

Manual abreviado para el estudio de la nosemosis en *Apis mellifera*

Elaborado por integrantes del Grupo de Estandarización de Técnicas de la Sociedad Latinoamericana de Investigación en Abejas y RED CYTED COLMENA: Belén Branchiccela¹, Adriana Pacini², Daniela Arredondo¹, Melisa Garrido³, Martín Porrini³.

1. Departamento de Microbiología. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Av. Italia 3318. Montevideo, Uruguay.
2. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria EEA Rafaela, Santa Fe, Argentina.
3. Centro de Investigación en Abejas Sociales (CIAS). Instituto de Investigaciones en Producción Sanidad y Ambiente (IIPROSAM) CONICET-CIC-Universidad Nacional de Mar del Plata. Buenos Aires. Argentina.

Aclaración: Parte del material ha sido traducido y adaptado a partir del capítulo del manual de técnicas “Beebook”: “Métodos estándar para la investigación sobre *Nosema*”.

Autores: Ingemar Fries, Marie-Pierre Chauzat, Yan-Ping Chen, Vincent Doublet, Elke Genersch, Sebastian Gisder, Mariano Higes, Dino P McMahon, Raquel Martín-Hernández, Myrsini Natsopoulou, Robert J Paxton, Gina Tanner, Thomas C Webster and Geoffrey R Williams. Journal of Apicultural Research 52(1): (2013).



Resumen

Éste es un manual básico y práctico de estandarización de técnicas para el estudio a nivel de laboratorio y de campo de *Nosema* spp. Su objetivo es resumir las técnicas vinculadas al estudio de este microsporidio, que serán usadas en una primera instancia por los grupos de trabajo de SOLATINA. La selección de las mismas se realizó teniendo en cuenta 1) su practicidad al momento de ser aplicadas por la mayoría de los laboratorios vinculados a la investigación en abejas de Latinoamérica, 2) que los resultados obtenidos tras su aplicación sean fácilmente comparables entre laboratorios y que dicha comparación sea confiable, y 3) las actividades propuestas para los proyectos a corto plazo planteados en el marco del II Workshop de SOLATINA realizado en Montevideo, Uruguay en julio de 2018. Es por esto, que en esta primera versión del manual se incluyen técnicas que describen la toma de muestras a nivel de campo, traslado y conservación, determinación de niveles de infección y determinación de especies. A medida que se avance con las actividades y se obtenga experiencia en la implementación de estas técnicas a nivel de Latinoamérica, se espera que este manual vaya adaptándose, incorporando modificaciones y sumando nuevos abordajes metodológicos. Asimismo, en algunas secciones se incluyen conceptos básicos traducidos de forma prácticamente textual del capítulo del Beebook previamente mencionado. Todos los comentarios y aportes que puedan mejorar la calidad y utilidad de este manual pueden enviarse al mail solatina2017@gmail.com.

Contenido

1. Introducción.....	4
2. Métodos de trabajo en condiciones de campo	7
2.1. Infección a nivel colonial	7
2.1.1. Toma de muestras	7
2.1.2. Traslado y almacenamiento.....	8
2.1.3. Estandarización de ensayos de campo	8
3. Determinación del nivel de infección	9
3.1. Proporción de abejas individuales infectadas	9
3.2. Nivel de infección en pool de abejas.....	10
3.3. Análisis microscópico con cámara de conteo	14
4. Identificación de especies de <i>Nosema</i>	14
5. Bibliografía	17

1. Introducción

Desde la descripción de *Nosema apis* en la primera parte del siglo pasado (Zander, 1909), la enfermedad de Nosemosis de las abejas ha sido considerada como un obstáculo serio para la apicultura en climas templados (Fries, 1993). Con la detección del nuevo parásito *Nosema ceranae* en abejas europeas (Higes et al., 2006), originalmente descrito a partir de la abeja asiática *Apis cerana* (Fries et al., 1996), la necesidad de investigación en este campo se ha vuelto urgente. En particular, los primeros informes sobre los efectos de este nuevo parásito sugieren un impacto más grave en la salud de las colonias en comparación con las infecciones por *N. apis* (Higes et al., 2008a). Luego del taller COLOSS “Enfermedad de *Nosema*: falta de conocimiento y estandarización del trabajo” en Guadalajara (19-22 de octubre de 2009), se recopilaron datos sobre la heterogeneidad de los métodos utilizados en la investigación de *Nosema* en diferentes laboratorios de Europa y Estados Unidos. Esta encuesta mostró las condiciones experimentales ampliamente heterogéneas aplicadas en los nueve laboratorios participantes.

Nosema apis, el histórico parásito microsporidio de las abejas melíferas europeas, puede disminuir la longevidad de las obreras y causar pérdidas considerables en la colonia en invierno (Fries, 1993). Los efectos de las infecciones por *N. apis* en las colonias de abejas han sido ampliamente documentados (Fries, 1993). Esta enfermedad se caracteriza (en formas agudas) por temblores en las abejas o abejas muertas alrededor de la colmena. Las abejas también pueden exhibir el abdomen dilatado y a menudo se encuentran marcas fecales de color marrón en los cuadros y en la parte frontal de las colmenas. Además, las colonias muy infectadas tienen una disminución en la producción de crías y un crecimiento lento, particularmente en primavera (Bailey, 1955; OIE, 2008). Aunque *N. apis* está correlacionada con la mortalidad invernal de las colonias infectadas, la enfermedad también aparece sin causar pérdidas de colonias (Bailey, 1955).

Se cree que *N. ceranae* se introdujo en las últimas décadas desde *A. cerana* hacia las abejas europeas (Higes et al., 2006; Martín-Hernández et al., 2007; Klee et al., 2007; Paxton et al., 2007; Chen et al., 2008; Williams et al., 2008; Invernizzi et al., 2009; Currie et al., 2010; Botías et al., 2011). Se ha descrito que los síntomas a nivel de colonias producidos por infecciones con *N. ceranae* son diferentes de *N. apis* (Higes et al., 2008; 2009). En el sur de Europa se ha observado un despoblamiento gradual de abejas adultas, una mayor mortalidad en las colonias de otoño / invierno y, finalmente, se ha encontrado la reina rodeada de abejas jóvenes (Higes et al., 2006; 2008; 2009), mientras que tales síntomas o efectos graves no se han observado en otras regiones de climas

templados (Gisder et al., 2010a) ni en Sudamérica (Invernizzi et al., 2009) o Norte América (Williams et al., 2011; Guzman-Novoa et al., 2010). Posiblemente, las diferencias en las subespecies de abejas melíferas, las condiciones de forrajeo, las prácticas agrícolas, las diferencias en las prácticas de manejo de la colmena u otros factores abióticos o bióticos pueden contribuir a la variación en los síntomas descritos para las infecciones por *N. ceranae* en diferentes regiones del mundo. Debido a que la detección de *N. ceranae* en las abejas melíferas europeas coincidió con las pérdidas a gran escala de colonias de abejas en todo el mundo, los datos sobre la patología y el manejo de este parásito son de gran interés.

La dinámica temporal de las infecciones por *N. apis* en climas templados ha sido descrita por muchos autores (White, 1919; Borchert, 1928; Michailoff, 1928; Bailey, 1955; Furgala y Hyser, 1969; Furgala y Mussen, 1978), con un patrón similar en los hemisferios norte y sur (Doull y Cellier, 1961). En resumen, la infección típica exhibe una baja prevalencia durante el verano, un pequeño pico en el otoño y un lento aumento de la infección durante el invierno. En la primavera, las infecciones aumentan rápidamente, mientras que las posibilidades de vuelo aún son limitadas. Hay pocos datos sobre la dinámica temporal de las infecciones por *N. apis* en climas tropicales o subtropicales, pero la infección parece estar presente con un bajo impacto en la aptitud de la colonia (Wilson y Nunamaker, 1983) y probablemente sin la dinámica temporal pronunciada observada en climas templados (Fries et al., 2003). Para *N. ceranae*, se han realizado pocos estudios a largo plazo sobre la dinámica temporal de esta infección en colonias de abejas. Los estudios del centro de España sugieren una variación mucho menor en la prevalencia de la infección durante la temporada de *N. ceranae* en comparación con lo que se ha descrito para *N. apis* (Higes et al., 2008a). Sin embargo, se ha documentado un claro efecto estacional en la prevalencia de la enfermedad, con una mayor prevalencia y niveles de infección al inicio de la temporada en el este de EE. UU. (Traver y Fell, 2011; Traver et al., 2012) y en colonias no tratadas de Canadá (Williams et al. al., 2010; 2011). Existe una necesidad urgente de estudios a largo plazo de la dinámica temporal de las infecciones por *N. ceranae* en diferentes condiciones climáticas. A nivel de Sudamérica, existen datos publicados de la presencia y distribución de ambos microsporidios infectando la abeja *A. mellifera* en Chile, Uruguay, Argentina, Venezuela y Brasil. En estos países, *N. ceranae* es el microsporidio predominante o el único detectado en las muestras analizadas (Klee et al., 2007; Medici et al., 2011; Sarlo et al., 2011; Mariani et al., 2012; Martínez et al., 2012; Rodríguez et al., 2012; Santos et al., 2014; Antúnez et al., 2015; Anido et al., 2016; Pacini et al., 2016, Porrini et al., 2017; Guimarães-Cestaro et al., 2017; Teixeira et al., 2018). También se ha reportado la presencia de este microsporidio en especies de la tribu meliponini (Porrini et al., 2017). En

Uruguay, *N. ceranae* tiene una variación estacional tanto a nivel de prevalencia como intensidad de infección, muy similar a la descripta para el hemisferio norte (Antúnez et al., 2015), mientras que en Argentina, la prevalencia anual en los apíarios productivos así como las curvas de esporulación son variables dependiendo de la ecorregión que se estudie (Pacini et al., 2016, Porrini et al., datos no publicados).

Para realizar estudios tendientes a analizar los efectos del parásito en el campo con colonias de tamaño completo, se deben hacer varias consideraciones, como dónde muestrear, con qué frecuencia muestrear y también el tamaño de las muestras. Encontramos, por ejemplo, que los tamaños de muestra a menudo son demasiado pequeños para satisfacer un nivel de precisión diagnóstica estadísticamente razonable (Fries et al., 1984).

De manera similar, las pruebas de laboratorio que utilizan abejas en jaulas, a menudo se emplean para investigar el desarrollo intra-hospedador de *Nosema*(ej., Higes et al., 2007; 2010; Martín-Hernández et al., 2009; Forsgren and Fries, 2010), los efectos del parásito en el hospedador; mortalidad (ej., Paxton et al., 2007), inmunidad (ej., Antúnez et al., 2009) y fisiología (ej., Dussaubat et al., 2010; Mayack y Naug, 2009; Martín-Hernández et al., 2011), como así también, para probar la eficacia de los posibles tratamientos de control (ej., Maistrello et al., 2008; Higes et al., 2011). Al diseñar experimentos en jaulas, los investigadores generalmente deben controlar una serie de variables, desde la selección de los sujetos de estudio (ej., parásitos y cepas huésped) hasta el entorno experimental (ej., condiciones de la cámara de cría, calidad y cantidad de alimentos). Aunque las decisiones generalmente no ponen en peligro el rigor científico de un estudio, pueden afectar profundamente los resultados y dificultar las comparaciones con estudios similares e independientes. Una consideración importante es que la mayoría de los datos actuales sobre *Nosema* obtuvieron de experimentos con *N. apis*. Ahora se necesita la misma investigación para *N. ceranae* con el fin de evaluar las similitudes y diferencias entre las dos especies. Aquí discutimos algunos factores importantes que los investigadores deben tener en cuenta al estudiar el sistema *Nosema*-abeja utilizando experimentos de campo y de laboratorio.

2. Métodos de trabajo en condiciones de campo

2.1. Infección a nivel colonial

El grado de infección de *Nosema* spp. en una colonia se ha descrito más comúnmente a través del número promedio de esporas por abeja en una muestra combinada (pool de abejas) (Cantwell, 1970; OIE, 2008). Sin embargo, algunos estudios sugieren que la mejor manera de determinar el grado de infección es estimar la proporción de abejas infectadas en la colonia (L'Arrivee, 1963; Doull, 1965; Higes et al., 2008a; Botías et al., 2012a). Existe una buena correlación entre la proporción de abejas infectadas y el número promedio de esporas en un pool de abejas (Fries et al., 1984), pero no en todos los casos (Higes et al., 2008a). Evaluar la proporción de abejas infectadas es más laborioso que contar el número de esporas en una muestra en pool, por lo que el muestreo en pool probablemente seguirá siendo una herramienta importante para cuantificar las infecciones en colonias. Debido a que existe una amplia variación en el número de esporas encontradas en abejas individuales en muestras en pool, cuando se necesita una mayor precisión, aún puede ser motivador investigar la proporción de abejas infectadas. La mayor proporción de abejas infectadas se encuentra en las abejas pecoreadoras (Higes et al., 2008a, b; Botías et al., 2012a, b; Meana et al., 2010; Smart y Sheppard, 2011), ya que son las abejas donde el microsporidio ha alcanzado una mayor explosión en su ciclo infectivo (El-Shemy y Pickard, 1989). Sin embargo, estudios recientes sugieren también la importancia de determinar la proporción de abejas nodrizas infectadas para establecer la viabilidad y el impacto de la infección en las colonias (Botías et al., 2012a).

2.1.1. Toma de muestras

Para el diagnóstico y la detección de colonias infectadas con *Nosemaspp.*, las abejas melíferas más longevas deben ser la población objetivo (Meana et al., 2010; Smart y Sheppard, 2011). Las abejas pecoreadoras pueden ser muestreadas en la entrada de la colmena. Para esto, tapar la piquera (por ejemplo con polifón, gomaespuma etc), esperar a que las abejas pecoreadoras se acumulen en la entrada y tomar la muestra utilizando un frasco, con aspiradora o pinza. Con el objetivo de evitar tomar muestras de abejas jóvenes realizando vuelos de reconocimiento o higiénicos, evitar las primeras horas de la mañana. Un aspecto importante a tener en cuenta, es no interferir en la llegada de las abejas a las colonias ya que es muy común que se produzca deriva de abejas. Por lo tanto, colocar el material “tapa piquera” y retirarse hasta el momento de la toma de la muestra.

Durante condiciones de escaso vuelo o ausencia del mismo (días fríos o lluviosos), las abejas de mayor edad aún deben ser la población objetivo para el diagnóstico: para evitar el muestreo de abejas recién emergidas, comúnmente no infectadas, las muestras deben tomarse de los cuadros periféricos al área de cría, o en las alzas melarias.

A tener en cuenta: en estudios longitudinales o cuando se debe monitorear muchas colmenas, procurar realizar los muestreos siempre en el mismo período del día (ej. mediodía, tarde), y el mismo tipo de muestra (pecoreadoras o de cuadros periféricos al nido de cría) de forma que los resultados sean comparables. No reutilizar frascos a menos que los mismos sean esterilizados y correctamente higienizados.

2.1.2. Traslado y almacenamiento

Una vez que las muestras son tomadas, trasladarlas inmediatamente al laboratorio. Se pueden almacenar en el congelador (-20°C) o en etanol y frío (4°C en la medida de lo posible) hasta su posterior procesamiento.

2.1.3. Estandarización de ensayos de campo

2.1.3.1. Selección de colonias

Uno de los problemas principales al momento de diseñar ensayos en campo con colonias de abejas, es la gran variación natural en tamaño, productividad o comportamiento que existe entre ellas. Por lo tanto, en estos casos, es aconsejable minimizar tales variaciones y, si se espera una variación considerable, aumentar el número de colonias involucradas. Algunas recomendaciones para tener en cuenta en los diseños experimentales:

- Siempre tratar de utilizar colonias con reinas de la misma edad y en lo posible reinas hermanas. En caso de que esto no sea posible, registrar la edad de la reina.
- Considerar el estado general de las colmenas mediante la estandarización, utilizando la fortaleza: cuadros con abeja, cría, polen y miel.

2.1.3.2. Parámetros para registrar

El tipo de datos que se recopilarán durante los experimentos de campo variará según el objetivo del estudio. Los estudios de campo a menudo implican la observación de colonias y el desarrollo de enfermedades en relación con diferentes tratamientos o prácticas de manejo. Por lo tanto, es recomendable informar siempre sobre ciertos parámetros estándar, si es posible, para la interpretación de los datos. Tales parámetros incluyen:

- Mortalidad dentro de la colmena (trampas para abejas muertas; ver el documento BEEBOOK sobre métodos misceláneos (Human et al., 2013))
- Tamaño de las colonias y dinámica de la población (número de abejas y cantidad de cría, ver el documento elaborado por SOLATINA para la estandarización de estas técnicas basado en el capítulo del Beebook sobre estimación de la fortaleza de la colonia (Delaplane et al., 2013))
- Signos clínicos de cualquier enfermedad.
- Producción de miel.
- Condiciones climáticas durante el experimento.
- Subespecies de abejas utilizadas.
- Prácticas de manejo específicas.

3. Determinación del nivel de infección

3.1. Proporción de abejas individuales infectadas

Para la determinación de la proporción de abejas infectadas se utilizarán 30 abejas por colmena.

1. Colocar un abdomen por abeja por tubo conteniendo 500 ul de agua destilada estéril.
2. Homogeneizar con varilla al menos con 10 presiones circulares. Asegurarse que todo el contenido abdominal sea liberado y los tejidos disociados. Si el volumen del tubo no permite agregar 500ul porque al introducir la varilla el volumen se desborda, colocar menos volumen, por ejemplo 200ul, luego de homogeneizado completar el volumen restante hasta llegar a los 500ul, y mezclar bien la suspensión. El material de la

varilla es un factor importante a tener en cuenta para evitar contaminación entre muestras. Existen varillas de vidrio cuya superficie es menos rugosa, pero también pueden ser varillas de plástico o madera. Para asegurar que no hay contaminación, realizar controles cada 5 muestras en los cuales se coloca el agua pero no se coloca la abeja, y se introduce la varilla haciendo el procedimiento normal, para luego chequear la presencia de esporas en el microscopio. En la medida de lo posible, esterilizar las varillas entre muestras o al menos una vez que se cambia de tratamiento.

3. Tomar 10ul (una gota) del homogeneizado y colocarlo en un portaobjetos. Cubrir con cubreobjetos.
4. Observar mediante microscopía óptica 400X la presencia/ausencia de esporas en 10 campos. Una vez que se encuentra una espora, el resultado de la muestra es positivo. Si al finalizar 10 campos de observación, no se encuentran esporas, la muestra es negativa.
5. Repetir el procedimiento con las restantes 29 abejas de la muestra.

3.2. Nivel de infección en *pool* de abejas

Los materiales necesarios se presentan en la figura 1.

- a. Procedimiento para el triturado: Descarte el conservante de la muestra mediante el uso de un colador/filtro permitiendo que escurra o colocándolo sobre un papel absorbente. Es importante descartar todo el líquido sin presionar la muestra para evitar pérdida de contenido intestinal.
- b. Separe el tórax del abdomen de 60 abejas, teniendo presente no comprimir el abdomen (Fig. 2).
- c. Prepare un contenedor con 1ml de agua (destilada o agua corriente) por cada abeja que haya procesado. Si se alcanzó a colectar 60 abejas para el análisis, el contenedor se preparará con 60ml.
- d. Triture en mortero los Abdómenes, durante dos minutos, hasta alcanzar una pasta homogénea en la cual no puedan distinguirse estructuras de tejido particulares y asegúrese que el contenido intestinal esté completamente liberado y las carcasas abdominales completamente disociadas. Se recomienda iniciar el triturado con una mínima cantidad de agua (esta cantidad se tomará del volumen destinado al análisis) y utilizar

un mortero con capacidad no menor a 200ml y un pilón grande para reducir el tiempo de trabajo (Fig. 1).

- e. Agregue al material procesado 20ml de agua limpia (esta cantidad se tomará del volumen destinado al análisis) y continúe el triturado.
- f. Filtre el homogeneizado a un recipiente rotulado, de manera de retener solo los restos de tejido más grandes. Se recomienda utilizar un doble filtro incorporando a continuación de un colador común metálico, uno de acero inoxidable de malla fina (similar a los utilizados para colar té) (Fig. 2).
- g. Agregue el volumen restante (aprox. 40ml) al mortero y resuspenda el tejido remanente ayudándose con el pilón. Luego, vuelque el contenido final a través del filtro doble, corroborando que no queden restos en el mortero y lavando el pilón con el mismo movimiento de líquido. Con el pilón, comprima suavemente contra el filtro grueso la totalidad de los restos de tejido (Fig. 2).



Figura 1. Material necesario para el procesamiento. 1. Mortero con pilón. 2. Filtros/coladores de malla metálica. 3. Filtros acoplados. 4. Contador manual para facilitar el recuento de esporas en microscopio.

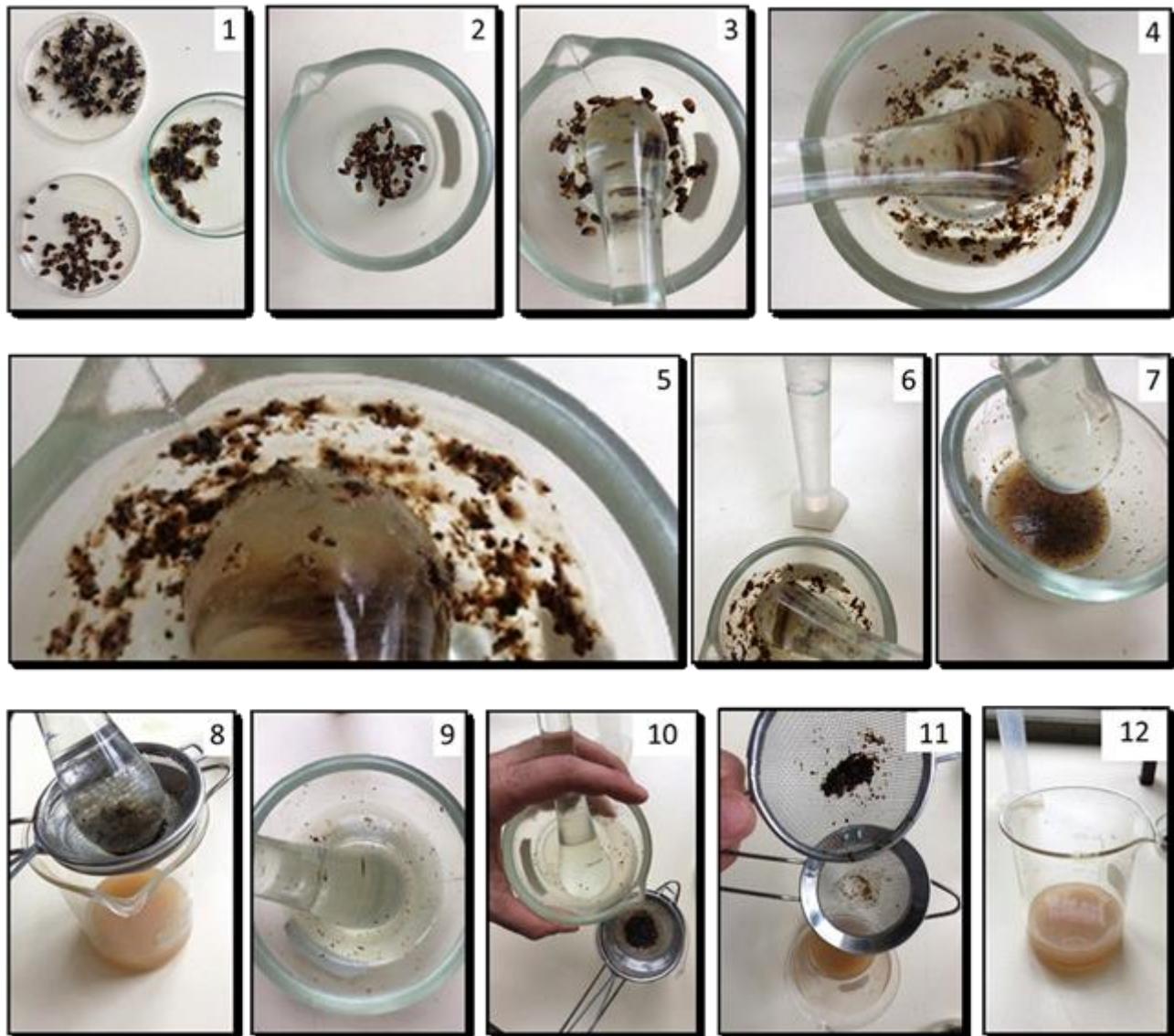


Figura 2. Etapas de trituración para obtención de la muestra. 1-3. Sección de 60 abdomenes 4-6. Inicio de trituración en seco hasta obtener pasta de fragmentos de tamaño homogéneo. 7. Agregado de una parte del volumen de líquido y continuación del triturado. 8. Primer filtrado del tejido triturado con los filtros acoplados. 9-12. Resuspensión, lavado y filtrado final del material remanente en mortero y pilón para la obtención de la muestra en el volumen final de 60 ml.

3.3. Análisis microscópico con cámara de conteo

- a) Tomar 10ul de lhomogeneizado por duplicado y colocar en hemocitómetro o cámara de Neubauer. Esperar a que las esporas se asienten. Visualice las características y dimensiones de la cámara de conteo en el siguiente link <https://en.wikipedia.org/wiki/Hemocytometer>
- b) Realizar la cuantificación del número de esporas en la muestra mediante microscopía óptica 400X BEEBOOK (Cantwell, 1970; Human et al., 2013).

4. Identificación de especies de *Nosema*

Para la caracterización de las especies de *N. apis*, *N. ceranae* y *N. bombi* existen protocolos basados tanto en microscopía como técnicas moleculares. Teniendo en cuenta las ventajas y desventajas de estos abordajes y con el objetivo de que se ejecuten de forma independiente del técnico y de forma estandarizada, a nivel de los proyectos de SOLATINA se utilizarán técnicas moleculares.

Dentro de las ventajas que se destacan de las técnicas moleculares son su sensibilidad. Además, estas técnicas permiten detectar tanto esporas como formas vegetativas de *Nosema*, lo cual a nivel de microscopía no es posible.

Las técnicas moleculares desarrolladas para la detección de *Nosemaspp.*, en abejas son en general basadas en PCR (PCR convencional uniplex o multiplex, PCR-RFLP, PCR cuantitativo, etc) y existe una amplia variedad de *primers* específicos para la detección de *N. apis*, *N. ceranae* y *N. bombi* en la literatura (ver tabla adjunta tomada del capítulo del Beebook). Estudios previos han demostrado que los *primers* detallados en esta tabla tienen diferencias en cuanto a su especificidad y límite de detección (Erler et al., 2011). Además, el uso de distintos métodos moleculares o condiciones entre los distintos laboratorios puede llevar a inconsistencias. Por esta razón, se recomienda la optimización y ajuste de los protocolos de screening basados en PCR de acuerdo a las condiciones de los distintos laboratorios, objetivos de investigación y preguntas. Además, para permitir comparaciones entre laboratorios, es recomendable el análisis de homogenados de las mismas abejas infectadas por los distintos laboratorios, para evaluar diferencias en sensibilidad o establecer un umbral de sensibilidad de detección. Éste es un aspecto importante a abordar a nivel de SOLATINA y tendría que ser realizado en un futuro cercano.

Tabla 1. Lista de juegos de primers disponibles para la detección de *Nosemaspp* en abejas mediante PCR.

Nombre	Referencia	Secuencia del Primer (5'-3')		locus	uso	Tamaño esperado del fragmento (bp)		
						N.a.	N.b	N.c.
218MITOC	Martín-Hernández et al. 2007	fwd rev	CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA CCCGGTCAATTCTCAAACAAAAACCG	SSU rRNA	qPCR			218-219
321APIS	Martín-Hernández et al. 2007	fwd rev	GGGGGCATGTCTTGACGTACTATGTA GGGGGGCGTTAAAATGTGAAACAACTATG	SSU rRNA	qPCR	321		
BOMBICAR	Plischuket al. 2009	fwd rev	GCCCCATGCATGTTTGAAGATTATTAT CTACACTTAAACGTAGTTATCTGCGG	SSU rRNA	PCR		101	
ITS	Klee et al. 2006	fwd rev	GATATAAGTCGTAACATGGTTGCT CATCGTTATGGTATCCTATTGATC	ITS region	PCR	120	120	120
N.b.a	Erleret al. 2011	fwd rev	TGCGGCTTAATTGACTC GGTAATGACATACAAACAAAC		SSU rRNA/ITS	PCR	511	
Nbombi-SSU-J	Klee et al. 2006	fwd rev	CCATGCATGTTTGAAGATTATTAT CATATATTAAATATGAAACAATAA	SSU rRNA	PCR		323	
NOS	Higeset al. 2006	fwd rev	TGCCGACGATGTGATATGAG CACAGCATCCATTGAAACG	SSU rRNA	PCR	240		252
NosA	Webster et al. 2004	fwd rev	CCGACGATGTGATATGAGATG CACTATTATCATCCTCAGATCATA	SSU rRNA	PCR	209		
SSU-res	Klee et al. 2007	fwd rev	GCCTGACGTAGACGCTATT GTATTACCGCGGCTGCTGG	SSU rRNA	PCR	402	402	402
NaFor	Forsgren and Fries 2010	fwd(a)	CTAGTATTTGAATATTGTTACAATGG ^b	LSU rRNA	qPCR	278		
NcFor		fwd (c)	TATTGTAGAGAGGTGGGAGATT					316
UnivRev		Urev	GTCGCTATGATCGCTTGCC					
Nosema	Chen et al. 2008	fwd rev	GGCAGTTATGGGAAGTAACA GGTCGTCACATTCATCTCT	SSU-rRNA	generic	208		212
N. ceranae	Chen et al. 2008	fwd rev	CGGATAAAAGAGTCCGTTACC TGAGCAGGGTTCTAGGGAT	SSU-rRNA	PCR			250 ^a
N. apis	Chen et al. 2008	fwd rev	CCATTGCCGGATAAGAGAGT CACGCATTGCTGCATCATTGAC	SSU-rRNA	PCR	401 ^a		
Nos-16S	Stevanovicet al. 2011	fwd rev	CGTAGACGCTATCCCTAACGATT CTCCCAACTATACAGTACACCTCATA	SSU rRNA	PCR	488		488
Mnceranae-F	Beebook	fwd	CGTAAAGTGTAGATAAGATGTT	SSU rRNA	PCR			
Mnapis-F		fwd	GCATGTCTTGACGTACTATG					143
Mnbombi-F		fwd	TTTATTTATGTRYACMGCA				171	
Muniv-R		Urev	GACTTAGTAGCCGTCTCTC			224		
SSUrRNA-f1b	Tayet al 2005	Ufwd	CACCAAGGTTGATTCTGCCT	SSU rRNA	generic		ca.	
SSUrRNA-r1b		Urev	TGTCGTCAGTCAGGGTCGTCA					

Teniendo en cuenta la experiencia de algunos laboratorios, la especificidad y eficiencia de los *primers* reportada y su uso, en una primera instancia a nivel de SOLATINA, recomendaremos el uso de los *primers* descritos por Martín-Hernández et al., 2007 que permiten la amplificación simultánea de dos fragmentos del ADNr 16S de *N. apis* y *N. ceranae*, siguiendo el protocolo publicado por estos autores con modificaciones menores.

Dicho protocolo se detalla de forma resumida:

Preparar la mezcla de reacción en un volumen final de 25 ul:

- 3 mM MgCl₂
- 0,4 uM primer *N. apis* F
- 0,4 uM primer *N. apis* R
- 0,4 uM primer *N. ceranae* F
- 0,4 uM primer *N. ceranae* R
- 0,4 uM dNTPs
- 1U Taq polymerasa
- 1X Buffer
- 2,5 ul ADN
- Completar el volumen final de 25 ul con agua para PCR

Programa de ciclado:

- 1 min a 94°C
- 10 ciclos de 15 seg a 94°C
- 30 seg a 61,8°C
- 45 seg a 72°C
- 20 ciclos de 15 seg a 94°C
- 30 seg a 61,8°C
- 50 seg a 72°C aumentando 5 seg por ciclo
- 7 min a 72°C

Analizar los productos obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

El tamaño esperado del producto correspondiente a *N. apis* es de 320 pb y a *N. ceranae* es de 218 pb.

5. Bibliografía

- ANTÚNEZ K; ANIDO M; NRANCHICCELA B; HARRIET J; CAMPÁ J; INVERNIZZI C; SANTOS E; HIGES M; MARTÍN-HERNÁNDEZ R; ZUNINO P. (2015) Seasonal Variation of Honeybee Pathogens and its Associationwith Pollen Diversity in Uruguay. *Microbial Ecology*. ;70(2):522-533.
- ANIDO M; BRANCHICCELA B; CASTELLI L; HARRIET J; CAMPÁ J; ZUNINO P; ANTÚNEZ K. (2016) Prevalence and distribution of honey bee pests and pathogens in Uruguay. *Journal of Apicultural Research*. 54 (5):532–540.
- ANTÚNEZ K; MARTIN-HERNANDEZ R; PRIETO L; MEANA A; ZUNINO P; HIGES M (2009).Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology* 11(9): 2284-2290.
- BAILEY L (1955). The epidemiology and control of *Nosema* disease of the honey-bee. *Annals of Applied Biology*. 43(1-2): 379-389.
- FRIES I; EKBOHM G; VILLUMSTAD E (1984) *Nosema apis*, sampling techniques and honey yield. *Journal of ApiculturalResearch* 23(2): 102-105.
- BOTÍAS C; MARTÍN-HERNÁNDEZ R; DIAS J; GARCÍA-PALENCIA P; MATABUENA M; JUARRANZ A; BARRIOS L; MEANA A; NANETTI A; HIGES M (2012a). The effect of induced queen replacement on *Nosema* spp. infection in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environmental Microbiology* 14(4): 845-859.
- BOTÍASC; MARTÍN-HERNÁNDEZ R; BARRIOS L; GARRIDO-BAILÓN E; NANETTI A; MEANA A; HIGES M (2012b).*Nosemaspp.* parasitization decreases the effectiveness of acaricide strips (Apivar®) in treating varroosis of honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *EnvironmentalMicrobiologyReports* 4(1): 57-65.
- BOTÍAS C; MARTÍN-HERNÁNDEZ R; GARRIDO-BAILÓN E; GONZÁLEZ PORTO A, MARTÍNEZ-SALVADOR A, DE LA RÚA P, MEANA A; HIGES M (2011).The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Research in Veterinary Sciences* 93(1): 150-155.
- CANTWELL GE (1970).Standard methods for counting *Nosema* spores. *American Bee Journal* 110(6): 222-223.
- CHEN Y; EVANS JD; SMITH IB; PETTIS JS. (2008). *Nosema ceranae* is a long-present and widespread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology* 97(2): 186-188.
- CURRIE RW; PERNAL SF; GUZMAN-NOVOA E (2010).Honey bee colony losses in Canada. *Journal of Apicultural Research* 49(1): 104-106.
- DELAPLANE KS; VAN DER STEEN J; GUZMAN E (2013).Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. In V Dietemann; JD Ellis; P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK*, Volume I: standard methods for *Apis mellifera*

research . Journal of Apicultural Research 52(1):
<http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.03>.

DOULL KM (1965). The effects of time of day and method of sampling on the determination of *Nosema* disease in bee hives. *Journal of Invertebrate Pathology* 7(1): 1-4.

DOULL KM, CELLIER KM (1961). A survey of the incidence of *Nosema* disease (*Nosema apis* Zander) in honey bees in South Australia. *Journal of Insect Pathology* 3(3): 280-288.

DUSSAUBAT C; MAISONNASSE A; ALAUX C; TCHAMITCHAN S; BRUNET JL; PLETTNER E; BELZUNES LP; LE CONTE Y (2010). *Nosema* spp. Infection alters pheromone production in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Chemical Ecology* 36(5): 522-525.

EL-SHEMY AAM; PICKARD RS (1989). *Nosema apis* Zander infection levels in honey bees of known age. *Journal of Apicultural Research* 28(2): 101-106.

ERLER S; LOMMATZSCH S; LATTORFF H (2012). Comparative analysis of detection limits and specificity of molecular diagnostic markers for three pathogens (Microsporidia, *Nosema* spp.) in the key pollinators *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Parasitology Research* 110(4): 1403–1410.

FORSGREN E; FRIES I (2010). Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary Parasitology* 170(3-4): 212-217.

FRIES I (1993) *Nosemaapis* - a parasite in the honey bee colony. *Bee World* 74(1): 5–19.

FRIES I; FENG F; SILVA A; DA SLEMENDA SB; PIENIAZEK NJ (1996). *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, *Nosematidae*), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology* 32(3): 356-365.

FURGALA B; HYSER RA (1969). Minnesota *Nosema* survey. *American Bee Journal* 109(12): 460-461.

FURGALA B; MUSSEN EC (1978). Protozoa. In Morse, R A; Nowogrodzki, R (Eds) Honey bee pests, predators, and diseases. Cornell University Press; Ithaca, USA. pp. 48-63.

GISDER S; HEDTKE K; MÖCKEL N; FRIELITZ MC; LINDE A; GENERSCH E (2010). Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Applied and Environmental Microbiology* 76(9): 3032-3038.

GUIMARAES-CESTAROL L; SERRAO J. E; ALVES TELES MARQUES M. L; MESSAGE D; TEXEIRA E. W. (2017). A scientific note on occurrence of pathogens in

colonies of honeybee *Apis mellifera* in Vale do Ribeira, Brazil. Apidologie, Springer Verlag, 48 (3): 384-386.

GUZMAN-NOVOA E; CORREA-BENITEZ A; ECCLES L; CALVETE Y; MCGOWAN J; KELLY PG (2010). *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. Apidologie. 41(4): 443-450.

HIGES M; GARCÍA-PALENCIA P; BOTÍAS C; MEANA A; MARTÍNHERNÁNDEZ R (2010).The differential development of microsporidia infecting worker honey bee (*Apis mellifera*) at increasing incubation temperature. Environmental and Microbiology Reports 2(6): 745-748.

HIGES M; GARCÍA-PALENCIA P; MARTÍN-HERNÁNDEZ R; MEANA A (2007).Experimental infection of *Apis mellifera* honey bees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). Journal of Invertebrate Pathology. 94(3): 211-217.

HIGES M; MARTIN-HERNANDEZ R; BOTIAS C; BAILON EG; GONZALES-PORTO AV; BARRIOS L; DEL NOZAL MJ; BERNAL JL; JIMENEZ JJ; PALENCIA PG; MEANA A (2008a).How natural infection by *Nosema ceranae* causes honey bee colony collapse. Environmental Microbiology 10(10): 2659–2669.

HIGES M; MARTÍN-HERNÁNDEZ R; GARRIDO-BAILÓN E; GARCÍAPALENCIA P; MEANA A (2008b).Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honey bees. Journal of Invertebrate Pathology 97(1): 76-78.

HIGES M; MARTIN-HERNANDEZ R; MEANA A (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honey bees in Europe. Journal of Invertebrate Pathology 92(2): 93-95.

HIGES M; NOZAL MJ; ALVARO A; BARRIOS L; MEANA A; MARTIN HERNANDEZ R; BERNAL JL; BERNAL J (2011).The stability and effectiveness of fumagillin in controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) infection in honey bees (*Apis mellifera*) under laboratory and field conditions. Apidologie 42(4): 364-377

HIGES M; PILAR GP; MARTIN-HERNANDEZ R; ARANZAZU M (2007).Experimental infection of *Apis mellifera* honey bees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). Journal of Invertebrate Pathology 94(3): 211-217.

HUMAN H; BRODSCHNEIDER R; DIETEMANN V; DIVELY G; ELLIS J; FORSGREN E; FRIES I; HATJINA F; HU F-L; JAFFÉ R; KÖHLER A; PIRK CWW; ROSE R; STRAUSS U; TANNER G; VAN DER STEEN JJM; VEJSNÆS F; WILLIAMS GR; ZHENG H-Q (2013). Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK , Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research . Journal of Apicultural Research 52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.10>.

INVERNIZZI C; ABUD C; TOMASCO IH; HARRIET J; RAMALLO G; CAMPA J; KATZ H; GARDIOL G; MENDOZA Y (2009). Presence of *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) in Uruguay. Journal of Invertebrate Pathology 101(2): 150-153.

KLEE J; TAY WT; PAXTON RJ (2006). Specific and sensitive detection of *Nosema bombi* (Microsporidia :*Nosematidae*) in bumble bees (*Bombus* spp.; Hymenoptera : Apidae) by PCR of partial rRNA gene sequences. Journal of Invertebrate Pathology 91(2): 98-104.

KLEE J; BESABA AM; GENERSCH E; GISDER S; NANETTI A; TAM DQ; ... PAXTON RJ (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee. Journal of Invertebrate Pathology, 96, 1–10.

L'ARRIVEE JCM (1963). Comparison of composite versus individual bee sampling for *Nosema apis* Zander. Journal of Insect Pathology 5(4): 349-355.

MAISTRELLA L; LODESANI M; COSTA C; LEONARDI F; MARANI G; CALDON M; MUTINELLI F; GRANATO A (2008). Screening of natural compounds for the control of *Nosema* disease in honey bees. Apidologie 39(4): 436-445.

MARIANI F.; MAGGI M; PORRINI M; RUFFINENGO S; DAMIANI N; FUSELLI S; EGUARAS M. (2012). Parasitic interactions between *Nosema* spp. and *Varroa destructor* in *Apis mellifera* colonies. Revista Zootecnia Tropical. 30 (2).

MARTÍN-HERNÁNDEZ R; MEANA A; PRIETO L; MARTINEZ SALVADOR A; GARRIDO-BAILÓN E; HIGES M (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. Applied and Environmental Microbiology 73(20): 6331-6338.

MAYACK C; NAUG D (2009). Energetic stress in the honey bee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. Journal of Invertebrate Pathology 100(3): 185-188.

MEANA A; MARTÍN-HERNÁNDEZ R; HIGES M (2010). The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. Journal of Apicultural Research 49(2): 212-214.

MEDICI SK; SARLO EG.; PORRINI MP; BRAUNSTEIN M; EGUARAS MJ.(2011). Genetic variation and widespread dispersal of *Nosemaceranae* in *Apis mellifera* colonies of Argentina. Parasitology Research. DOI10.1007/s00436-011-2566-2

MICHAILOFF AS (1928). Statistische Untersuchungenüber *Nosemaan* der Tulaer Versuchsstation für Bienenzucht. Archive für Bienenkunde 9: 89-114.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) (2008). Nosemosis of honey bees.[WWW document].URL http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.02.04_NOSEMOSIS.pdf.

PACINI A; MIRA A; MOLINERI A; GIACOBINO A; BULACIO CAGNOLO N; AIGNASSE A; ZAGO L; IZAGUIRRE M; MERKE J; ORELLANO E; BERTOZZI E; PIETRONAVE H; RUSSO R; SCANNAPIECO A; LANZAVECCHIA S; SCHNITTGER L; SIGNORINI M.

(2016). Distribution and prevalence of *Nosema apis* and *N. ceranae* in temperate and subtropical eco-regions of Argentina. Journal of Invertebrate Pathology 141: 34-37.

PAXTON RJ; KLEE J; KORPELA S; FRIES I (2007). *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. Apidologie 38(6): 558-565.

PORRINI MP;PORRINI LP;GARRIDO PM; DE MELO E SILVA NETO C; PORRINI D;MULLER F; NUÑEZ L; FERNANDEZ IRIARTE P; EGUARAS M. (2017). *Nosema ceranae* in South American native stingless bees and social wasp. Microbial Ecology. 1-4.

PORRINI LP; PORRINI MP; GARRIDO PM; PRINCIPAL J; BARRIOS SUAREZ CJ; BIANCHI B; FERNANDEZ IRIARTE PJ; EGUARAS MJ. (2017). First identification of *Nosema ceranae* (Microsporidia) infecting *Apis mellifera* in Venezuela.Trabajo aceptado en prensa (JAS-00363-2016-03). Journal of Apicultural Science.

PORRINI MP; SARLO GE; GARRIDO PM. Protocolo de monitoreo y cuantificación esporular de *Nosema* spp. del Centro de Investigación en Abejas Sociales (Mar del Plata, Argentina).

SANTOS L. G; ALVES M. L. T. M. F.; MESSAGE D; PINTO F. A; SILVA M. V. G. B; TEXEIRA E. 2014. Honey Bee Health in Apiaries in the Vale do Paraíba, São Paulo State, Southeastern Brazil. Sociobiology 61(3): 307-312

SARLO EG; MEDICI SK; PORRINI MP; GARRIDO M; FLORIS I; EGUARAS MJ. (2011). Comparison between different fumagillin dosage and evaluation method in the apiary control of nosemosis type C. Redia-giornale di zoologia. 94: 39-44.

SMART MD; SHEPPARD WS.(2011). *Nosema ceranae* in age cohorts of the western honey bee (*Apis mellifera*). Journal of Invertebrate Pathology 109(1): 148-151.

TEIXEIRA E; DOS SANTOS I; SATTLER A; MESSAGE D; ALVES ML; MARTINS M; GRASSY-SELLA M; FRANCOY TM (2013). *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than 3 decades infecting Africanized honey bees. Journal of Invertebrate Pathology, 114, 250-254.

TRAVER BE; FELL RD (2011). Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia. Journal of Invertebrate Pathology 107(1): 43-49.

TEXEIRA E W. A. L; GUIMARAES-CESTARO M. L. T; MARQUES F; MESSAGE D; FONSECA M. M; FERNANDES PINTO DA LUZ C; SERRAO J. E. (2018). Spores of Paenibacillus larvae, Ascospaera apis, *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in bee products supervised by the Brazilian Federal Inspection Service, Revista Brasileira de Entomologia, 62:3,188-194.

TRAVER BE; FELL RD (2012). Low natural levels of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* queens. Journal of Invertebrate Pathology 110(3): 408-410.

WILSON WT; NUNAMAKER RA (1983). The incidence of *Nosema apis* in honey bees in Mexico. Bee World 64(3): 132-136.

WHITE GF (1919). *Nosema* disease. US Department of Agriculture Bulletin 780.

WILLIAMS GR; SHAFFER SHAFER ABA; ROGERS REL; SHUTLER D; STEWART DT (2008). First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. Journal of Invertebrate Pathology 97 (2): 189-192.

WILLIAMS GR; SHUTLER D; ROGERS REL (2010). Effects at Nearctic north-temperate latitudes of indoor versus outdoor overwintering on the microsporidium *Nosema ceranae* and western honey bees (*Apis mellifera*). Journal of Invertebrate Pathology 104(1): 4-7.

WILLIAMS GR; SHUTLER D; LITTLE CM; BURGHER-MACLELLAN KL; ROGERS REL (2011). The microsporidian *Nosema ceranae*, the antibiotic Fumagilin-B®, and western honey bee (*Apis mellifera*) colony strength. Apidologie 41(1): 15-22.

ZANDER E (1909). Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. Münchener Bienenzeitung 31, 196-204.