Dos especies (*Tropilaelaps clareae* y *Tropilaelaps mercedesae*) constituyen plagas dañinas para *Apis mellifera*. Las otras dos especies (*Tropilaelaps koenigerum* y *Tropilaelaps thaii*) no parecen ser dañinas para *Apis mellifera*.

Identificación del agente: Existen métodos moleculares y morfológicos capaces de identificar cada especie. La infestación por *Tropilaelaps* puede reconocerse observando las abejas o mediante el examen de los restos de la colmena. La forma irregular de la cría, la muerte o malformación embrionaria, las abejas con alas malformadas que se arrastran hacia la entrada de la colonia, y especialmente la presencia en la colonia de ácaros alargados, veloces y de color marrón-rojizo, sirven para diagnosticar la presencia de *T. clareae* y/o *T. mercedesae*. Se puede realizar un diagnóstico temprano abriendo las celdillas de cría y encontrando dentro ácaros inmaduros y adultos. La colonia puede tratarse con varios productos químicos que hacen que los ácaros se desprendan del panal y de las abejas. Para examinar los restos de las colonias y los ácaros, se pueden utilizar tablas pegajosas en los suelos de las colonias. Como alternativa, para un cribado rápido puede emplearse la "prueba de impacto". El diagnóstico definitivo en el laboratorio se basa en el examen morfológico al microscopio. El resultado puede confirmarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa convencional y la secuenciación del producto obtenido.

Pruebas serológicas: No existen pruebas serológicas aplicables.

Requisitos para las vacunas: No existen vacunas disponibles.

A. INTRODUCCIÓN

Los ácaros del género *Tropilaelaps* pertenecen a la clase Arachnida, subclase Acari, superorden Parasitiformes, orden Mesostigmata y familia Laelapidae (Anderson & Roberts, 2013). No deben confundirse con el ácaro *Varroa destructor*, un parásito bien establecido en Europa. *Tropilaelaps clareae* se encuentra en Asia, donde es un parásito de la abeja melífera local *Apis dorsata breviligula*. También es un parásito de la especie de abeja melífera *A. mellifera*, introducida en Filipinas y de la especie de abeja melífera local *A. dorsata binghami*, de la isla indonesia de Sulawesi. *Tropilaelaps mercedesae*, al que inicialmente se confundía con *T. clareae*, al igual que *T. koenigerum*, es un parásito de la oriunda *A. dorsata dorsata* del continente asiático e Indonesia (excepto en la isla Sulawesi). *Tropilaelaps mercedesae* es un parásito de *A. mellifera* importado en esas regiones y otras circundantes y, junto con otra especie, *T. thaii*, también parasita a *A. laboriosa* en las regiones montañosas del Himalaya (Anderson & Morgan, 2007).

1. Ciclo de vida

La hembra de *Tropilaelaps* colonizadora (o hembras; hasta una docena pueden aparecer dentro de una sola celda individual), coloca de uno a 4 huevos en las larvas maduras de las abejas poco antes de que la celda sea

operculada. *Tropilaelaps* prefiere la cría del zángano, que puede ser parasitada en casi un 100%. (Burgett *et al.*, 1983). La descendencia del ácaro, generalmente un macho y varias hembras, se alimentan de la cría de la abeja produciéndole graves daños. Un ácaro necesita una semana para desarrollarse. Los adultos, incluida la hembra fundadora, salen con la abeja adulta y buscan nuevos hospedadores (de Guzman *et al.*, 2017).

Su corto ciclo de vida así como su estancia breve en las abejas adultas, explica por qué las poblaciones de *T. clareae* crecen más rápidamente que las de los ácaros *Varroa*. Cuando *T. Clarea* y *Varroa destructor* infestan a la misma colonia al mismo tiempo, el primero puede desalojar al ácaro *Varroa* (Burgett *et al.*, 1983; Ritter & Schneider-Ritter, 1988). Se dice que cuando ambas especies de ácaros están en la misma celda, la reproducción de ambas disminuye (Rath *et al.*, 1995).

La supervivencia en el exterior de las abejas es bastante corta (solo 1–2 días), dado que *Tropilaelaps* no puede perforar el integumento de las abejas adultas. Ese tiempo de supervivencia para *Tropilaelaps* spp. es importante para entender el ciclo de vida, e investigaciones recientes sugieren que puede ser de 5 a 10 días (Wilde, 2000a; 2000b). Los ácaros hembras grávidos morirán en 2 días salvo que depositen sus huevos (Woyke, 1987).

Al igual que *Varroa*, *Tropilaelaps* puede actuar como posible vector para los virus de las abejas melíferas, como el virus de las alas deformadas (VAD) (Forsgren *et al.*, 2009). Se ha informado que el VAD se replica en *T. mercedesae*, lo que sugiere que el ácaro puede actuar como un vector biológico de VAD (Dainat *et al.*, 2009). El impacto del complejo ácaros-virus no se conoce del todo. Algunos datos indican que el mayor impacto de la infestación de *Tropilaelaps* podría derivar del propio ácaro al reducir la respuesta inmunitaria del hospedador, la abeja (Khongphinitbunjong *et al.*, 2015).

La infestación por *Tropilaelaps* causa la muerte de muchas larvas de abejas (hasta un 50%), dando como resultado que las crías tengan una forma irregular y que sus cadáveres sobresalgan de las celdas. Muchas abejas aparecen con el abdomen deformado, las alas engrosadas y deformadas o sin patas, probablemente como consecuencia de una infección asociada al VAD. Algunas de las abejas afectadas se arrastran hasta la entrada de la celda (Atwal & Goyal, 1971). Además, se observan opérculos perforados como resultado de la actividad de saneamiento de las abejas obreras, las cuales desalojan las ninfas de las abejas infestadas o las abejas adultas jóvenes. Algunas colonias infestadas huyen llevando los ácaros a un nuevo lugar.

Las respuestas de comportamiento de las abejas melíferas a *T. mercedesae* dependen de la especie *Apis* de la que se trate. *A. cerana* y *A. dorsata* (el hospedador natural de *T. mercedesae*) mostraron una mayor resistencia conductual que *A. mellifera* (Khongphinitbunjong *et al.*, 2012). En *A. mellifera*, la infestación por *T. mercedesae* redujo significativamente la esperanza de vida de la abeja melífera y el peso de en el momento de emerger; también promovió los niveles de VAD y los signos clínicos asociados (Khongphinitbunjong *et al.*, 2016) y podría causar daños graves a las colonias.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de Infestación por *Tropilaelaps* spp. 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
Identificación del agente						
Morfología	+++	+++	+++	+++	+++	–
PCR convencional	++	++	++	++	+	–

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito.
PCR = reacción en cadena de la polimerasa

1. Detección del ácaro a nivel de campo

El primer signo de la infestación por la especie *Tropilaelaps* es, a menudo, la aparición de ácaros alargados y de color marrón-rojizo en los panales o en las abejas adultas (Figs.2 y 3).

La longitud corporal depende de la especie y varía entre machos y hembras. *T. koenigerum* es el miembro más pequeño del género, y su longitud corporal es < 0,7 mm en el caso de las hembras y ~0,575 mm en el caso de los machos. Las hembras de *T. mercedesae*, *T. clareae* y *T. thaii* son mucho más largas, puesto que miden ~0,95–0,99 mm, ~0,87–0,885 mm y ~0,89 mm, respectivamente, mientras que la longitud corporal de los machos de *T. mercedesae* y de *T. clareae* es ligeramente inferior a la de las respectivas hembras, situándose en los 0,907–0,927 mm y los 0,852–0,858 mm, respectivamente. Todavía no se han descubierto machos de *T. thaii* (Anderson & Roberts, 2013).

Tropilaelaps puede diferenciarse fácilmente del ácaro *Varroa* utilizando una lupa de x10. El cuerpo del ácaro *Varroa* es más ancho que largo y se mueve lentamente, mientras que el cuerpo del *Tropilaelaps* es alargado, con un escudo holovenral o similar muy esclerotizado (Fig. 1), y se desplaza con rapidez.

Tropilaelaps tampoco debe confundirse con otros ectoparásitos de abejas melíferas, como las moscas del género *Braula* u otros ácaros de la familia *Laelapidae* que viven en los detritos de las colmenas de las abejas melíferas, como *Mellitiphis alvearius* (Cook *et al.*, 1983) (Fig. 4) o el ácaro de la familia Ameroseiidae llamado *Neocypholaelaps apicola* (Delfinado-Baker & Baker, 1983; Kontschán *et al.*, 2015).

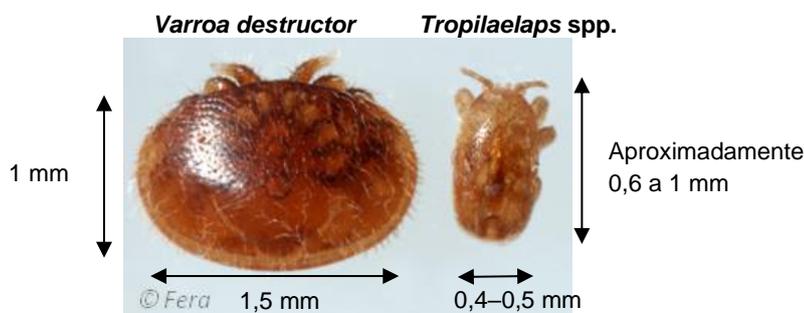


Fig. 1. *Varroa destructor* y *Tropilaelaps* spp. (vista dorsal).
Fotografía de la APHA Bee Unit, York. Copyright de UK Crown.



Fig. 2. *Tropilaelaps* sobre larvas de *Apis dorsata*. Fotografía de D. Anderson.



Fig. 3. Cría de *Tropilaelaps* sobre crisálidas de *Apis mellifera*. Fotografía de W. Ritter.

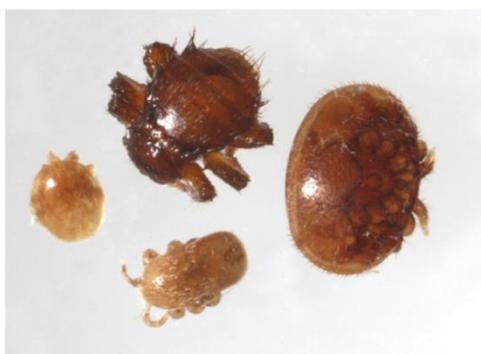


Fig. 4. *Braula coeca* (encima), *Varroa destructor* (a la derecha), *Tropilaelaps* spp. (abajo, centro) y *Melittiphis alvearius* (a la izquierda) (vista dorsal)
Fotografía de la APHA Bee Unit, York. Copyright de UK Crown.

1.1. Recogida de los ácaros

Entre los métodos utilizados para la recogida de ácaros está la utilización de un panecillo de éter o de azúcar (Ritter & Schneider-Ritter, 1988). Se colocan aproximadamente 100–200 abejas en una jarra de boca ancha con tapa. Se empujan las abejas hacia el interior de la jarra utilizando un vacío moderado para succionarlas. Se golpea el fondo de la jarra con un golpe seco para que las abejas se introduzcan hasta el mismo. En el fondo debería haber una capa de aproximadamente 2,54 a 5,08 cm de abejas. Se destapa la jarra y se pulveriza mediante ráfagas de 2 segundos con éter. Alternativamente, se utiliza suficiente alcohol al 70% o agua jabonosa para cubrir las abejas; o se añaden aproximadamente 25 gramos de azúcar en polvo (o harina). Si se utiliza éter, se vuelve a poner la tapa y se agita o gira la jarra durante unos 10 segundos. Los ácaros deberían pegarse a las paredes. Si se utiliza jabón o alcohol, se agita y luego se sacan las abejas utilizando una tela metálica gruesa o un colador; los ácaros se quedarán en el líquido. Si se utiliza azúcar u otro polvo, se coloca material protector (como por ejemplo, una tela metálica) en la boca de la jarra y se arrojan los ácaros a un papel blanco para contarlos. La operación se repite cada 2 minutos. Para un recuento más preciso, se finaliza con un lavado de alcohol o agua jabonosa para recoger todos los ácaros.

1.2. Examen de la colonia y de la crías

Cuando se examinan las colonias de abejas melíferas buscando la presencia de *Tropilaelaps* (o *Varroa*), el examen tanto de las crías de los zánganos como de las crías de las obreras puede proporcionar una identificación rápida de la infestación. Se pueden observar los ácaros dentro de las abejas operculadas utilizando un raspador de abejas (con dientes como los de un tenedor) para levantar las ninfas operculadas. Los ácaros son claramente visibles. Los ácaros jóvenes son blanquecinos y pueden carecer de movimiento mientras se alimentan en los cuerpos de sus hospedadores, dado que las partes de su boca y las patas delanteras se encuentran fijadas en la cutícula de la abeja hospedadora (Ritter & Schneider-Ritter, 1988). La extensión de la parasitación se puede estimar abriendo un número predeterminado de celdas de cría; El grado de infestación puede estimarse entonces como el porcentaje de crías operculadas que contienen ácaros vivos (Burgett & Kitprasert, 1990).

1.3. Prueba de impacto

Otra técnica rápida y simple es la "prueba de impacto". Este método consiste en golpear con firmeza un marco de cría de abejas melíferas sobre una bandeja recolectora. Primero, todas las abejas adultas son retiradas de un panal que contiene crías operculadas sacudiendo el marco sobre la colonia. Una vez que las abejas adultas se retiran, los marcos se golpean firmemente sobre una bandeja de metal blanco golpeando un extremo del marco en el costado de la bandeja, girando el marco, volviendo a golpear el marco, y repitiendo el proceso una vez más hasta un total de cuatro golpes. Este proceso desaloja a los ácaros de la superficie de la colmena, que luego se pueden contar (Pettis *et al.*, 2013).

1.4. Examen de tablas pegajosas

Se puede realizar un diagnóstico preciso utilizando una tabla pegajosa cubierta con una malla, similar a una mosquitera, para evitar que las abejas retiren los ácaros separados de las abejas. La malla debe ser lo bastante gruesa para que los ácaros puedan pasar a través de ella. Se prepara una tabla pegajosa con un panel para carteles, cartón u otro papel blanco rígido y se cubre con grasa de motor u otra sustancia pegajosa (Koeniger *et al.*, 2002; Ostiguy & Sammataro, 2000; Sammataro *et al.*, 2000) o se utiliza una hoja de papel de estantería pegajoso. Se corta el papel de forma que se ajuste a la tabla que sirve de fondo a la colmena. Se corta un trozo de malla o red metálica del mismo tamaño y se coloca sobre la tabla pegajosa. Para evitar que las abejas limpien la tabla, se dobla esta bajo los bordes exteriores de la malla o red para que esta quede elevada con respecto a la tabla, grapando ambas a tal efecto. Se deja el tablero en la colonia durante 3 días, y se recogen y examinan los restos en busca de ácaros. Algunas veces se utilizan acaricidas para quitar los ácaros de las abejas, y aquellos aparecerán en la tabla pegajosa.

2. Identificación del ácaro en el laboratorio

Para poder implementar medidas y evitar la propagación a territorios no infestados resulta fundamental lograr un diagnóstico rápido y fiable. Las muestras de campo sospechosas de estar infestadas por el género *Tropilaelaps* deben enviarse a laboratorios oficiales para que se confirme el diagnóstico. Para el diagnóstico preliminar, debe realizarse una identificación morfológica. Es un método rápido y barato que no requiere equipo sofisticado. El resultado se puede confirmar mediante una reacción en cadena de la polimerasa para la identificación molecular de las especies de *Tropilaelaps*.

2.1. Precauciones especiales que deben aplicarse durante la obtención de las muestras

Las muestras para la identificación se obtienen del interior de las colmenas de abejas melíferas, por ejemplo, en colonias, en jaulas para reinas, en las propias reinas o en abejorros.

Los ejemplares sospechosos deben matarse antes de ser enviados al laboratorio, por ejemplo, con etanol al 70%. No debe emplearse etanol desnaturalizado si van a utilizarse métodos moleculares, debido a la posible inhibición de la PCR. Como alternativa, las muestras se pueden conservar durante una noche a -20°C para matar los ejemplares.

A la llegada al laboratorio, los paquetes deben abrirse en condiciones de contención. Si a la llegada los ejemplares están vivos, para poder trabajar con los mismos deberán someterse a -80°C durante aproximadamente una hora. Este procedimiento inmoviliza las muestras, que a continuación se pueden conservar en etanol al 70%.

2.2. Identificación morfológica de *Tropilaelaps* spp.

Este método consiste en el examen visual solo de ácaros adultos, teniendo en cuenta las características morfológicas del ácaro *Tropilaelaps* adulto en comparación con las de otros géneros de ácaros habituales en las colonias de abejas (sobre todo *V. destructor*). El examen visual que se describe no es suficiente para diferenciar las cuatro especies de *Tropilaelaps* porque son morfológicamente muy similares entre ellas (Anderson & Morgan, 2007; Tangjingjai *et al.*, 2003).

2.2.1. Equipo y reactivos

Se precisa equipo y material de entomología clásica:

- Estereomicroscopio
- Microscopio compuesto (1000x)

- Platina caliente
- Recipientes: placas de Petri, cazuelas de cerámica, relojes de vidrio o elementos similares
- Portaagujas de microdissección con agujas de entomología y agujas hechas de sedal de pesca (con el extremo aplastado para obtener forma de cuchara)
- Pinzas de punta fina
- Portaobjetos de vidrio (clásicos y cóncavos) y cubreobjetos de vidrio
- Viales de cierre hermético
- Ácido láctico
- Medio de montaje (como el medio de Hoyer) y pintura de uñas transparente para la conservación a largo plazo
- Etanol al 70% (evitar el etanol desnaturalizado).

2.2.2. Procedimiento analítico

Se ponen todos los ejemplares en una placa y se comprueba si pertenecen a una o a varias especies observándolas al estereomicroscopio. Si pertenecen a varias especies, debe examinarse cada una de ellas por separado. Los ejemplares que vayan a examinarse deberán escogerse de entre los ácaros que no estén dañados, y se tomarán con pinzas de punta fina o portaagujas para depositarlos en otra placa para su estudio.

Al estereomicroscopio, se examina a los ácaros comprobando los tres criterios básicos de identificación de *Tropilaelaps* spp. (véase la Tabla 2, abajo). Si no se cumple ninguno de estos tres criterios, se procede a un examen microscópico.

Tabla 2. Criterios para el reconocimiento de *Tropilaelaps* spp. (Anderson & Roberts 2013; Delfinado & Baker 1961; Smiley 1991; University of Michigan 2014).

Deben comprobarse las siguientes características:

- Los estigmas son orificios traqueales;
- El coxa es el primer segmento de las patas y conecta la pata con el cuerpo;
- Los peritremos son estructuras tubulares que salen de los estigmas. Pueden participar en la respiración;
- El tritosterno es un órgano sensorial en forma de Y de tipo piloso caudal al gnatosoma (el gnatosoma es la parte del cuerpo de los ácaros que incluye los aparatos bucales y el orificio oral);
- Reticulado significa que tiene un caparazón en patrón roto o en escamas de pez.

	<i>Estereomicroscopio</i>	<i>Microscopio compuesto</i>
1. <i>Tropilaelaps</i> tiene cuatro pares de patas. El primer par está alineado verticalmente, y parece un par de antenas (Fig. 5). → Clase Arachnida	X	
2. El cuerpo no está segmentado, sino que tiene una única región visible, debido a la fusión del prosoma (el equivalente al cefalotórax) y el opistosoma (o abdomen) en una masa única (Fig. 5). → Subclase Acari	X	
3. El cuerpo es más largo que ancho (al contrario que en <i>V. destructor</i>) (Figs. 1 y 4). La proporción entre longitud y anchura es superior a 1,3.	X	
4. Tiene un par de estigmas lateroventrales entre los coxa III y IV (Fig. 7). → Orden Parasitiformes		400x
5. Presencia de peritremos alargados (Fig.7). Presencia de un tritosterno (Fig.7) (criterio opcional, difícil de observar). → Suborden Mesostigmata		200x
6. Placa epiginial alargada, y posteriormente redondeada o puntiaguda. Placa ventrianal triangular (Figs. 5 y 6). → Laelapidae		100x
7. Placa epiginial alargada, al menos el doble de larga que la placa ventrianal (Figs. 5 y 6).		100x o 200x
8. Placa externa reticulada (Fig. 7).		400x

	<i>Estereomicroscopio</i>	<i>Microscopio compuesto</i>
9. Opistosoma con pelos duros, gruesos en la base, situados en la mitad apical de la cara ventral (Figs. 5 y 6).		200x
Nota: Criterios para distinguir hembras de machos: el apéndice móvil de los quelíceros de los machos es filiforme (espermodáctilos) (Fig. 8). La placa epiginial es más corta en el macho que en la hembra (Fig. 8). (Anderson y Morgan, 2007)		200x

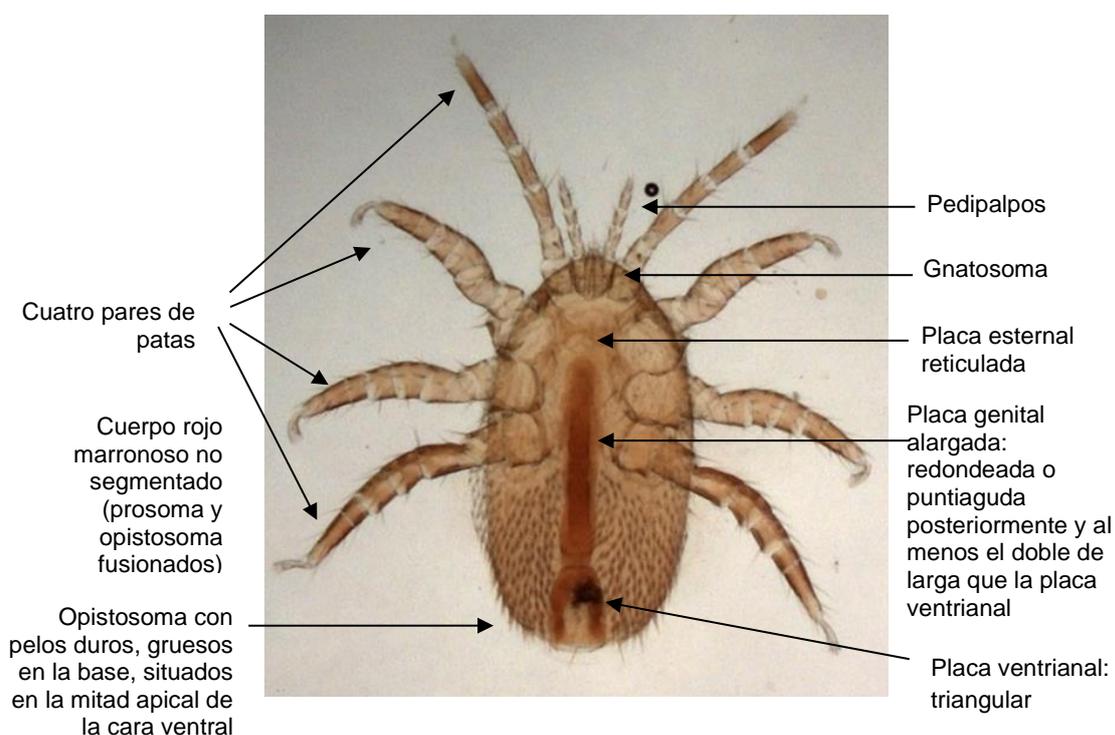
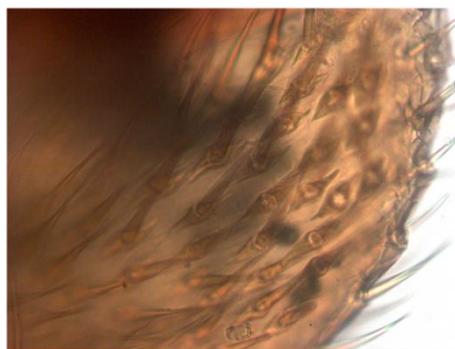


Fig. 5. *Tropilaelaps clareae*, hembra (vista ventral)
Fotografía de S. Franco, Anses, Laboratorio de Sophia Antipolis.



Aumentos 100x

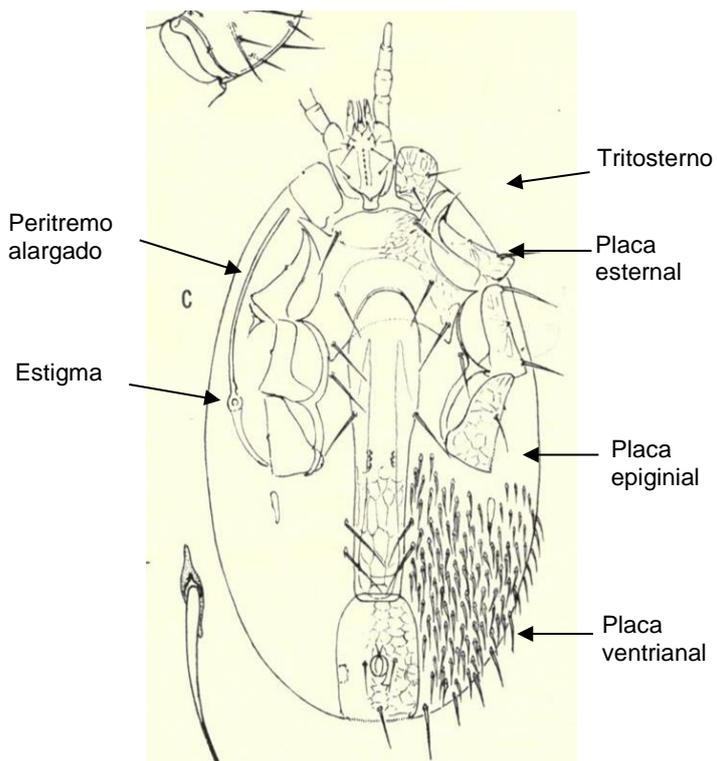


Aumentos 400x

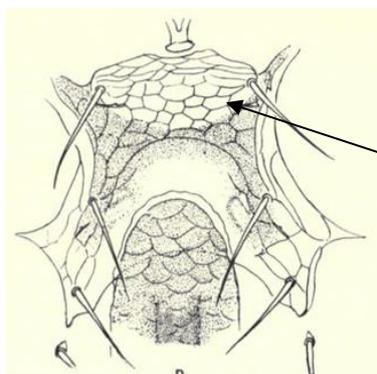
Fig. 6. *Tropilaelaps* sp. (vista ventral). Opistosoma, púas apicales ásperas, gruesas en la base.
Fotografías de S. Franco, Anses, Laboratorio de Sophia Antipolis.



T. clareae – Aumentos 100x

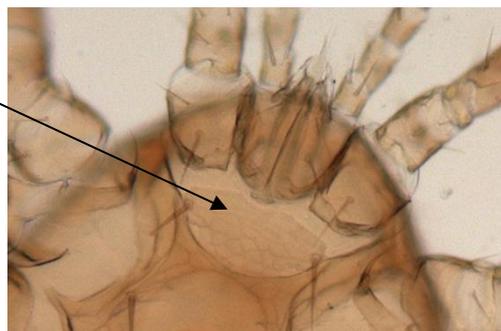


T. clareae, hembra (vista ventral)



Placa esternal y placa epiginial (vista ventral)

Placa esternal reticulada



T. clareae – Aumentos 200x



Gnatosoma (vista ventral)

Tritosterno



T. clareae – Aumentos 200x

Fig. 7. *Tropilaelaps clareae*, anatomía

Figuras de: Delfinado & Baker, 1961. Fotografías de S. Franco, Anses, Laboratorio de Sophia Antipolis.

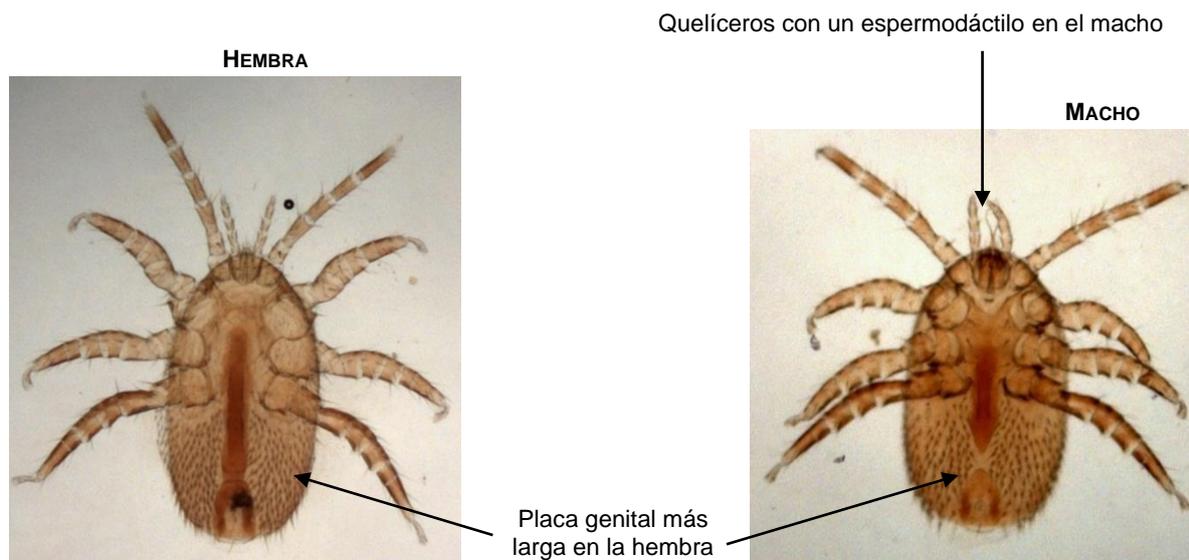


Fig. 8. *Tropilaelaps clareae*, macho y hembra (vista ventral)
Photos by S. Franco, Anses, Sophia Antipolis laboratory.

Para el examen microscópico, deben aclararse los tejidos blandos para poner de manifiesto las características morfológicas. Se depositan unas gotas de ácido láctico en un portaobjetos (empleando portaobjetos cóncavos si los ejemplares son grandes). Se depositan los ejemplares escogidos en el portaobjetos en ácido láctico con el portaagujas (equipado con sedal de pesca) (o con pinzas extrafinas). Empleando dos portaagujas (equipados con aguja de entomología), si sitúan los ejemplares de tal forma que se obtenga una vista ventral. Se coloca un cubreobjetos sobre el portaobjetos sin aplastar el ácaro, evitando la formación de burbujas de aire. Si es posible, se presiona con cuidado el cubreobjetos con unas pinzas con el fin de extender las patas, que suelen estar contraídas bajo el cuerpo. Se pone el portaobjetos sobre una platina caliente, a unos 50°C, y se espera a que el ácido láctico haga efecto (unos 30 minutos). NB: el líquido no debe hervir, puesto que ello destruiría la muestra.

Se examina el/los portaobjeto/s al microscopio compuesto a 100x, 200x, y 400x con el fin de comprobar bien todos los criterios de diagnóstico indicados en la Tabla 2. Deben realizarse observaciones comparativas con preparaciones de referencia si se dispone de las mismas. Es posible que deba variarse la profundidad del campo observado en función del espesor del cuerpo del ácaro.

Las muestras se pueden conservar a temperatura ambiente en un vial cerrado de forma hermética con etanol al 70%. Los portaobjetos se pueden conservar a largo plazo montando los ácaros en medio de Hoyer, dejándolos secar durante 2 semanas a 50°C y sellando el cubreobjetos con pintura de uñas transparente. Para más información sobre la conservación y el montaje de ácaros, consúltese la referencia Dietemann *et al.* (2013).

2.2.3. Criterios de identificación para ejemplares adultos de *Tropilaelaps* spp.

Tropilaelaps spp. son visibles a simple vista. Miden alrededor de 0,6 – 1,0 mm de largo y unos 0,4–0,5 mm de ancho. *Tropilaelaps* es más pequeño que *V. destructor* (Figs. 1 y 4). Si se confirman todos los criterios morfológicos del ácaro adulto (criterios 1 a 9 de la Tabla 2), el resultado es una confirmación “positiva” de la identificación del género *Tropilaelaps*. Si no se observan una o más de las características morfológicas básicas (criterios 1 a 9) de *Tropilaelaps* spp., el resultado es “negativo” y no se confirma la identificación del género *Tropilaelaps*. Si no puede determinarse ni la presencia ni la ausencia de los nueve criterios (por ejemplo, debido a que la muestra está dañada), el resultado es “inconcluyente” y deben emplearse métodos moleculares para su confirmación.

2.3. Identificación molecular

La identificación morfológica de *Tropilaelaps* spp. es complicada debido a su parecido con otros ácaros que también pueden hallarse en las colmenas. Cada vez se utiliza más la PCR para confirmar las sospechas de infestación. La PCR convencional descrita abajo se basa en la amplificación de una secuencia parcial del gen mitocondrial de *Tropilaelaps* spp. que codifica la citocromo oxidasa I (COI)

(Anderson & Morgan, 2007). Los cebadores COI-TCF1 y COI-TCR2 amplifican un fragmento de 580 pares de bases. El tamaño de los productos de la PCR se puede comprobar mediante una electroforesis en gel de agarosa, cuyo resultado se compara con una escala de ADN (marcador de peso molecular). Los cebadores no son específicos de *Tropilaelaps* spp., de tal forma que es posible que se produzca una amplificación del gen de la COI de otros parásitos; así, cuando se halle un producto de la PCR del tamaño esperado, es necesario secuenciar el ADN.

2.3.1. Preparación de la muestra, equipo y reactivos

Las muestras analizadas suelen consistir en unos 10 ácaros adultos, que se conservan en alcohol no desnaturalizado a > 95% o bien se desecan. Si se conservan en alcohol, antes deben aclararse tres veces en un volumen grande de tampón fosfato (50 ml/tubo) o simplemente dejarse secar varios minutos sobre papel absorbente antes del paso de la extracción del ADN. A continuación, estos ácaros se transfieren a un microtubo de 1,5 ml. Este paso es importante para evitar la inhibición. Los ácaros se trituran en 200 µl de tampón fosfato empleando una mano de mortero desechable en el microtubo de 1,5 ml. Las muestras trituradas se pueden conservar congeladas a ≤ -16°C.

Se precisa un sistema de detección y análisis mediante PCR convencional. Para la extracción del ADN se puede emplear cualquier método o kit adecuado, que irá seguida de la amplificación en un termociclador y de una electroforesis en gel de agarosa. Todo el equipo y el material debe estar validado para su uso en el laboratorio en cuestión. Para evitar la contaminación por ADN deben aplicarse las medidas habituales, y los procedimientos empleados deben cumplir las normas establecidas en el Capítulo 2.1.2. *Biotecnología en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas*. En todas las etapas deben emplearse controles, tanto positivo como negativo.

2.3.2. Procedimiento de la PCR

Los cebadores desarrollados por Anderson y Morgan (2007) son los siguientes:

Nombre	Secuencia
COI-TCF1	5'-CTATCCTCAATTATTGAAATAGGAAC-3'
COI-TCR2	5'-TAGCGGCTGTGAAATAGGCTCG-3'

Para utilizar y conservar la mezcla para la PCR deben seguirse las instrucciones del fabricante. Las soluciones base de trabajo para los cebadores se preparan con tampón TE (Tris y ácido etilendiaminotetraacético [EDTA]) bajo sin nucleasa a una concentración de 20 µM. Las soluciones de reserva deben conservarse a -20°C.

Las mezclas para la PCR se preparan en una sala de laboratorio exclusiva para este fin. Todos los reactivos, excepto las muestras de ADN, se mezclan antes de la distribución a cada tubo de reacción. En cada PCR deben incluirse los controles correspondientes, y como mínimo un molde control (NTC, solo reactivos), controles negativos (es decir, 1 por cada 10 muestras analizadas) y un control positivo (solución de ADN de plásmido que incluya la secuencia que debe amplificarse, diluida 10 veces el límite de detección de la PCR (LDPCR). Las amplificaciones se llevan a cabo en un volumen total de 20 µl.

Se añaden mezclas del reactivo para PCR en una sala limpia (no deben manipularse ni agentes patógenos ni productos de amplificación). Las condiciones anteriores se han definido en pasos de validación de la PCR. De ser optimizadas, podrían utilizarse otras condiciones.

	Concentración final	Volumen por tubo (µl)
H ₂ O sin nucleasa	/	12,6
ADN pol Taq (5U/µl)	0,5U/µl	0,2
Tampón ADN pol Taq (10x)	1x	2,0
MgCl ₂ (50 mM)	3,5 mM	1,3
Mezcla de dNTP (10 mM)	450 µM	0,9
COI-TCF1 (20 µM)	500 nM	0,5

	Concentración final	Volumen por tubo (µl)
COI-TCR2 (20 µM)	500 nM	0,5
Volumen total de la mezcla		18

Se añaden 2 µl del molde de ADN (muestra problema o ADN de plásmido) o control negativo a la mezcla de reactivo hasta un volumen final de 20 µl. Las muestras de ADN se preparan y añaden a la mezcla para PCR en una zona distinta.

El programa del termociclador dependerá del equipo que se utilice; por ejemplo:

Paso	Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Desnaturalización inicial	1	95	5:00
PCR	35	94	0:30
		58	0:30
		72	0:45
Extensión final	1	72	7
Conservación		10	∞

La optimización de la PCR debe llevarse a cabo de acuerdo con la máquina Mastermix y de PCR que se utilice, sobre todo analizando con distintas temperaturas de hibridación.

Detección de los productos amplificados:

- Se prepara un gel de agarosa al 1,2% en TAE (Tris-acetato-EDTA) 1x con el número de pocillos adecuado
- Se añaden 2 µl de tampón de carga 6x a 10 µl de los productos de la PCR
- Se cargan 10 µl de las muestras en los pocillos
- Para controlar el tamaño de los productos amplificados, se recomienda una escala de 100 pb
- Se ejecuta el gel
- Se analiza mediante rayos UV tras aplicar una tinción adecuada para ADN

La interpretación de los resultados se basa en la presencia o ausencia del producto que se deseaba amplificar: el tamaño del producto de la PCR esperable es de 580 pb incluidos los dos cebadores. No obstante, la presencia de un producto de la PCR de este tamaño no es suficiente para la identificación del género y la especie de *Tropilaelaps*, sino que se precisa un paso de secuenciación.

2.3.3. Secuenciación de los productos de la PCR

Si se detecta una banda de 580 pb en el producto de la PCR, esta debe secuenciarse. Este método no se describe aquí pero puede consultarse en otras fuentes. En Genbank existe un conjunto de secuencias de la COI que puede consultarse (EF025423 a EF025468 y HQ533148 a HQ533159 [Luo *et al.*, 2011]) y que se incluye en el análisis para construir el árbol filogenético y para identificar las especies de *Tropilaelaps*. Se incluye un grupo adicional de secuencias de la COI de *Varroa* (EF025469, 253947435)

3. Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas no son ni adecuadas ni relevantes para las infestaciones de colonias de abejas.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

No existen vacunas disponibles.

BIBLIOGRAFÍA

- ANDERSON D.L. & MORGAN M.J. (2007). Genetic and morphological variation of bee-parasitic *Tropilaelaps* mites (*Acari: Laelapidae*): new and re-defined species. *Exp. Appl. Acarol.*, **43**, 1–24.
- ANDERSON D.L. & ROBERTS J.M.K. (2013). Standard methods for *Tropilaelaps* mites 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. Apicultural Res.*, **52**, <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.21>.
- ATWAL A.S. & GOYAL N.P. (1971). Infestations of honeybee colonies with *Tropilaelaps*, and its control. *J. Apic. Res.*, **10**, 137–142.
- BURGETT D.M. & KITPRASERT C. (1990). Evaluation of Apistan™ as a control for *Tropilaelaps clareae* (*Acari: Laelapidae*), an Asian honey bee brood mite parasite. *Am. Bee J.*, **130**, 51–53.
- BURGETT M., AKRATANAKUL P. & MORSE R.A. (1983). *Tropilaelaps clareae*: a parasite of honeybees in south-east Asia. *Bee World*, **64**, 25–28.
- COOK V.A. & BOWMAN C.E. (1983). *Mellitiphis alvearius*, a little-known mite of the honeybee colony, found on New Zealand bees imported into England. *Bee World*, **64**, 62–64.
- DAINAT B., KEN T., BERTHOUD H. & NEUMANN P. (2009). The ectoparasitic mite *Tropilaelaps mercedesae* (*Acari, Laelapidae*) as a vector of honeybee viruses. *Insectes Sociaux*, **56**, 40–43.
- DE GUZMAN L.I., WILLIAMS G.R., KHONGPHINITBUNJONG K. & CHANTAWANNAKU P. (2017). Ecology, life history, and management of *Tropilaelaps* mites. *J. Econ. Entomol.*, **110**, 319–332.
- DELFINADO M.D. & BAKER E.W., (1961). *Tropilaelaps*, a new genus of mite from the Philippines (*Laelapidae, Acarina*). *Fieldiana Zoology*, **44**, 53–56.
- DELFINADO-BAKER M. & BAKER E., (1983). A new species of *Neocypholaelaps* (*Acari: Ameroseiidae*) from brood combs of the Indian honey bee. *Apidologie*, **14**, 1–7.
- DIETEMANN V., NAZZI F., MARTIN S.J., ANDERSON D.L., LOCKE B., DELAPLANE K.S., WAUQUIEZ Q., TANNAHILL C., FREY E., ZIEGELMANN B., ROSENKRANZ P. & ELLIS J.D. (2013). Standard methods for varroa 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. Apicultural Res.*, **52**, <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.09>.
- FORSGREN E., DE MIRANDA J. R., ISAKSSON M., WEI S., & FRIES I. (2009). Deformed wing virus associated with *Tropilaelaps mercedesae* infesting European honey bees (*Apis mellifera*). *Exp. Appl. Acarol.*, **47**, 87–97.
- KHONGPHINITBUNJONG K., DE GUZMAN L.I., BURGETT M.D., RINDERER T.E. & CHANTAWANNAKU P. (2012). Behavioral responses underpinning resistance and susceptibility of honeybees to *Tropilaelaps mercedesae*. *Apidologie*, **43**, 590–599.
- KHONGPHINITBUNJONG K., DE GUZMAN, L. I., TARVER M. R., RINDERER T. E. & CHANTAWANNAKU P. (2015). Interactions of *Tropilaelaps mercedesae*, honey bee viruses and immune response in *Apis mellifera*. *J. Apic. Res.*, **54**, 40–47.
- KHONGPHINITBUNJONG K., NEUMANN P., CHANTAWANNAKU P. & WILLIAMS G.R. (2016). The ectoparasitic mite *Tropilaelaps mercedesae* reduces western honey bee, *Apis mellifera*, longevity and emergence weight, and promotes Deformed wing virus infections. *J. Invertebr. Pathol.*, **137**, 38–42.
- KOENIGER G., KOENIGER N., ANDERSON D.L., LEKPRAYOON C. & TINGEK S. (2002). Mites from debris and sealed brood cells of *Apis dorsata* colonies in Sabah, (Borneo) Malaysia, including a new haplotype of *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*, **33**, 15–24.
- KONTSCHÁN J., TÓBIÁS I., BOZSIK, G. & SZOCS G. (2015). First record of *Neocypholaelaps apicola* from beehives in Hungary (ACARI: Mesostigmata: Ameroseiidae): Re-description and DNA barcoding. *Acta Zool. Acad. Sci. Hung.*, **61**, 237–245.
- LUO Q., ZHOU T., WANG Q., DAI P., WU Y. & SONG H. (2011). Identification of *Tropilaelaps* mites (*Acari, Laelapidae*) infesting *Apis mellifera* in China. *Apidologie*, **42**, 485–498.

- OSTIGUY N. & SAMMATARO D. (2000). A simplified technique for counting *Varroa* sticky boards. *Apidologie*, **31**, 707–716.
- PETTIS J.S., ROSE R., LICHTENBERG E.M., CHANTAWANNAKUL P., BUAWANGPONG N., SOMANA W. & VANENGELSDORP D. (2013). A rapid survey technique for tropilaelaps mite (*Mesostigmata: Laelapidae*) detection. *J. Econ. Entomol.*, **106**, 1535–1544.
- RATH W., BOECKING O. & DRESCHER W. (1995). The phenomena of simultaneous infestation of *Apis mellifera* in Asia with the parasitic mites *Varroa jacobsoni* OUD, and *Tropilaelaps clareae* Delfinado and Barker. *Am. Bee J.*, **135**, 125–127.
- RITTER W. & SCHNEIDER-RITTER U. (1988). Differences in biology and means of controlling *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae*, two novel parasitic mites of *Apis mellifera*. In: Africanized Honey Bees and Bee Mites, Needham G.R., Page R.E. Jr., Delfinado-Baker M. & Bowman C.E., eds. Ellis Horwood, Chichester, UK, 387–395.
- SAMMATARO D., GERSON U. & NEEDHAM G.R. (2000). Parasitic mites of honey bees: life history, implications and impact. *Ann. Rev. Entomol.*, **45**, 519–548.
- SMILEY R.L. (1991). Insect and Mite Pests in Food, an Illustrated Key, Gorham J.R., ed. Food and Drug Administration, United States Department of Agriculture, p. 6.
- TANGJINGJAI W., VERAKALASA P., SITTIPRANEED S., KLINBUNGA S. & LEKPRAYOON C. (2003). Genetic differences between *Tropilaelaps clareae* and *Tropilaelaps koenigerum* in Thailand based on ITS and RAPD analyses. *Apidologie*, **34**, 513–523.
- WILDE J. (2000a). How long can *Tropilaelaps clareae* survive on adult honeybee workers? In: Proceedings of the Euroconference on Molecular Mechanisms of Disease Tolerance in Honeybees (MOMEDITO), held in Kralupy near Prague, Czech Republic, 17–19 October 2000. Bee Research Institute, Dol, Czech Republic, 217–221.
- WILDE J. (2000b). *Varroa destructor* and *Tropilaelaps clareae* in *Apis mellifera* colonies in Nepal. In: Proceedings of the Euroconference on Molecular Mechanisms of Disease Tolerance in Honeybees (MOMEDITO), held in Kralupy near Prague, Czech Republic, 17–19 October 2000. Bee Research Institute, Dol, Czech Republic, 223–238.
- WOYKE J. (1987). Length of stay of the parasitic mite *Tropilaelaps clareae* outside sealed honeybee brood cells as a basis for its effective control. *J. Apic. Res.*, **26**, 104–109.

*

* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para las enfermedades de las abejas
(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 las enfermedades de las abejas, por favor contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 2004. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2018.