

**PRODUCCIÓN APÍCOLA
EN LA PROVINCIA DE RÍO NEGRO
CAMPAÑA SANITARIA APÍCOLA
TEMPORADA 2006-2007**

**SEGUNDO
INFORME PARCIAL**

**CFI
FUNBAPA
GOBIERNO DE LA PROVINCIA
DE RÍO NEGRO**

AUTORES

- Dr. Roberto Ignacio Espósito
- Ing. Héctor Mario Villegas Nigra
- Técnico Emilio Gagey

INSPECTORES

- Arturo Adolfo Messenger
- Damián Román
- Cristina Gómez
- Gustavo González
- Edgardo Ruiz
- Luís Alberto Traiz

RESPONSABLE LABORATORIO

- Técnica Cristina Holzmann (FUNBAPA Viedma)
- Ing. Claudia Stazionati (FUNBAPA Allen)
- Lic. Juan Carlos Esponda (Universidad Nacional del Comahue)

CONTENIDO

I - INTRODUCCIÓN

II – CAMPAÑA SANITARIA APÍCOLA TEMPORADA 2006-2007

1. Capacitación de los inspectores apícolas

2. Capacitación de los técnicos de los laboratorios responsables del análisis de las muestras

3. Instalación y equipamiento de los laboratorios en la Universidad Nacional del Comahue (Asentamiento Universitario Villa Regina) y en la Fundación Barrera Zoofitosanitaria Patagónica (FUN.BA.PA) en Allen y Viedma).

4. Difusión de los alcances de la campaña

5. Campaña sanitaria 2006-2007
 - 5.1. Procedimiento operativo para la inspección y toma de muestras.
 - 5.2. Los apiarios muestreados en la primavera 2006
 - 5.3. Resultados primavera 2006
 - 5.4. Los apiarios muestreados en el otoño 2007
 - 5.5. Resultados otoño 2007
 - 5.6. Entrega de libreta sanitaria

III – CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

IV - ANEXOS

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Epoca
1	Características de los apiarios inspeccionados en el valle inferior del Río Negro.	Primavera 2006
2	Características de los apiarios inspeccionados en el valle de Conesa.	Primavera 2006
3	Características de los apiarios inspeccionados en el valle de Río Colorado.	Primavera 2006
4	Características de los apiarios inspeccionados en el valle medio del Río Negro.	Primavera 2006
5	Características de los apiarios inspeccionados en el alto valle del Río Negro.	Primavera 2006
6	Características de los apiarios inspeccionados en zona Andina	Primavera 2006
7	Resultados diagnósticos varroasis en porcentaje de infestación	Primavera 2006
8	Resultados diagnósticos nosemosis en porcentaje de infestación.	Primavera 2006

9	Resultados diagnóstico loque americana	Primavera 2006
10	Resultados comparativos por valle irrigado de la provincia	Primavera 2006
11	Características de los apiarios inspeccionados en el valle inferior del Río Negro.	Otoño 2007
12	Características de los apiarios inspeccionados en el valle de Conesa.	Otoño 2007
13	Características de los apiarios inspeccionados en el valle de Río Colorado.	Otoño 2007
14	Características de los apiarios inspeccionados en el valle medio del Río Negro.	Otoño 2007
15	Características de los apiarios inspeccionados en el alto valle del Río Negro.	Otoño 2007
16	Resultados diagnósticos varroasis en porcentaje de infestación	Otoño 2007
17	Resultados diagnósticos nosemosis en porcentaje de infestación.	Otoño 2007

18	Porcentaje de apiarios con loque americana	Otoño 2007
19	Resultados diagnóstico loque americana	Otoño 2007
20	Resultados comparativos por valle irrigado de la provincia	Otoño 2007

I - INTRODUCCION

El objetivo del presente informe parcial es describir las principales actividades desarrolladas en la campaña sanitaria realizada durante agosto y diciembre de 2006 y entre marzo y mayo de 2007 en los principales valles irrigados de la Provincia de Río Negro.

Las actividades realizadas fueron la capacitación de los inspectores apícolas, la instalación y funcionamiento de los laboratorios en la Universidad Nacional del Comahue y en la Fundación Barrera Zoofitosanitaria Patagónica (FUN.BA.PA), la capacitación del personal del laboratorio, la difusión, la inspección de los apiarios y toma de muestras, el análisis de las muestras y la presentación de los resultados a los productores y entrega de la libreta sanitaria.

Finalmente se desarrollan algunas conclusiones y recomendaciones que se esperan sean de utilidad para próximas campañas sanitarias.

II – CAMPAÑA SANITARIA APÍCOLA AÑO 2006- 2007

Durante la campaña sanitaria apícola correspondiente a la temporada 2006-2007 se realizaron las siguientes actividades:

- Capacitación de los inspectores apícolas
- Capacitación de los técnicos responsables de los laboratorios
- Equipamiento de los laboratorios
- Difusión de los alcances de la campaña
- Inspección de los apiarios y toma de muestras en primavera
- Inspección de los apiarios y toma de muestras en otoño
- Análisis de las muestras
- Presentación de los resultados y entrega de la libreta sanitaria

A continuación se realiza una breve descripción de cada una de estas actividades:

1.-Capacitación de los inspectores apícolas

El curso de capacitación de los inspectores se llevó a cabo en la ciudad de Viedma (Río Negro) en la sede de FUN.BA.PA., el día 26 de agosto de 2006. El docente fue el Ing. Raúl Pérez, técnico perteneciente de la Universidad Nacional de La Plata y del Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires.

Asistieron los siguientes técnicos apícolas: Arturo Messinger (Río Colorado), Damián Román (Valle Inferior del Río Negro), Edgardo Ruíz (Conesa), Héctor Trays (Valle Medio), Cristina Gomez de Roth (Valle Medio), José Murray (Valle

Medio), David Alegre (Valle Medio) Gustavo Gonzalez (Alto Valle), Jorge Cowes (Alto Valle), Juan Mange (Luis Beltrán).

La temática tratada pretendió actualizar conceptos relacionados con el origen, control, síntomas, etc. de las principales enfermedades del apiario y sobre la metodología a implementar en la presente campaña sobre toma de muestras, planillas, etc.

Un evento similar se desarrolló en San Carlos de Bariloche el 8 de septiembre de 2006, participando inspectores de la zona andina (Bariloche, El Bolsón, Provincia de Chubut).

2. Capacitación de los técnicos de los laboratorios responsables del análisis de las muestras

Se realizaron dos cursos de capacitación; el primero en la ciudad de Viedma (Río Negro), en la sede FUN.BA.PA., el día 25 de agosto de 2006. El docente responsable fue el Ing. Raúl Pérez, técnico perteneciente a la Universidad Nacional de La Plata y al Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires.

Participaron los técnicos responsables de los laboratorios de FUN.BA.PA. ubicados en Viedma (Río Negro) y en Allen (Río Negro) y del laboratorio del Centro Regional Universitario Villa Regina de la Universidad Nacional del Comahue.

El personal técnico de realizar los análisis presentes en el curso fueron: Tec. Agr. Cristina Holzmann (FUBAPA Viedma), Dra. Marina Kugler (FUNBAPA Viedma) Ing. Claudia Stazionatti (FUNBAPA Allen), Bioquímica Rosa Alvarez (UNCo-Villa Regina), Héctor Esponda (UNCo- Villa Regina), Técnico Martin Luna (Dirección de Agricultura), Ayudante Wilfredo Leiva (FUN.BA.PA.), Técnico Daniel Arriagada (FUN.BA.PA.), Técnico Laboralista Hugo Echever (FUN.BA.PA).

Los temas tratados en forma teórica práctica en esta capacitación fueron los siguientes (ver anexo N° 1):

a.- Aplicación de la técnica para determinar los niveles de infección de Varroa jacobsoni en colmenas de Apis mellífera.

b.- Técnicas de coloración a partir de restos larvales (Diagnóstico rápido de laboratorio para diferenciar loque americana y europea).

- Técnica de la gota pendiente modificada (Hanging drop)
- Coloración negativa con nigrosina

c.- Diagnóstico de enfermedades de origen bacteriano en larvas de abejas.

- Loque americana: sintomatología, etiología, identificación del agente patógeno, toma de muestras y envío al laboratorio, exámenes microscópicos, técnicas inmunoenzimáticas, detección por PCR, técnicas microbiológicas clásicas, identificación de P.I. larvae.

- Loque europea: sintomatología, etiología, identificación del agente patógeno, coloración negativa con nigrosina, técnicas microbiológicas clásicas, técnicas inmunoenzimáticas, detección específica por PCR.

d.- Método de Cantwell (diagnósticos de Nosemosis).

Un curso similar se realizó en San Carlos de Bariloche en la sede del INTA, con el objetivo de capacitar a personal de dicho instituto. Dicha

capacitación se realizó en el 9 septiembre de 2006 y estuvo a cargo del docente Ing. Raúl Pérez. Participaron, entre otros, Ing. Guillermo Huertas (INTA), Inspector sanitario Pablo Pérez, Inspectora Verónica Marsella, inspector Sebastián Gortari.

3. Instalación y equipamiento de los laboratorios en la Universidad Nacional del Comahue (Asentamiento Universitario Villa Regina) y en la Fundación Barrera Zoofitosanitaria Patagónica (FUN.BA.PA) en Allen y Viedma).

Se instalaron tres laboratorios de diagnóstico de varroa, nosemosis y loque americana y europea para lo cuál, además de la capacitación del personal, se realizó el equipamiento correspondiente. En el anexo N° 2 se detalla el material e instrumental mínimo necesario para el funcionamiento de un laboratorio de sanidad apícola. En el caso de los laboratorios de FUN.BA.PA. se aprovecho gran parte de la infraestructura existente y que corresponde al Programa de Control y Erradicación de la Mosca de los Frutos.

Secuencia de análisis

Una vez muestreadas las colmenas, las muestras son acondicionadas para ser remitidas junto a su correspondiente protocolo al laboratorio, llegando estas por ómnibus, vehículos de FUN.BA.PA. o en ocasiones fueron traídas personalmente.

Llegadas las muestras al laboratorio, estas son registradas en un libro de actas donde son volcados todos los datos de cada una de ellas, además se cargan en un programa de computación.

Para el análisis de varroa, se toma uno de los potes que contiene la muestra y se lo pasa a un frasco, se agrega agua y detergente, se agita enérgicamente,

luego las abejas son volcadas en dos coladores en uno de los cuales quedan las abejas y en el otro las varroas. Son contabilizadas las varroas, como así también las abejas registrándose el respectivo porcentaje de ácaros hallados.

En el caso de **nosemosis**, en uno de los vasos que contienen la muestra, se enjuagan las abejas contenidas, en el ya que esta muestra contiene formol para su conservación, se ponen sobre una bandeja y se apartan de dicha muestra 60 abdómenes, se los coloca en un mortero para su posterior macerado al mismo de le va agregando agua hasta llegar a 60 c.c.

De ésta dilución del macerado se toma una alícuota la cual es colocada sobre una cámara de Neubauer para ser leída bajo microscopio. Donde se cuenta la cantidad de parásitos presente en esta lectura y poder inferir mediante los cálculos correspondiente en el nivel de infestación de la colmena muestreada.

En el caso del análisis de loque europea o americana, llega al laboratorio el cuadro o un trozo de panal para poder determinar presencia de Loque Americana y/o Europea en casa de que el inspector tenga dudas en su determinación a campo.

Se ubica alguna de la celda del panal que contenga la sintomatología, se retira los restos larvales que son depositados sobre un cubre objetos en el caso de Loque americana; se agrega agua destilada para realizar una dilución, se deja secar y luego es teñido el preparado con solución fenicada de Ziel, se enjuaga y se coloca un porta objetos encima y se lleva a microscopio para su lectura. En el caso de Loque europea una vez tomado el resto larval se lo coloca sobre un porta objetos y se hace una dilución con agua destilada luego se le agrega una solución de nigrosina y este preparado se lo extiende a lo largo del porta objeto se lo deja secar para luego ser observado bajo microscopio.

Los resultados obtenidos se vuelcan en las planillas correspondientes (ver anexo N° 4).

Secuencia de análisis

1) Toma de muestra a campo



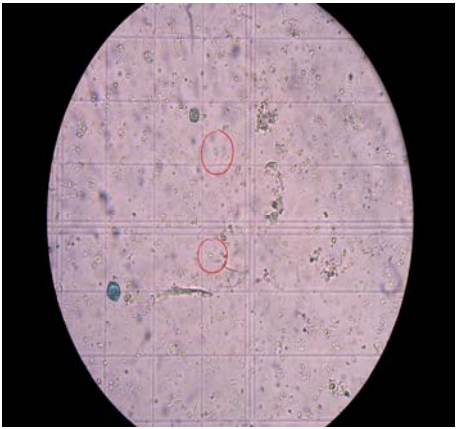
2) Ingreso de muestras al laboratorio



Análisis de Varroasis



Análisis de Nosemosis



Análisis de Loque americana



4.- Difusión

Además de la difusión por medios gráficos y radiales, los técnicos encargados de la Campaña Sanitaria realizaron diferentes encuentros con productores apícolas en diversos sitios de la Provincia de Río Negro. A continuación se detallan los encuentros más importantes.

- **Villa Regina, Segunda Reunión del Consejo Apícola Provincial**, llevada a cabo el día 29 de mayo de 2006, en el marco del Consejo Asesor Apícola Provincial; se discuten aspectos relacionados con las principales características de la campaña sanitaria.
- **Luis Beltrán**, el día 13 de julio, en el marco del Consejo Apícola Provincial; en la oportunidad se realiza la presentación del listado de inspectores para la campaña, se define la fecha tentativa para el inicio de la campaña por zonas y la folletería de la campaña.
- **Tercer Encuentro Apícola Rionegrino**, realizado el 5 de agosto en Luís Beltrán (Río Negro). En la oportunidad se realizó la presentación de la Campaña Sanitaria Apícola; asistieron productores de Valle Medio, Alto Valle, Río Colorado y General Conesa.
- **Viedma**, el día 18 de agosto, en el marco del Curso sobre Asociativismo y Calidad de Miel; se exponen los principales lineamientos de la campaña sanitaria.
- **General Conesa**, el día 24 de agosto en el marco de la reunión del Consejo Apícola Provincial.

- **Río Colorado**, reunión con productores locales e inspectores locales, realizada el día 25 de agosto de 2006. Se exponen los principales lineamientos de la campaña.
- **Alto Valle**, curso sanidad apícola Susana Bruno, el día 20 de octubre en General Roca “Capacitación y actualización en sanidad apícola, a cargo de Ing. Susana Bruno.
- **Río Colorado**, charla de sanidad apícola, el día 26 de octubre de 2006 a cargo de Ing. Raúl Perez.
- **Fernández Oro**, sanidad apícola, el día 21 de noviembre de 2006..
- **El Bolsón, producción y elaboración de propóleos**, el día 26 de noviembre de 2006.

5.- Campaña sanitaria 2006-2007

5.1. Procedimiento operativo para la inspección y toma de muestras.

Los inspectores visitaron los apiarios incluidos en el diseño muestral y efectuaron las siguientes tareas:

1. Inspección general de la totalidad de las colmenas.
2. Inspección de la totalidad de los cuadros de cada cámara de cría de las 18 colmenas seleccionadas al azar en busca de signos clínicos.
3. Toma y envío de muestras ante el hallazgo de signos clínicos de Loque Americana.
4. Extracción de muestras del 10 % de colmenas del apiario para la determinación del nivel de infestación por nosemosis.

5. Extracción de muestras del 10 % de las colmenas del apiario para la determinación del nivel de infestación de varroasis.
6. Confección del protocolo de toma de muestras (ver anexo nº 3).
7. Identificación del envase contenedor de abejas con los datos del apiario y la localidad donde fue recolectada la muestra.
8. Remisión de las muestras al laboratorio asignado.

Para el diagnóstico de laboratorio se utilizaron los siguientes métodos:

- a) Para varroasis se empleó el método de David de Jong modificado o prueba del frasco.
- b) Para loque americana, se realizó la prueba diagnóstica de la gota pendiente (hanging drop)
- c) Para nosemosis se realizó el conteo en cámara de Neubauer de acuerdo al método de Cantwell.

En cada apiario, además de la inspección general de la totalidad de las colmenas existentes se inspeccionaron individualmente 18 colmenas. Estas colmenas fueron seleccionadas al azar sin ningún procedimiento uniforme. Las inspecciones y extracción de muestras se efectuaron en el periodo comprendido entre el 15 de septiembre y 15 de diciembre de 2006 (muestreo de primavera) y entre el 1ero de marzo y 15 de mayo de 2007 (muestreo de otoño).

Se procedió a la apertura de las colmenas seleccionadas del total que conforman el colmenar y se inspeccionaron detalladamente en busca de signos clínicos de Loque americana, los diez cuadros que conforman la cámara de cría. Cuando las colmenas revisadas contaban con una segunda cámara de cría, también era revisada.

Mediante la inspección se buscaron signos clínicos correspondiente a Loque Americana, Varroasis y Nosemosis. El diagnóstico definitivo fue confirmado mediante técnicas de laboratorio..

También se procedió a registrar cualquier manifestación clínica ajena a las enfermedades en estudio, dato de importancia para posteriores estudios.

Para la toma de muestras se procedió de la siguiente manera:

a) Para varroasis se tomaron aproximadamente 400 abejas de ambas caras de tres cuadros de cría diferentes, en lo posible separados uno de otro; las muestras se conservaron en agua y alcohol.

b) Para Loque Americana, cuando se observaron signos de la enfermedad o sospechas, se tomó el cuadro entero con crías sospechosas o bien un pedazo de panal de 4 x 20 cm. Se remitió al laboratorio envuelto en papel madera o papel diario e introducido en una caja de cartón.

c) Para nosemosis, se tomó una muestra de aproximadamente 100 abejas adultas, mayores de 10 días de edad. Estas abejas fueron recolectadas de la piquera de las colmenas. Las muestras se conservaron en formol al 4 %.

Las muestras de abejas fueron recolectadas en envase de plástico, se rotularon con un marcador indeleble o con una cinta adhesiva escrita con tinta y se depositaron todos juntos dentro de una caja de cartón.

A las muestras se les adjunto el protocolo (ver anexo N° 3) de remisión de muestras correspondiente a cada apiario y a cada una de ellas.

5.2. Los apiarios muestreados en la primavera 2006

Sobre un total de 35.793 colmenas y 680 apiarios inscriptos en el RENAPA se inspeccionaron entre octubre y diciembre de 2006 un 29,47 % del total es decir 10.527 colmenas y 304 apiarios pertenecientes a 151 productores. A continuación se realiza para cada valle una breve caracterización que incluye cantidad de colmenas, productores, apiarios y una estratificación de acuerdo al tamaño.

Valle Inferior del Río Negro

Inspector responsable : Técnico Damián Romano.

Laboratorio responsable: FUNBAPA - Viedma

Cuadro N° 1: Características de los apiarios inspeccionados en el valle inferior del Río Negro – Primavera 2.006 -				
	Cantidad de productores	Porcentaje %	Cantidad de colmenas	Porcentaje %
Hasta 20 colmenas	7	17,50 %	124	2,87 %
De 21 a 50 colmenas	12	30,00 %	406	9,41 %
De 51 a 100 colmenas	8	20,00 %	508	11,78 %
De 101 a 200 colmenas	7	17,50 %	972	22,54 %
Más de 200 colmenas	6	15,00 %	2.301	53,37 %
Total	40	100 %	4.311	100 %

Cantidad de apiarios = 132

Valle de Conesa

Inspector responsable : Técnico Ruíz.

Laboratorio responsable: FUNBAPA Viedma

Cuadro N° 2: Características de los apiarios inspeccionados en el valle de Conesa – Primavera 2.006 -				
	Cantidad de productores	Porcentaje %	Cantidad de colmenas	Porcentaje %
Hasta 20 colmenas	6	46,15 %	68	10,46 %
De 21 a 50 colmenas	3	23,07 %	83	12,77 %
De 51 a 100 colmenas	2	15,38 %	145	22,30 %
De 101 a 200 colmenas	1	7,69 %	122	18,76 %
Más de 200 colmenas	1	7,69 %	232	35,69 %
Total	13	100 %	650	100 %

Número de apiarios: 25

Valle del Río Colorado

Inspector responsable : Técnico Arturo Messinger

Laboratorio responsable: FUN.BA.PA Viedma

Cuadro N° 3: Características de los apiarios inspeccionados en el valle de Río Colorado - Primavera 2.006 -				
	Cantidad de productores	Porcentaje %	Cantidad de colmenas	Porcentaje %
Hasta 20 colmenas	4	16,00 %	69	4,18 %
De 21 a 50 colmenas	11	44,00 %	340	20,64 %
De 51 a 100 colmenas	3	12,00 %	339	20,58 %
De 101 a 200 colmenas	6	24,00 %	696	42,25 %
Más de 200 colmenas	1	4,00 %	203	12,32 %
Total	25	100 %	1.647	100 %

Número de apiarios: 56

Valle Medio del Río Negro

Inspector responsable : Técnica Cristina Roth, Técnico Murray

Laboratorio responsable: Universidad Nacional del Comahue – Sede Regina.

Cuadro N° 4: Características de los apiarios inspeccionados en el valle medio Río Negro – Primavera 2.006 -				
	Cantidad de productores	Porcentaje %	Cantidad de colmenas	Porcentaje %
Hasta 20 colmenas	9	27,27 %	147	8,65 %
De 21 a 50 colmenas	14	42,42 %	489	28,80 %
De 51 a 100 colmenas	6	18,18 %	379	22,32 %
De 101 a 200 colmenas	3	9,09 %	429	25,26 %
Más de 200 colmenas	1	3,03 %	254	14,95 %
Total	33	100 %	1.698	100 %

Número de apiarios: 41

Alto Valle del Río Negro

Inspector responsable : Gustavo Gonzalez, Sanjuliá

Laboratorio responsable : FUNBAPA – Allen (Río Negro)

Cuadro N° 5: Características de los apiarios inspeccionados en el alto valle del Río Negro – Primavera 2.006 -				
	Cantidad de productores	Porcentaje %	Cantidad de colmenas	Porcentaje %
Hasta 20 colmenas	8	25,00 %	141	7,00
De 21 a 50 colmenas	10	31,25 %	386	19,16
De 51 a 100 colmenas	11	33,33 %	822	40,81
De 101 a 200 colmenas	2	6,25 %	255	12,66
Más de 200 colmenas	1	3,12 %	410	20,35
Total	32	100 %	2.014	100 %

Número de apiarios: 50

Zona Andina

Inspector responsable : Pablo Perez

Laboratorio responsable: FUNBAPA - Viedma

Cuadro N° 6: Características de los apiarios inspeccionados en zona Andina – Primavera 2.006 -.				
	Cantidad de productores	Porcentaje %	Cantidad de colmenas	Porcentaje %
Hasta 20 colmenas	2	25,00 %	6	2,89
De 21 a 50 colmenas	6	75,00 %	201	97,10
De 51 a 100 colmenas	0	0 %	0	0
De 101 a 200 colmenas	0	0 %	0	0
Más de 200 colmenas	0	0 %	0	0
Total	8	100 %	207	100 %

Número de apiarios: 8

5.3. Resultados primavera 2.006

En los cuadros siguientes se pueden observar los resultados correspondientes a varroa, nosemosis y loque americana.

Varroa: se analizaron 1.137 muestras, de las cuales un 71,06 % dio resultado negativo y un 28,94 % positivo. De las 329 muestras positivas, un 58,36 % registraron niveles de infestación entre 0,1 y 1 %, 27,36 % entre 1,01 y 3 % y 14,29 %, más del 3 %

El valle medio del Río Negro y el valle de Conesa tuvieron los valores más alto de muestras negativas mientras que zona andina, el alto valle y valle inferior del Río Negro, los valores más altos de muestras positivas.

Los valores obtenidos parecen indicar que la enfermedad se encuentra acotada en este momento del año en que se hizo el muestreo.

CUADRO Nº 7 : Resultados diagnósticos varroasis en porcentaje de infestación - Primavera 2.006 -						
Región	Cantidad de muestras analizadas	Muestras Negativas (%)	Muestras positivas (%)	% de positivos según su NIVEL DE INFESTACIÓN		
				Entre el 0,1 y 1 %	1,01 y 3 %	Más del 3 %
Valle Inferior	437	64,50	33,50	54,11	30,82	15,07
Río Colorado	157	69,42	30,58	45,83	39,58	14,58
Valle Medio	255	80,46	19,54	76,00	18,00	6,00
Alto Valle	193	66,00	33,50	60,93	17,18	21,87
Conesa	61	91,80	8,20	60,00	40,00	0
Zona Andina	34	55,88	44,11	73,33	26,67	0
Total provincia de Río Negro	1.137	71,06	28,94	58,36	27,36	14,29

Nosemosis: se analizaron 1.166 muestras, de las cuales un 43,57 % dio resultado negativo y un 56,43 % positivo. De las 658 muestras positivas, un 40,27 % registraron niveles de infestación DEBIL, 15,96 % MEDIANO y 43,77 %, ALTO.

El alto valle del Río Negro y el valle del Río Colorado tuvieron los valores más alto de muestras negativas mientras que zona andina y valle inferior del Río Negro, los valores más altos de muestras positivas.

Más del 50 % de las muestras registraron un resultado positivo a esta parasitosis, lo que indica la poca importancia que se le da a esta enfermedad en la región. A su vez, la mayoría de los resultados positivos se ubican entre grado débil de infestación y grado fuerte.

CUADRO N° 8 : Resultados diagnósticos nosemosis en porcentaje de infestación - Primavera 2.006 -						
Región	Cantidad de muestras analizadas	Muestras Negativas (%)	Muestras positivas (%)	Muestras Positivas Nivel de Infestación		
				DEBIL (1)	MEDIANO (2)	FUERTE (3)
Valle Inferior	435	16,32	83,68	31,32	12,91	55,77
Río Colorado	167	78,44	21,56	66,67	22,22	11,11
Valle Medio	254	46,06	53,94	49,64	20,44	29,93
Alto Valle	216	68,51	31,48	58,82	13,24	27,94
Conesa	62	51,61	48,39	50,00	20,00	30,00
Zona Andina	32	28,12	71,87	17,39	30,43	52,17
Total provincia de Río Negro	1166	43,56	56,43	40,27	15,96	43,77

(1) entre 1 y 500.000 esporos; (2) entre 500.000 a 1.000.000 esporos; (3) más de 1.000.000 esporos

Loque americana:

El promedio para la Provincia de Río Negro refleja un valor reducido; sólo en el valle de Conesa alcanza a superar el 3 %. Se destaca el casi mínimo valor registrado en alto valle del Río Negro y en Río Colorado; sin embargo, debemos destacar que el número de colmenas inspeccionadas en el alto valle y valle medio del Río Negro es escaso en comparación con el total de las colmenas existentes.

**CUADRO N° 9:: Resultados diagnósticos loque americana
– Primavera 2.006 -**

Región	Total de colmenas	Total de colmenas inspeccionadas	Muestras enviadas	Cantidad de colmenas negativas	Cantidad de colmenas positivas	Porcentaje de infección sobre colmenas inspeccionadas (%)
Valle Inferior	4.311	1732	38	0	37	2,14
Río Colorado	1.647	909	10	2	8	0,88
Valle Medio	1.698	699	42	26	13	1,86
Alto Valle	2.014	1.025	5	0	5	0,48
Conesa	650	366	17	3	13	3,55
Zona Andina	207	109	0	0	0	0
Total provincia de Río Negro	10.527	4.840	112	31	76	1,57

A continuación se presenta un cuadro comparativo elaborado a partir de los resultados en cada uno de los valles irrigados de la Provincia de Río Negro:

Cuadro Nº 10 : Resultados comparativos por valle irrigado, Provincia de Río Negro - Primavera 2.006 –			
	Varroa (1)	Nosemosis (1)	Loque americano (2)
Valle Inferior	Medio	Alto	Medio
R.Colorado	Medio	Bajo	Bajo
V.Medio	Bajo	Medio	Medio
A.Valle	Medio	Bajo	Bajo
Conesa	Bajo	Bajo	Alto
Z. Andina	Alto	Alto	0
Provincia Río Negro	Bajo	Medio	Medio

(1) Porcentaje de muestras positivas sobre el total muestreado.

(2) Porcentaje de infección sobre colmenas inspeccionadas.

Varroa:

Bajo: menos del 30 % de las muestras con resultado positivo.

Medio: entre un 30 % y 40 % de las muestras dieron resultado positivo.

Alto: más del 40 % de las muestras dieron resultado positivo.

Nosemosis:

Bajo: menos del 50 % de las muestras con resultado positivo.

Medio: entre un 50 % y 70 % de las muestras dieron resultado positivo.

Alto: más del 70 % de las muestras dieron resultado positivo.

Loque americana:

Bajo: menos del 1 % de las colmenas inspeccionadas con resultado positivo.

Medio: entre un 1 % y 3 % de las colmenas inspeccionadas con resultado positivo.

Alto: más del 3 % de las colmenas inspeccionadas con resultado positivo.

5.4. Los apiarios muestreados otoño 2.007

Sobre un total de 35.793 colmenas y 680 apiarios inscriptos en el RENAPA se inspeccionaron entre marzo y mayo de 2007 un 32,03 % del total es decir 11.457 colmenas y 281 apiarios pertenecientes a 148 productores. A continuación se realiza para cada valle una breve caracterización que incluye cantidad de colmenas, productores, apiarios y una estratificación de acuerdo al tamaño.

Valle Inferior del Río Negro

Inspector responsable : Técnico Damián Romano.

Laboratorio responsable: FUNBAPA - Viedma

Cuadro N° 11: Características de los apiarios inspeccionados en el valle inferior del Río Negro – Otoño 2.007 -				
	Cantidad de productores	Porcentaje %	Cantidad de colmenas	Porcentaje %
Hasta 20 colmenas	4	13,79 %	58	2,87 %
De 21 a 50 colmenas	7	24,13 %	206	9,41 %
De 51 a 100 colmenas	9	31,03 %	660	11,78 %
De 101 a 200 colmenas	4	13,79 %	541	22,54 %
Más de 200 colmenas	5	17,24 %	2473	53,37 %
Total	29	100 %	3.939	100 %

Cantidad de apiarios = 90

Valle de Conesa

Inspector responsable : Técnico Ruíz.

Laboratorio responsable: FUNBAPA Viedma

Cuadro Nº 12: Características de los apiarios inspeccionados en el valle de Conesa – Otoño 2.007-				
	Cantidad de productores	Porcentaje %	Cantidad de colmenas	Porcentaje %
Hasta 20 colmenas	5	62,50%	75	37,50 %
De 21 a 50 colmenas	2	25,00 %	46	23,00 %
De 51 a 100 colmenas	1	12,50 %	79	39,50 %
De 101 a 200 colmenas	0	%	0	0 %
Más de 200 colmenas	0	%	0	0 %
Total	8	100 %	200	100 %

Número de apiarios: 10

Valle del Río Colorado

Inspector responsable : Técnico Arturo Messinger

Laboratorio responsable: FUN.BA.PA Viedma

Cuadro N° 13: Características de los apiarios inspeccionados en el valle de Río Colorado – Otoño 2.007 –				
	Cantidad de productores	Porcentaje %	Cantidad de colmenas	Porcentaje %
Hasta 20 colmenas	1	3,85 %	20	1,07 %
De 21 a 50 colmenas	11	42,30 %	422	22,66 %
De 51 a 100 colmenas	8	30,77 %	559	30,00 %
De 101 a 200 colmenas	6	23,08 %	862	46,27 %
Más de 200 colmenas	0	0,00 %	0	0,00 %
Total	26	100 %	1.863	100 %

Número de apiarios: 65

Valle Medio del Río Negro

Inspector responsable : Técnica Cristina Roth, Técnico Murray

Laboratorio responsable: Universidad Nacional del Comahue – Sede Regina.

Cuadro N° 14: Características de los apiarios inspeccionados en el valle medio Río Negro – Otoño 2.007 -				
	Cantidad de productores	Porcentaje %	Cantidad de colmenas	Porcentaje %
Hasta 20 colmenas	7	11,67 %	89	2,19 %
De 21 a 50 colmenas	23	38,33 %	900	22,20 %
De 51 a 100 colmenas	23	38,33%	1778	43,87 %
De 101 a 200 colmenas	3	5,00%	351	8,67 %
Más de 200 colmenas	4	6,67%	935	23,07 %
Total	60	100 %	4053	100 %

Número de apiarios: 78

Alto Valle del Río Negro

Inspector responsable : Gustavo Gonzalez, Sanjuliá

Laboratorio responsable : FUNBAPA – Allen (Río Negro)

Cuadro N° 15: Características de los apiarios inspeccionados en el alto valle del Río Negro – Otoño 2.007 -				
	Cantidad de productores	Porcentaje %	Cantidad de colmenas	Porcentaje %
Hasta 20 colmenas	2	8,00 %	39	2,78 %
De 21 a 50 colmenas	11	44,00 %	384	27,37 %
De 51 a 100 colmenas	8	32,00%	770	54,88 %
De 101 a 200 colmenas	4	16,00 %	210	14,97 %
Más de 200 colmenas	0	0,00%	0	0,00 %
Total	25	100 %	1.403	100 %

Número de apiarios: 38

5.5. Resultados otoño 2.007

En los cuadros siguientes se pueden observar los resultados correspondientes a varroa, nosemosis y loque americana.

Varroa: se analizaron 1.183 muestras, de las cuales un 34,92 % dio resultado negativo y un 65,08 % positivo. De las 413 muestras positivas, un 37,92 % registraron niveles de infestación entre 0,1 y 1 %, 29,74 % entre 1,01 y 3 % y 32,20 %, más del 3 %

El valle medio del río Negro registró el valor más alto de muestras negativas (45,62 %) mientras que el valle de río Colorado tuvo el porcentaje de muestras negativas más bajo (19,00 %).

El alto valle del río Negro, el valle de Conesa y el Valle Inferior registraron 32,16 %, 30,00 % y 32,50 % respectivamente.

De las muestras positivas, los resultados indican que un 37,92 % tienen valores bajos, un 29,74 % valores medio y 32,20 % valores altos.

**CUADRO Nº 16 : Resultados diagnósticos varroasis en porcentaje de infestación
– Otoño 2.007-**

Región	Cantidad de muestras analizadas	Muestras Negativas (%)	Muestras positivas (%)	% de positivos según su NIVEL DE INFESTACIÓN		
				Entre el 0,1 y 1 %	1,01 y 3 %	Más del 3 %
Valle Inferior	403	32,50	67,50	39,70 %	28,67 %	31,61 %
Río Colorado	194	19,07	80,93	40,76 %	34,39 %	24,84 %
Valle Medio	423	45,62	54,38	30,86 %	26,52 %	42,60 %
Alto Valle	143	32,16	67,84	46,39 %	36,08 %	17,52 %
Conesa	20	30,00	70,00	28,57 %	14,28 %	57,14 %
Zona Andina	0	0	0	0	0	0
Total provincia de Río Negro	1.183	34,92	65,08	37,92 %	29,74 %	32,20 %

Nosemosis: se analizaron 1.184 muestras, de las cuales un 63,68 % dio resultado negativo y un 36,32 % positivo. De las 430 muestras positivas, un 69,80 % registraron niveles de infestación DEBIL, 15,10 % MEDIANO y 15,10 %, ALTO.

En casi todos los valles, los valores negativos fueron más importantes que los positivos, salvo en el Valle Inferior donde existió una elevada proporción de muestras con resultados positivos.

En el valle inferior, de las muestras positivas, el 57,14 % registra un ataque débil, un 19,05 % un ataque moderado mientras que un 23,81 % un ataque fuerte a esta parasitosis.

CUADRO Nº 17 : Resultados diagnósticos nosemosis en porcentaje de infestación - Otoño 2.007 -						
Región	Cantidad de muestras analizadas	Muestras Negativas (%)	Muestras positivas (%)	Muestras Positivas – Nivel de Infestación		
				DEBIL (1)	MEDIANO (2)	FUERTE (3)
Valle Inferior	405	37,77	62,22	57,14	19,05	23,81
Río Colorado	194	87,11	12,88	96,00	4,00	0
Valle Medio	422	75,60	24,40	81,55	15,53	2,92
Alto Valle	143	70,63	29,37	97,62	0	2,38
Conesa	20	60,00	40,00	87,50	0	12,50
Zona Andina	0	0	0	0	0	0
Total provincia de Río Negro	1184	36,30	63,68	69,80	15,10	15,10

(1) entre 1 y 500.000 esporos; (2) entre 500.000 a 1.000.000 esporos; (3) más de 1.000.000 esporos

Loque americana:

El promedio para la Provincia de Río Negro refleja un valor de 3,41 %; en el Valle Inferior y en el Valle de Conesa los valores registran valores superiores al 6 %. En el resto, los valores apenas superan el 2 % salvo en el caso de Valle Medio del Río Negro que registra valores apenas superiores al 1 %. En este caso, se observó que algunas muestras no pudieron ser procesadas debido a que la muestra era insuficiente.

CUADRO Nº 18 : Porcentaje de apiarios con loque americana – Otoño 2.007-			
Región	Total de Apiarios	Apiarios con loque americana	Porcentaje de apiarios con loque americana (%)
Valle Inferior	90	35	38,89
Río Colorado	65	17	26,15
Valle Medio	78	6	7,69
Alto Valle	39	8	20,51
Conesa	10	1	10
Zona Andina	0	0	0
Total provincia de Río Negro	282	67	23,80

**CUADRO N° 19: Resultados diagnósticos loque americana
- Otoño 2.007 -**

Región	Total de colmenas	Total de colmenas inspeccionadas	Colmenas observadas con Loque Americana	Muestras enviadas al laboratorio	Colmenas totales con Loque Americana	Porcentaje de infección sobre colmenas inspeccionadas (%)
Valle Inferior	3.938	1.513	100	0	100	6,61
Río Colorado	1.863	1.095	23	2	25	2,38
Valle Medio	4.053	1.389	10	11	15	1,08
Alto Valle	1.403	666	7	8	15	2,25
Conesa	200	162	5	5	10	6,17
Zona Andina	0	0	0	0	0	0
Total provincia de Río Negro	11.457	4.825	145	26	165	3,41

A continuación se presenta un cuadro comparativo elaborado a partir de los resultados en cada uno de los valles irrigados de la Provincia de Río Negro:

Cuadro N° 20 : Resultados comparativos por valle irrigado, Provincia de Río Negro - Otoño 2.007-			
	Varroa	Nosemosis	Loque americano
Valle Inferior	Alto	Medio	Alto
R.Colorado	Alto	Bajo	Medio
V.Medio	Alto	Bajo	Medio
A.Valle	Alto	Bajo	Medio
Conesa	Alto	Bajo	Alto
Z. Andina	s.i.	s.i.	s.i.
Provincia Río Negro	Alto	Medio	Alto

Varroa:

Bajo: menos del 30 % de las muestras con resultado positivo.

Medio: entre un 30 % y 40 % de las muestras dieron resultado positivo.

Alto: más del 40 % de las muestras dieron resultado positivo.

Nosemosis:

Bajo: menos del 50 % de las muestras con resultado positivo.

Medio: entre un 50 % y 70 % de las muestras dieron resultado positivo.

Alto: más del 70 % de las muestras dieron resultado positivo.

Loque americana:

Bajo: menos del 1 % de las colmenas inspeccionadas con resultado positivo.

Medio: entre un 1 % y 3 % de las colmenas inspeccionadas con resultado positivo.

Alto: más del 3 % de las colmenas inspeccionadas con resultado positivo.

5.6. Entrega de resultados y libretas sanitarias

En algunos valles se hizo entrega de la libreta sanitaria (ver anexo N° 5) como en el valle inferior; la entrega de las libretas sanitarias e interpretación de los resultados se realizó el día jueves 7 de diciembre de 2006. Estuvo a cargo de los técnicos de la Dirección de Agricultura y del ingeniero agrónomo Raúl Pérez del Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires.

En Río Colorado, la entrega de la libreta sanitaria e interpretación de los resultados se realizó el día 20 de diciembre de 2006; estuvo a cargo del ingeniero agrónomo Raúl Pérez del Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires y de los técnicos de la Dirección de Agricultura.

En el resto de la provincia, y por diversas razones operativas, los resultados fueron comunicados a los inspectores apícolas y ellos fueron los encargados de entregar los resultados a los apicultores.

Finalmente, el día 4 de agosto de 2007 en la ciudad de Luis Beltrán (Río Negro), fueron presentados los resultados del 4to Encuentro Apícola Rionegrino y el Ing. Agr. Raúl Pérez fue el encargado de interpretar los resultados e la campaña sanitaria.

III. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Algunas conclusiones y recomendaciones se indican a continuación:

1.- Es necesario incorporar más inspectores apícolas, especialmente en las zonas donde existe un mayor número de colmenas como Alto Valle y Valle Medio del Río Colorado. Al tratarse de una actividad estacional (el muestreo e inspección) y cómo la mayoría de los inspectores tiene otra actividad, no pueden satisfacer todos los requerimientos en tiempo y forma. También sería conveniente analizar la posibilidad de que los propios productores obtuvieran muestras y las enviaran a los laboratorios ante la sospecha de la existencia de alguna enfermedad.

2.- Es imprescindible una mayor capacitación de los inspectores, especialmente en como tomar muestras, cuidados en el transporte, características de las principales enfermedades, identificación de nuevas enfermedades, etc.

3.- En algunos casos, los apicultores no recibieron los resultados en tiempo y forma, especialmente los resultados de primavera; por lo que se ajustó la entrega de los mismos en la campaña otoñal.

4.- Capacitar al personal del laboratorio en la comprensión de los resultados ya que muchas veces el apicultor solicita tal asesoramiento.

5.- En el cuadro siguiente se realiza una comparación en el tiempo de la situación de las distintas enfermedades:

	Temporada 2.004	Primavera 2.006	Otoño 2.007
Varroa	59 %	28,94 %	65,08 %
Nosemosis	45 %	56,43 %	58,78 %
Loque americana	2,4 %	1,57 %	3,39 %

La comparación con la situación encontrada en el año 2.004 para la Provincia de Río Negro indica que la situación actual es levemente más desfavorable.

ANEXOS

ANEXO Nº 1: TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA DETERMINACION DE ENFERMEDADES EN LAS ABEJAS – CURSO DE CAPACITACION – CAMPAÑA SANITARIA APICOLA 2006 – 2007

APLICACION DE UNA NUEVA TÉCNICA PARA DETERMINAR LOS NIVELES DE INFECCIÓN DE *Varroa jacobsoni* EN COLMENAS DE *Apis mellífera* Jorge Augusto Marcangeli

Laboratorio de Artrópodos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Mar del Plata. Funes 3350. (7600) Mar del Plata. E-mail: jamarca@mdp.edu.ar

RESUMEN

En este trabajo se presenta una nueva manera de obtener buenas estimaciones del tamaño poblacional del ácaro *Varroa jacobsoni* en colmenas de abejas. El estudio se llevó a cabo sobre 20 colmenas tipo Langstroth de un híbrido de *Apis mellífera* y *Apis mellífera ligustica*. La técnica presentada se basa en determinar la prevalencia parasitaria a partir de la recolección de abejas nodrizas sobre tres cuadros de cría. Los análisis de regresión y varianza efectuados muestran una relación directa entre la prevalencia parasitaria y el tamaño poblacional alcanzado por los parásitos en las colmenas ($y = 26,983 x - 162,20$; $p < 0,05$). La aplicación de esta metodología para determinar los niveles de infección resulta de fácil implementación y eliminaría los errores provocados por la agregación de los parásitos.

Palabras clave: *Varroa jacobsoni*, *Apis mellífera*, niveles de infección

Key Words: *Varroa jacobsoni*, *Apis mellífera*, infestation levels

ABSTRACT. *A new method to estimate Varroa jacobsoni infection in honeybee colonies.*

The work present an effective method to determinate Varroa jacobsonii infection levels in honeybee colonies. The work was done at Mar del Plata (Province of Buenos Aires) on 20 honeybee colonies of an hybrid of Apis mellífera mellífera and Apis mellífera ligustica. Samples of young honeybees were taken upon three brood frames and parasitic prevalence were determined on each colony. Regression and ANOVA analysis performed showed a direct relationship between parasitic prevalence and total number of mites ($y = 26.983 x - 162.28$; $p < 0.05$). This methodology is suitable to predict mite levels on colonies and would reduce the error produced by parasite aggregation.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la apicultura de todo el mundo enfrenta un grave problema sanitario: el provocado por el ácaro ectoparásito *Varroa jacobsoni*. Su ciclo de vida es complejo y afecta tanto a las abejas adultas como a las crías en desarrollo. Como consecuencia de ello, su poder patogénico es muy alto, causando año tras año, enormes pérdidas en el número de colmenas (Marcangeli, en prensa). El desarrollo de las infecciones es muy variable ya que depende entre otros, de factores climáticos (De Jong, *et al.*, 1984; Ritter y De Jong, 1984), características propias de las abejas (Camazine, 1986; Otten, 1988; Schousboe, 1990) y de variaciones relacionadas directamente con el parásito (Marcangeli, 1994; Fries *et al.*, 1906). En consecuencia, resulta de suma importancia implementar una metodología simple que permita predecir el grado de parasitismo en las colonias de abejas.

Hasta la actualidad, se han empleado diversos métodos, con diferentes resultados, para diagnosticar la enfermedad (Ritter, 1901, De Jong, *et al.*, 1982, Rademélcher, 1985, Calatayud y Verdú, 1993). De todos ellos, el más ampliamente utilizado es el basado en la determinación de la prevalencia parasitaria (De Jong *et al.*, 1902).

Investigaciones recientes, (Marcangeli, en prensa) demostraron que esta técnica resulta poco precisa debido al tipo de distribución que adoptan los parásitos en el interior de las colmenas. En su reemplazo, propone en concordancia con Calatayud y Verdú (1995) el diagnóstico de las poblaciones del ácaro mediante el análisis de la mortalidad natural. Sin embargo, este método presenta una difícil aplicación por parte de los productores; dado que consume mucho tiempo y para su estimación es necesario la adopción de pisos especiales en las colmenas que incrementan los costos de producción.

El objetivo de este trabajo es presentar una variante de la técnica propuesta por De Jong (1982), la cual resulta adecuada y de fácil aplicación para estimar el número de ácaros presentes en las colonias de abejas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio fue llevado a cabo en una apiario comercial ubicado en Mar del Plata (Provincia de Buenos Aires) durante el mes de marzo de 1999. Los muestreos se realizaron sobre 20 colmenas tipo Langstroth de un híbrido de *Apis mellifera mellifera* y *Apis mellifera ligustica*. Las colmenas de estudio presentaban al inicio del trabajo similares proporciones de abejas adultas, cría y reservas de miel y polen. Estos parámetros fueron evaluados siguiendo las metodologías propuestas por Rogers *et al.* (1983) y Acorti *et al.* (1986)

Para registrar la prevalencia parasitaria en las colmenas, se utilizó primeramente la técnica propuesta por De Jong *et al.* (1982) que consiste en tomar de cada colmena, un cuadro de cría y barrer, sobre un frasco con alcohol y agua (1 :1) aproximadamente 200 abejas. Posteriormente, se realiza el recuento de abejas y ácaros y se expresa su relación en porcentaje. Transcurrida una semana, se aplicó sobre las mismas colonias una variación de esta técnica. Dicha variación consiste en tomar la misma muestra, pero a partir de tres cuadros de cría.

Una vez finalizada la toma de datos, y con el fin de determinar el número total de ácaros, la totalidad de las colmenas fueron provistas con dos tiras plásticas de Apistán® en su formulación original que presenta una efectividad promedio del 99%, Los ácaros muertos se recolectaron de los pisos y se registró su número por colmena.

Finalmente, se realizaron análisis de regresión y varianza entre las mediciones de prevalencia parasitaria, utilizando ambas técnicas, y el número de ácaros totales calculado a partir de los recuentos posteriores al tratamiento acaricida. Dado que la distribución de porcentajes no se ajustan a una distribución normal, los datos provenientes de las prevalencias fueron transformados a arcoseno de su raíz cuadrada (Zar, 1984).

RESULTADOS

La Tabla I muestra el número total de ácaros muertos por efecto del acaricida Apistán®. Se observa que las colonias mostraban niveles de infección muy variables, siendo su promedio 170,95 (+ -) 186,69 ácaros. La prevalencia parasitaria tomada sobre un solo cuadro fue variable, no observándose ninguna correlación con el número total de ácaros presentes en las colonias.

Los resultados de los análisis de regresión efectuados se muestran en las figuras 1 y 2. Para el caso de la prevalencia sobre un solo cuadro, no se demostró ningún tipo de relación. ($F_{obs} = 0,029$; $F_{crit} = 0,866$; $p < 0,05$; $n = 20$; g.l. = 1,18; $r^2 = -0,053$). En contraposición, se observó una clara relación entre la prevalencia parasitaria tomada sobre tres cuadros y el tamaño poblacional de parásitos. Esta relación acepta la hipótesis de regresión lineal y puede ser expresada como $y = 26,983 x - 162,68$ ($F_{obs} = 11,52$; $F_{crit} = 0,0032$; $p < 0,05$; $n = 20$; g.l. = 1,18; $r^2 = 0,356$).

DISCUSIÓN

En trabajos anteriores se ha demostrado que el mejor índice del nivel de infección de ácaros en las colonias de abejas es la mortalidad natural (Calatayud y Verdú, 1993; 1995, Marcangeli, en prensa). Para su determinación, es necesario realizar conteos periódicos del número de ácaros muertos en cada colonia y ajustarlo de acuerdo a las curvas de

regresión obtenidas. Sin embargo, este método resulta poco práctico dado que es necesario visitar las colmenas un mayor número de veces, consume por lo tanto un mayor tiempo y se deben utilizar pisos de colmenas especiales que aseguren la recolección de ácaros, evitando pérdidas.

Los resultados presentados en este trabajo reafirman observaciones previas (Marcangeli, en prensa) que indican que la prevalencia parasitaria tomada sobre un solo cuadro de cría no constituye un buen índice del grado de infección de las colmenas. Los parásitos no muestran una distribución uniforme sobre sus hospedadores, sino que adoptan distribuciones del tipo contagiosa (Grullo!, '1 DII; Anderson .y Gordoh, 1982; Cabaret y Momles, '19U3; ML1rcangeli, *op. cit.*). [sla agregación implica la presencia de zonas en las colmenas con una alta concentración de ácaros y zonas libres de ellos (Eguaras *el al.*, 1994; Marcallgeli, en prensa). Considerando estos factores, las posibilidades de error es muy grande y dependerá del cuadro de cría tomado para la determinación de la prevalencia, pudiendo tanto sobrestimar como subestimar el nivel de infección en las colmenas.

Mediciones de este parámetro sobre una misma colmena en distintas horas del día y/o sobre distintos cuadros han arrojado valores muy disímiles, lo que confirma l; debilidad .de esta técnica (Marcangeli, observación personal).

Contrariamente, este trabajo muestra que la prevalencia parasitaria tomada en base a tres cuadros de cría presenta un buen ajuste al modelo de regresión y por ende es representativo del número de ácaros totales presentes en las colonias de abejas. El efecto de agregación de los parásitos es aparentemente eliminado al no tomar la muestra de un solo cuadro y considerando ahora las distintas zonas de las colmenas.

Esta, técnica presenta, además, la ventaja de ser simple, no dañino para las colonias y de fácil aplicación por los propios productores apícolas, quienes podrán disponer de un método efectivo para determinar el estado de las poblaciones de *V. jacobsoni*.

Técnicas de coloración a partir de restos larvales. (Diagnóstico rápido de laboratorio para diferenciar loque americana y europea)

Las técnicas de coloración presentadas a continuación se basan en métodos rápidos y simples para diferenciar a *Paenibacillus larvae*, agente causal de la loque americana, de otras especies bacterianas presentes en el apiario.

Sin embargo, en muchos casos, para un diagnóstico de certeza, es necesario efectuar el aislamiento y cultivo del patógeno en medios específicos y posterior identificación mediante pruebas bioquímicas.

TÉCNICA DE LA GOTA PENDIENTE MODIFICADA (Hanging drop)

Colorante:

Solución A: fucsina básica 0,3 g + etanol (95 %) 10 ml

Solución B: ácido fénico 5 g + agua destilada 95 ml

Mezclar A + B y colocar en un frasco gotero, se obtiene fucsina fenicada de Ziehl.

Técnica:

A partir del material viscoso de las celdas se prepara un frotis sobre un cubreobjetos de 24 X 36 mm, homogeneizando el mismo en una gota de agua destilada. Fijar a la llama.

Paralelamente se coloca aceite de inmersión sintético sobre un portaobjetos, en una superficie algo mayor a la que ocupará el cubre.

El frotis fijado en el cubreobjetos se colorea con fucsina fenicada durante 20-30 seg. Se lava con agua corriente y se coloca aún húmedo sobre el porta con el aceite de modo que la superficie coloreada se contacte con el

mismo (en forma invertida). La parte superior del cubre se seca con papel tisú y se observa al microscopio con objetivo de inmersión, colocando previamente una gota de aceite entre el cubre y el objetivo. Observar en las áreas dónde el agua ha formado glóbulos.

Sólo las esporas de *Paenibacillus larvae* presentan movimiento Browniano. Las esporas y células vegetativas de otras especies bacterianas asociadas con la loque europea permanecen fijas al vidrio.

Ocasionalmente, algunas esporas bacterianas pueden aparentar cierto movimiento, entonces es importante considerar el tamaño de las mismas, habida cuenta que *Paenibacillus larvae* es la especie (patógena de abejas) que posee esporas más pequeñas (0,6 - 0,8 μm X 1,3 - 1,5 μm).

También puede realizarse a partir de una escama colocándola en agua destilada sobre un cubreobjetos durante 2-3 min., luego se retira y se procede de la misma forma que en el caso anterior.

Esta técnica es un método de rutina para el diagnóstico de loque americana a partir de restos larvales.

COLORACION NEGATIVA CON NIGROSINA

Colorante: Solución de nigrosina al 10 % en agua destilada (p/v)

Técnica:

Se prepara una suspensión turbia con el material viscoso o se coloca una escama en agua destilada durante 10 -15 minutos.

Se vierte una gota de la suspensión sobre un portaobjetos a la cual se agrega una gota de nigrosina, se mezcla y se extiende en forma pareja. La capa se deja secar al aire y se observa por inmersión (sin utilizar cubreobjetos).

Las esporas aparecen brillantes y las formas vegetativas y esporangios grisáceos sobre el fondo negro de la preparación.

Esta técnica es muy útil para determinar la morfología de las células vegetativas de *Melissococcus pluton*, agente causal de la loque europea y otras especies bacterianas

asociadas a esta enfermedad, como por ejemplo, *Paenibacillus alvei*, *Bacillus laterosporus* y *Achromobacter eurydice*.

Referencias:

- Alippi, A.M. 1991. A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera*, in Argentina. *Journal of Apicultural Research* 30 (2): 75-80.
- Hornitzky, M.A.Z: & Wilson, S.C. 1989. A system for the diagnosis of the major bacterial brood diseases of *honeybees*. *Journal of Apicultural Research* 28: 191-195.
- Morse R.A & Nowogrodzki R. (Eds.) 1990. Honey bee pests, predators and diseases. Second. Ed., *Cornell University Press*, 474 pp.
- Shimanuki H. & Knox, D.A. 1991. Diagnosis of honey bee diseases. *U.S. Department of Agriculture Handbook* No. AH-670, 53 pp.

A. M. Alippi

DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES DE ORIGEN BACTERIANO EN LARVAS DE ABEJAS.

ADRIANA M. ALIPPI

Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, c.c. 31, calles 60 y 119, 1900 La Plata, Argentina. e-mail: amalippi@netverk.com.ar

INTRODUCCION

Las bacterias son microorganismos predominantemente unicelulares (existen formas filamentosas y miceliales), de tamaño reducido (entre 0,2 y 10 μm) y sin membrana nuclear, pertenecientes al reino *Prokaryotae* (Holt *et al.*, 1997).

Las enfermedades de origen bacteriano más importantes y más estudiadas de las abejas son la loque americana y la loque europea. La septicemia, escama pulverulenta y otras enfermedades causadas por espiroplasmas y rickettsias han sido menos estudiadas porque ocasionan pérdidas económicas menores para los apicultores.

LOQUE AMERICANA

La loque americana es la enfermedad más grave y peligrosa que afecta a las larvas de las abejas (*Apis mellifera* L.) (Bailey & Ball, 1991; Shimanuki, 1990). Es muy contagiosa, puede matar a una colmena y diseminarse a otras después de años de creerla erradicada, puede estar latente en una colonia y aparecer en forma repentina o nunca debido a factores de stress, condiciones externas, resistencia genética o causas desconocidas. No se presenta como epidemia, sino que avanza en forma progresiva, aparece en cualquier época del año.

El agente causal de la enfermedad es *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (White) Heyndrickx *et al.*, una bacteria con la capacidad de formar esporas que permanecen viables por largos periodos y sobreviven frente a condiciones adversas. Tiene difusión mundial (Matheson, 1993, 1996), en la Argentina se la detectó por primera vez

en 1989 (Alippi, 1991; 1992) y en la actualidad se halla ampliamente diseminada en todo el país.

Sintomatología

Se presenta en los cuadros de cría dando a la misma un aspecto de "cría salteada". La enfermedad se limita principalmente a larvas que han muerto luego de ser operculadas, aunque también las celdas sin opercular pueden contener larvas muertas. Las celdas afectadas tienen los opérculos hundidos y oscurecidos, de apariencia húmeda y con perforaciones irregulares. Al introducir un palillo a través de 1 opérculo, se extrae una masa viscosa de color variable entre amarillento y castaño oscuro, casi negro que se estira más de 2,5 cm, esto se conoce como "prueba de la cerilla". Con el correr del tiempo, se forma una escama que se adhiere firmemente al capullo y hacia el piso y fondo de las celdas. Si la muerte de la cría ocurre al estado de pupa, es posible observar una protuberancia de las partes bucales pupales estirada hacia el techo de la celda. Además de la glosa, las escamas pueden exhibir características del adulto como cabezas y patas, todos estos son síntomas diferenciales de la enfermedad. Los marcos afectados presentan olor semejante a la cola de carpintero (Bailey & Ball, 1991; Shimanuki, 1990).

Etiología

En el año 1907 White demostró que *Bacillus larvae* era el agente causal de la loque americana (Phillips, 1906. White, 1907. 1920). Recientemente Ash y colaboradores (1993) reclasificaron a esta especie dentro de un nuevo género, *Paenibacillus* que comprende al ex grupo 3 *Bacillus* definido por el análisis de la secuencia 16S rRNA. Estudios taxonómicos más recientes (Heyndrickx *et al.*, 1996) indican que otro miembro del género, *Paenibacillus pulvifaciens* debía reclasificarse como subespecie de *P. larva* e, dado que los genomas de ambos compartían una homología mayor al 90%.

Identificación del agente patógeno:

Prueba de la cerilla: Se inserta un palillo dentro de una celda sospechosa a través del opérculo y se retira lentamente, la larva infectada se adhiere al palillo y el contenido de la

celda se estira formando un hilo de 2,5 cm. o más.

Prueba de Holst: Se basa en el alto nivel de enzimas proteolíticas que produce *P. I. larvae* al esporular. La técnica consiste en suspender una escama en una solución de leche descremada en polvo al 1 % p/v en agua e incubar a 37°C durante 10-20 minutos, en caso .positivo, la solución se clarifica (Shimanuki & Knox. 1991). Muchas veces ocurren falsos negativos, por ejemplo, cuando se estudian panales que han sido fumigados con formaldehído o paradiclorobenceno. Por otra parte, tanto las larvas muertas que no han alcanzado el estado viscoso como las escamas muy viejas, dan reacción negativa, razón por la cual la prueba no es totalmente confiable.

Toma de muestras y envío al laboratorio:

El diagnóstico correcto de las enfermedades de la cría de las abejas depende en gran medida de la calidad de la muestra enviada para analizar.

La muestra de panal debe medir alrededor de 10 X 10 cm y debe contener la mayor cantidad posible de cría con síntomas sospechosos. NUNCA se debe enviar trozos de panal con miel los panales deben envolverse solamente en papel absorbente y NO en papel de aluminio, bolsas de plástico, latas o frascos de vidrio porque todos estos materiales favorecen el desarrollo de hongos que pueden crecer sobre el material imposibilitando totalmente el diagnóstico.

Las muestras de miel deben enviarse en frascos plásticos con tapa hermética.

Exámenes microscópicos:

Hanging drop: La técnica del *Hanging drop* (gota pendiente modificada) se utiliza para visualizar esporas de *P. I. larvae* en restos larvales con síntomas sospechosos. Es muy útil para diferenciar lo que americana de otras enfermedades de la cría, sin embargo, en muchos casos, para un diagnóstico de certeza, es necesario efectuar el aislamiento y cultivo del patógeno en medios específicos y posterior identificación mediante pruebas bioquímicas.

Técnica: A partir del material viscoso de las celdas se prepara un frotis sobre un cubreobjetos de 24 X 36 mm, homogeneizando los restos larvales en una gota de agua destilada y fijándolo a la llama. Paralelamente se coloca aceite de inmersión sintético sobre un portaobjetos, en una superficie algo mayor a la que ocupará el cubre. El frotis fijado en el cubreobjetos se colorea con fucsina fenicada de Ziehl durante 20-30 seg. Se lava con agua corriente y se coloca aún húmedo sobre el porta con el aceite de modo que la superficie coloreada se contacte con el mismo (en forma invertida). La parte superior del cubre se seca con papel tisú y se observa al microscopio con objetivo de inmersión, colocando previamente una gota de aceite entre el cubre y el objetivo. Sólo las esporas de *P. l. larvae* presentan movimiento Browniano que se manifiesta en las áreas donde el agua ha formado glóbulos. Las esporas y células vegetativas de otras especies bacterianas asociadas con la loque europea permanecen fijas al vidrio. También puede realizarse a partir de una escama colocándola en agua destilada sobre un cubreobjetos durante 2-3 min., luego se retira y se procede de la misma forma que en el caso anterior.

Ocasionalmente, algunas esporas bacterianas pueden aparentar cierto movimiento, entonces es importante considerar el tamaño de las mismas, habida cuenta que *P. l. larva* es la especie (patógena de abejas) que posee esporas más pequeñas (0,6 - 0,8 μm X 1,3 - 1,5 μm). Esta técnica es un método de rutina para el diagnóstico de loque americana a partir de restos larvales (Alippi, 1991; Alippi, 1996; Hornitzky & Wilson, 1989; Shimanuki, 1990; Shimanuki & Knox, 1991).

Tinción simple: Se prepara un frotis de manera similar a la anteriormente descrita, pero sobre un portaobjetos y se fija a la llama. Se colorea con fucsina fenicada o cualquier otro colorante bacteriano (cristal violeta, safranina, etc.) durante 30 segundos. El exceso de colorante se elimina por lavado y el porta se seca con papel tisú antes de examinarlo al microscopio, empleando objetivo de inmersión. De esta forma, se diferencian las esporas o células vegetativas bacterianas por su morfología. Si la infección se detecta en larvas de menos de 10 días, se observarán formas vegetativas flageladas en lugar de las esporas del patógeno. Estas formas poseen largos flagelos con disposición períttrica.

Técnicas inmunoenzimáticas:

ELISA: Olsen y colaboradores (Olsen *et al.*, 1990) desarrollaron una técnica de diagnóstico mediante anticuerpos monoclonales específicos para *P.I. larvae* en un ELISA indirecto.

Inmunofluorescencia: Existen varias publicaciones que describen la técnica perfeccionada para *P. I. larvae* (Otte, 1973). Tiene el inconveniente de dar reacciones cruzadas con *P. alvei* originando falsos positivos, tampoco es práctica si se debe procesar un gran número de muestras.

Identificación mediante bacteriófagos:

Stahly y colaboradores (Stahly *et al.*, 1999) aislaron al bacteriófago PPL1c, el cual es altamente específico frente a *P.I. larva e*, dando placas claras de lisis. El fago PPL1c es una herramienta útil para una rápida identificación de *P.I. larvae* mediante la técnica del *spot test*.

Detección por PCR:

Se ha puesto a punto un método directo de extracción de ADN a partir de cultivos de *P. I. larvae* en placas de Petri para su uso como molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Alippi & Aguilar, 1998). Los fingerprints generados empleando *primers* BOX y REP aparecen como únicos para *P.I. larvae* comparados con los generados por otros *Paenibacillus*, *Bacillus* y *Brevibacillus* que comparten el mismo hábitat (Alippi & Aguilar, 1998b). La metodología descrita aún no ha sido puesta a punto para la amplificación de ADN a partir de esporas.

Técnicas microbiológicas clásicas:

P.I. larvae no desarrolla en medios bacteriológicos comunes, requiere medios ricos en factores orgánicos de crecimiento. Entre los más utilizados se citan: MYPGP (Dingman

& Stahly, 1983); agar-J (Gordon *et al.*, 1973), agar cerebro corazón fortificado con tiamina (Shimanuki & Knox, 1991); SBA (Hornitzky & Karlovskis, 1989), agar Columbia adicionado con 10% de sangre ovina (Lloyd, 1986). La metodología para efectuar aislamientos a partir de distintas fuentes de apiario se detallan en las siguientes publicaciones: Alippi, 1991; Alippi, 1995; Alippi, 1996; Alippi, 1999; Hornitzky & Karlovskis, 1989; Hornitzky *et al.*, 1996; Hansen 1984a, 1984b, Hansen & Rasmussen, 1986; Shimanuki & Knox, 1988; Nordstron & Fries, 1995; Hornitzky & Clark, 1991.

Identificación de *P. I. larvae*: Las células vegetativas de *P.I. larvae* son bacilos Gram positivos, de 0,5-0,6 um de ancho por 2,3-5,0 um de largo, móviles por cilias peritricas, con cierta tendencia a formar cadenas. Las esporas tienen forma elipsoidal y sus dimensiones oscilan entre 0,5-0,7 um de ancho por 1,31,5 um de largo. En medio de cultivo, las colonias son pequeñas, de 3-4 mm de diámetro, opacas, blancuzcas a grisáceas, chatas, con superficies ligeramente rugosas y bordes irregulares. Una técnica sumamente útil para diferenciar a *P.I. larvae* es la prueba de catalasa, que consiste en colocar una gota de H₂O₂ al 10% (equivalente a aproximadamente 30 vol. de agua oxigenada) sobre la colonia problema. La mayoría de las especies de *Paenibacillus* y *Bacillus* dan reacción positiva de catalasa que se manifiesta con formación de burbujas. Los aislamientos de *P. I. larvae* SIEMPRE dan reacción negativa.

LOQUE EUROPEA

La loque europea no es considerada una enfermedad grave por muchos apicultores (Bailey & Ball, 1991). Es estacional y su severidad varía según los casos, pero es particularmente seria en colonias trashumantes (como por ejemplo las que se utilizan en apicultura migratoria para polinización de cultivos). Afecta larvas de *Apis mellifera* (*A.m. mellifera*, *A.m. ligustica*, *A.m. camica* y *A. m. scutellata*), *A. cerana* y *A. laboriosa*. Se halla distribuida en todo el mundo (con excepción de Nueva Zelanda) (Matheson, 1993, 1996). En la Argentina se la detectó en 1962 (Camugli).

Su agente causal es una bacteria no esporulada, anaerobia, *Melissococcus pluton* (anteriormente *Streptococcus pluton*). Bailey & Collins (1982) observaron que *S. pluton*

difería lo suficiente de la especie tipo *S. pyogenes* y, sobre la base de pruebas bioquímicas y estudios de homología de ADN crearon el nuevo género *Melissococcus*, quedando como única especie *M. pluton* (While)

Sintomatología

Los cuadros de cría presentan un aspecto general de cría salteada. Por lo general, afecta larvas sin opercular, entre 4 y 5 días de edad larval (7-8 días de la eclosión del huevo). Las mismas toman una coloración amarillenta y luego castaña oscura. A veces sus tráqueas se tornan visibles, lo cual no ocurre en las larvas sanas de color blanco perlado. Las larvas primero se desplazan en sus celdas y luego mueren, tomando posiciones anormales, apareciendo flácidas y de color castaño. Las mismas se descomponen despidiendo olor fétido y/o ácido muy intenso (dependiendo de la población bacteriana acompañante). Si se disecta el intestino medio de una larva enferma, aparece la membrana peritrófica gelatinosa y transparente llena de bacterias que forman flóculos opacos y blanquecinos, lo cual se observa a simple vista, mientras que el contenido intestinal de las larvas sanas aparece de color castaño (Bailey & Ball, 1991). Las larvas se secan dando lugar a escamas gomosas, irregulares, enroscadas en el fondo de las celdas y que no se adhieren a las celdas. Cuando los restos larvales se estiran (en estadios anteriores) no forman hilos de más de 2,5 cm. Tiene carácter estacional, ataca en primavera o principios de verano y ocasionalmente en otoño.

Etiología

El agente causal es *Melissococcus pluton*, especie no esporulada, anaeróbica y pleomórfica que se observa bajo la forma de cocos lanceolados dispuestos de a pares o en cadenas a partir de frotis de material larval infectado. Su tamaño oscila entre 0,5-0,7 X 1 um. . En cultivo puede adquirir forma de bastón o bacilo. *M. pluton* es fácil de encontrar en los primeros estadios de la enfermedad. La muerte de la larva infectada puede acelerarse en presencia de bacterias secundarias, que no causan la loque europea pero tienen influencia sobre el olor y la consistencia de la cría muerta. Estas especies acompañantes son sumamente útiles para el diagnóstico por microscopía óptica, pero originan síntomas que pueden enmascarar la enfermedad y dificultar el

correcto diagnóstico de campo. La población bacteriana depende de la época del año y está asociada con el tipo de síntoma que aparece en la colmena, razón por la cual el diagnóstico clínico de campo por sí solo no es confiable para una correcta detección de la enfermedad.

Achromobacter eurydice: Es un habitante común del tracto digestivo de adultas y larvas. Su número aumenta en larvas infectadas con *M. pluton*. La mayor incidencia se da en verano. No esporula. Sus dimensiones oscilan entre 0,4-0,7 um de ancho x 0,5-1,4 um de largo.

Paenibacillus Alves: Forma esporas elongadas y cilíndricas, de 0,8- 0,9 X 1,8 – 2,2 um que mantienen restos de esporangio y con típica disposición en empalizada.

Brevibacillus laterosporus: Se lo encuentra ocasionalmente en larvas infestadas con loque europea. Ha sido recientemente reclasificado en el género *Brevibacillus*. Forma esporas muy características, con restos de esporangio permanentes, con forma de canoa, los cuales se tiñen intensamente de un solo lado y en los extremos, los cuales permanecen adheridos a las esporas aún luego de la lisis del esporangio. Las esporas miden 1-1,3 x 1,2 – 1,6 um. Es Gram variable.

Enterococcus faecalis (anteriormente, *Streptococcus faecalis*): Es una especie Gram positiva no esporulada. Es responsable del olor ácido de la enfermedad, del cual deriva su nombre en alemán: *Sauerbrut*. Tiene forma ovoide (0,5 X 1 um de diámetro) y se asemeja a *M. pluton*. Ocasionalmente, puede exhibir movimiento Browniano en el *hanging drop*.

Paenibacillus apiarius: (anteriormente *Bacillus apiarius*): Ocasionalmente asociado con loque europea. Ha sido reclasificado dentro del género *Paenibacillus* (Nakamura, 1996). Presenta esporas en posición central o centrolateral en esporangios de extremos aguzados y gruesos que dan un aspecto rectangular a la espора sus dimensiones oscilan entre 0,8-1,1 X 1,5-2,0 um. Es Gram variable.

Identificación del agente patógeno:

Exámenes microscópicos:

Coloración negativa con nigrosina: Se prepara una suspensión turbia con el material viscoso o se coloca una escama en agua destilada durante 10-15 minutos. Se vierte una gota de la suspensión sobre un portaobjetos a la cual se agrega una gota de nigrosina (al 5 % p/v en agua destilada), se mezcla y se extiende en forma pareja. La capa se deja secar al aire o bajo lámpara y se observa por inmersión (sin utilizar cubreobjetos). Las esporas aparecen brillantes y las formas vegetativas y esporangios grisáceos sobre el fondo negro de la preparación. Esta técnica de rutina es muy útil para determinar la morfología de las células vegetativas de *Melissococcus pluton*, agente causal de la loque europea y otras especies bacterianas asociadas a esta enfermedad, como por ejemplo, *Paenibacillus alvei*, *Brevibacillus laterosporus* y *Achromobacter eurydice* (Alippi, 1996; Alippi, 1999).

Técnicas microbiológicas clásicas:

M. pluton no crece en medios bacteriológicos comunes. Se puede emplear el medio basal de Bailey (Bailey & Ball, 1991) y la incubación debe hacerse bajo condiciones anaeróbicas durante 4-5 días como mínimo. Algunas cepas desarrollan bien en microaerofilia (5-10% de CO₂ en aire) mientras que otras se ven inhibidas por esas concentraciones de CO₂. Para aislarlo se emplea la técnica de Bailey (1983).

Técnicas inmunoenzimáticas: Pinnock & Featherstone (1984) aplicaron la técnica de ELISA para la detección y cuantificación de *M. pluton*. Esta técnica permite detectar a *M. pluton* a partir de lavados superficiales de abejas de colmenas asintomáticas y es más sensible que las técnicas de coloración comunes, el umbral de detección es del orden de 10 a la quinta cel/ml.

Detección específica por PCR:

Govan y colaboradores (Govan *et al.*, 1998) diseñaron una metodología para la identificación de *M. pluton* utilizando PCR para amplificar una secuencia específica

del gen 16S rRNA. Esta detección es altamente específica para *M. pluton*.

Método de Cantwell (diagnóstico de Nosemosis)

- a) Separar los abdómenes de 60 abejas.
- b) Macerarlos en mortero y agregar agua destilada hasta completar 60 ml.
- c) Agitar y colocar una alícuota en la Cámara de Neubauer, que tiene una capacidad de 0,1 mm³, evitar la formación de burbujas
- d) Realizar el conteo: se utiliza la cuadrícula del medio de la cámara, la cual contiene 25 cuadros formados por dobles líneas, éstos 25 cuadros están divididos cada uno en 16 cuadrículas más pequeñas. Tener en cuenta que para evitar la subestimación o sobrestimación en el conteo, no se incluirán las esporas que toquen las dobles líneas de arriba y de la izquierda de los cuadros y sí se contarán las que toquen las de la derecha y abajo. Si hay poca cantidad de esporas, sería correcto contar las 25 cuadrículas y realizar el cálculo considerando que el macerado inicial contiene 1 ml por abeja y que en la cámara colocamos 0,1 mm³. El resultado se expresa en cantidad promedio de esporas por abejas.

Por ejemplo: si en 25 cuadros contamos 10 esporas. Haciendo pasaje de unidades: tenemos 10 esporas en 0,1 mm³ (volumen de la cámara); 100 esporas en 1 mm³ y 100.000 esporas en 1 cm³. Si 1 cm³ equivale a 1 ml y como sabemos que en la mezcla inicial una abeja está representada por 1 ml, el resultado será 100.000 esporas promedio por abeja. :

ANEXO N° 2: Material e instrumental mínimo necesario para el funcionamiento de un laboratorio de sanidad apícola

Equipamiento

- Heladera
- Freezer

Material óptico

- Microscopio binocular con objetivos de 25,40 y 100 aumentos y ocular x 10.
- 1 lupa binocular x 20 0 40 aumentos

Material de vidrio

- 6 morteros de vidrio ó porcelana de 15 cm. De diámetro
- 4 pipetas graduadas de 5 y 10 ml.
- 1 de cada una probetas graduadas de 100 y 250 ml
- 6 cajas de petri
- 10 vidrios de reloj (diversos tamaños)
- 1 de c/u vasos precipitado de 100, 200 y 500 ml.
- 2 erlenmeyer de 100 y 250 ml.
- Tubos de ensayo de 20 ml y gradillas
- Varillas de vidrio
- Embudos de vidrio de 5 y 10 cm. De diámetro.

Instrumental Histológico

- 4 pinzas histológicas de punta fina recta.
- 2 tijeras histológicas de punta fina (chica y mediana)
- 2 o 3 porta agujas
- 2 o 3 anzas

Material para determinación de varroasis en adultos

- 1 juego de filtros con malla fiambarrera
- 1 trípode
- 1 trozo de tela de algodón blanco
- 1 envase de vidrio o plástico transparente con tapa hermética de 500 ml.

Material para determinación de nosemosis

- Cámara de Neubauer con retículo de tomas
- Cubre objetos para cámara.

Drogas y colorantes

- Alcohol de 96°
- Agua destilada
- Xileno
- Ácido láctico
- Acetato de etilo
- Aceite de inversión
- Fucsina básica
- Alcohol etílico 95 °
- Fenol

Material descartable

- Papel de filtro
- Papel tissue
- Algodón cinta adhesiva

- Etiquetas
- Lápiz indeleble para vidrio
- Gamuz
- Cubre objetos 25,4 x 76,2 mm translucido natural
- Cubre objetos 24 x 40 mm
- Cubre objetos 24 x 24 mm o 18 x 18 mm
- Cubre objetos para cámaras

ANEXO Nº 3: PLANILLA UTILIZADA PARA LA TOMA DE MUESTRAS.

Dirección de Agricultura
Ministerio de Producción - Provincia de Río Negro
RELEVAMIENTO SANITARIO APÍCOLA



INSTRUCTIVO PARA EL LLENADO DE LA PLANILLA DE TOMA DE MUESTRAS

Por favor, COMPLETE la planilla con letra de imprenta y clara.

- 1- IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA TOMADA
A cada apiario visitado se le asignará un número que lo identifique. Será el mismo número que se colocará en este espacio, en las muestras que extraiga de ese apiario y en la caja que transporte esas muestras.
- 2- IDENTIFICACION DEL RESPONSABLE DE LA EXTRACCION
Aquí van los datos completos del Agente del SENASA o Inspector Sanitario Apícola que realizó la inspección y toma de muestras.
- 3- DATOS DEL APIARIO
Algunos de los productores pueden no estar inscriptos en el RENAPA, en esos casos se dejará el espacio en blanco. No puede omitirse el llenado del resto de los datos que se solicitan.
- 4-
 - a. Se indicará el TOTAL de colmenas que conforman el apiario.
 - b. Se indicará el número de colmenas que fueron inspeccionadas. Recordar que según el diseño del muestreo, se deben inspeccionar SIEMPRE 18 (DIECIOCHO) COLMENAS. Excepto en los casos en que el apiario tenga menos de 18 colmenas totales, donde se inspeccionarán la TOTALIDAD DE LAS COLMENAS DEL APIARIO. En este último caso, a y b serán iguales.
 - c. Corresponde tomar el 10% del total de colmenas existentes en el apiario.
 - d. Corresponde tomar el 10% del total de colmenas existentes en el apiario.
- 5- ENFERMEDAD: De cada enfermedad se indicará cuántas colmenas sospechosas o enfermas fueron halladas durante la inspección (columna b). Realizando una resta se calcularán las colmenas sanas (columna a). Si se tomaran muestras, y se indicará en la columna c.- el número de muestras recolectadas (que coincidirá con el número de colmenas afectadas o sospechosas: columna b).
- 6- ANAMNESIS - PREGUNTAS AL PRODUCTOR
 - a. EL APICULTOR RECONOCE LA ENFERMEDAD: Marcar con una cruz. Este punto se refiere a que si el productor es capaz de detectar mediante la observación de los signos clínicos la presencia de la enfermedad en sus colmenas.
 - b. Indague sobre los últimos tratamientos aplicados: Tipo de tratamiento, principios activos utilizados y nombre comercial de los productos aplicados los últimos tres años
- 7- En este punto resulta importante asentar información general sobre el apiario y prácticas detectadas en el apicultor. Por ejemplo: Estado general del apiario, desmalezado, disposición de las colmenas, si se observa material vacío apilado alrededor de las colmenas, higiene de los materiales, reposición de panales, etc.



PLANILLA DE TOMA DE MUESTRAS

NO OMITIR NINGUN DATO SOLICITADO. Fecha:/...../.....

1. PROTOCOLO DE EXTRACCION DE MUESTRAS N°

2. IDENTIFICACIÓN DEL RESPONSABLE DE LA EXTRACCIÓN

APellido y nombre:

ACREDITACIÓN DE SENASA N°:

3. DATOS DEL APIARIO

NOMBRE DEL APICULTOR O RAZÓN SOCIAL

RENAPA N° PARTIDO/DEPARTAMENTO

PROVINCIA

FINALIDAD DE LA EXPLOTACIÓN:

4.
a- CANTIDAD TOTAL de COLMENAS DEL APIARIO:
b- CANTIDAD TOTAL DE COLMENAS INSPECCIONADAS:
c- CANTIDAD DE MUESTRAS EXTRAIDAS PARA VARROA:
d- CANTIDAD DE MUESTRAS EXTRAIDAS PARA NOSEMOSIS:

ENFERMEDAD	COLMENAS INSPECCIONADAS		
	CANTIDAD DE COLMENAS SANAS (a)	CANTIDAD DE COLMENAS ENFERMAS O SOSPECHOSAS (b)	CANTIDAD DE COLMENAS MUESTREADAS (c)
- LOQUE AMERICANA			
- LOQUE EUROPEA			
- CRÍA YESIFICADA			
- AETHINA TUMIDA			
- TROPILAE LAPIS			

ENFERMEDAD	a.- EL APICULTOR RECONOCE LA ENFERMEDAD		b.- SI FUE APLICADO ALGUN TRATAMIENTO Indique:		
	SI	NO	Principio Activo	Nombre Comercial	Fecha de última aplicación
<input type="checkbox"/> LOQUE AMERICANA					
<input type="checkbox"/> VARROASIS					
<input type="checkbox"/> NOSEMOSIS					

7- OBSERVACIONES

.....
FIRMA y ACLARACION del ISA

NOSEMOSIS

Técnica diagnóstica utilizada: CONTEO ESPORULAR (Método de Cantwell)

Resultados

(*) Marque con una cruz, POSITIVO o NEGATIVO, según corresponda.

(**) En casos POSITIVOS se marcará con una cruz según el nivel de infestación en:

DEBIL (entre 1 y 500.000 esporos)

MEDIANO (entre 500.000 a 1.000.000 esporos)

FUERTE (más de 1.000.000 esporos)

ID Muestra	Departamento, Localidad o región	Resultados (*)		Nivel de Infestación (**)	
		NEGATIVO	POSITIVO	Débil	Mediano

ANEXO Nº 5: LIBRETA SANITARIA

TAPA Y CONTRATAPA

Ministerio de Producción
Provincia de Río Negro

**LIBRETA
SANITARIA APÍCOLA**
CONTROL DE INSPECCIONES Y MUESTREOS

Nº _____

MINISTERIO DE PRODUCCION
GOBIERNO DE LA PROVINCIA DE RIO NEGRO

DIRECCION DE AGRICULTURA
MINISTERIO DE PRODUCCION PROVINCIA DE RIO NEGRO

CFI
CONSEJO FEDERAL DE INVERSIONES

FunBaPa

CAMPAÑA
APÍCOLA
PROVINCIA DE RIO NEGRO
SANITARIA

**HOJA DE DATOS..
VA SOLO UNA VEZ
EN TODA LA LIBRETA**

Datos Personales del Productor Apícola

Apellido: _____

Nombre: _____

DNI Nº: _____

RENAPA: _____

Domicilio: _____

Localidad: _____

Partido: _____

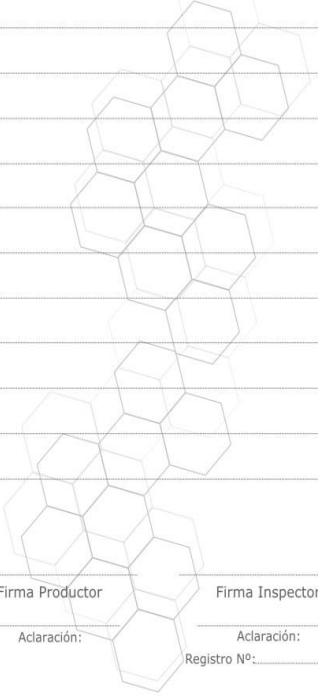
Provincia: _____

Tel: _____

Correo electrónico: _____



ESTA ES LA DOBLE PAGINA QUE SE REPITE

Datos de la Inspección	Observaciones / Recomendaciones
Fecha: ___/___/___ Temporada: <input type="checkbox"/> Primavera <input type="checkbox"/> Otoño	
Ubicación del Apiario:	
- Parcela: _____ - Localidad: _____	
<input type="checkbox"/> Número de colmenas totales <input type="checkbox"/> Número de Apiarios <input type="checkbox"/> Número de colmenas en el apiario <input type="checkbox"/> Colmenas Inspeccionadas <input type="checkbox"/> Colmenas Muestreadas:	
Varroasis <input type="checkbox"/> Nosemosis <input type="checkbox"/> Loque America <input type="checkbox"/>	
Colmenas con:	Firma Productor _____ Firma Inspector _____ Aclaración: _____ Aclaración: _____ Registro N°: _____
Loque Americana <input type="checkbox"/> Loque Europea <input type="checkbox"/> Exóticas <input type="checkbox"/>	
Resultados de los muestreos:	
Varroa <input type="checkbox"/> Nosema <input type="checkbox"/> Loque <input type="checkbox"/>	
Principio activo utilizado en la temporada anterior:	
Varroa <input type="checkbox"/> Nosema <input type="checkbox"/> Loque <input type="checkbox"/>	