



Prevalencia y distribución geográfica
de *Nosema apis* y *Nosema ceranae* en
Apis mellifera de Uruguay

Trabajo de grado

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Orientación Microbiología

Facultad de Ciencias

Universidad de la Republica

Tutor: Dra. Karina Antúnez

Departamento de Microbiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Loreley Castelli Norando

Uruguay, 2012

1. Agradecimientos

A Dios por hacer que mi camino se entrecruce con hermosas personas que iluminan mi vida.

A mis padres, Roque y Yenis, por apoyarme en todas mis decisiones, guiarme y por siempre estar ahí.

A Alejandro Muslera por su apoyo incondicional.

A Ciro Invernizzi por orientarme e impulsarme en dos mundos maravillosos como el de la Ciencia y el de la Apicultura. Y por confiar en mí.

A Karina Antúnez por aceptar ser mi tutora, sobre todo por su paciencia, dedicación, sabiduría y por guiarme en este fascinante mundo.

A Pablo Zunino por aceptar mi ingreso a este cálido grupo de personas.

A la colonia por su ayuda en las tareas del laboratorio, en especial a Matilde por su incondicional apoyo.

A mis hermanas, Alexandra y Dahiana, por la paciencia y el cariño en mis momentos de estrés previos a cada examen.

A mi abuela Olga, por sus palabras, su fe y sobre todo por sus ricas tortas.

A mi Tía Corinne Castelli por su apoyo y hospedaje en mis primeros pasos como estudiante en una ciudad tan distinta a la mía.

A todos mis compañeros y amigos de facultad por su compañía, apoyo y por los momentos divertidos que pasamos juntos.

Y por último debo agradecer a todo Sarandí Grande, ya que sería injusto intentar nombrar uno por uno y olvidarme de alguien; debido a que directa o indirectamente, colaboraron para hacer que hoy se cumpla uno de mis grandes sueños.

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
1.- Agradecimientos.....	1
2.- INTRODUCCIÓN.....	4
2.1.- Importancia de <i>Apis mellifera</i>	4
2.2.- La apicultura en Uruguay.....	5
2.3.- Estrategias de apicultores para incrementar la producción de miel.....	6
2.4.- Patógenos de <i>A. mellifera</i> presentes en Uruguay.....	6
2.5.- Nosemosis.....	8
2.6.- Similitudes y diferencias entre <i>N. ceranae</i> y <i>N. apis</i>	10
2.7.- Control de <i>N. ceranae</i> y <i>N. apis</i>	12
2.8.- HIPOTESIS.....	12
3.- OBJETIVO.....	13
4.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
4.1.- Obtención de muestras de abejas.....	14
4.2.- Extracción de ADN.....	14
4.3.- Cuantificación de ADN.....	15
4.4.- Amplificación de ADN mediante PCR múltiple.....	15
4.5.- Electroforesis en gel de agarosa.....	16
4.6.- Secuenciación.....	16
4.7.- Prevalencia y distribución geográfica de <i>N. apis</i> y <i>N. ceranae</i> en Uruguay.....	16
5.- RESULTADOS.....	17
5.1.- Extracción y cuantificación de ADN de cada una de las muestras.....	17
5.2.- Determinación de <i>N. apis</i> y <i>N. ceranae</i> mediante amplificación del gen ARNr 16S.....	17
5.3.- Identificación de los productos amplificados.....	22

5.4.- Determinación de la prevalencia y distribución geográfica de *N. apis* y *N. ceranae* en Uruguay.....23

6.- DISCUSIÓN.....26

7.- PERSPECTIVAS.....32

8.- BIBLIOGRAFÍA.....33

RESUMEN

Nosema ceranae y *Nosema apis* son microsporidios, parásitos oportunistas formadores de esporas. Los mismos son agentes causales de la nosemosis, una enfermedad que afecta a las abejas adultas de *Apis mellifera*, colonizando las células epiteliales del intestino medio, afectando las funciones digestivas de las abejas, produciendo desnutrición, envejecimiento fisiológico y reducción de la longevidad de estas.

A nivel colonial, la infección por ambas especies de *Nosema* resulta en una disminución en la producción de miel, en la actividad de forrajeo y por lo tanto en la polinización. *N. apis* ha sido reportada en trabajos anteriores como la única especie de microsporidio que infectaba a *A. mellifera* causando trastornos digestivos y acortando la vida media de la abeja; mientras que estudios recientes confirman la presencia de *N. ceranae*, concluyendo un posible reemplazo de *N. apis* por *N. ceranae*. Se ha propuesto que la devastadora pérdida de colonias de abejas reportada en algunos países del mundo, sobre todo en los países del hemisferio norte, está asociada con un incremento en la detección de *N. ceranae* en *A. mellifera*.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la prevalencia y distribución de *N. apis* y *N. ceranae* en Uruguay.

Se trabajó con 103 muestras de abejas pecoreadoras de apiarios pertenecientes al Registro Nacional de Propietarios de Colmenas del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, colectadas en marzo del 2011 de todos los departamentos del Uruguay. Por cada muestra se tomaron 20 abejas y se realizó la extracción de ADN mediante el uso de un kit comercial. Posteriormente, se efectuó la cuantificación de ADN de cada muestra para confirmar que la extracción de ADN haya sido exitosa. Se prosiguió con la amplificación del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S para ambos microsporidios mediante el ensayo de PCR *multiplex*, de acuerdo a lo descrito por Martín-Hernández *et al.*, (2007). Por último, los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron mediante exposición a luz UV. Para confirmar la identidad de los productos amplificados, tres de los productos obtenidos se enviaron a Macrogen (Corea) para su secuenciación.

Se logró detectar la presencia de *N. ceranae* en las muestras de abejas, mientras que no se detectó *N. apis*. La prevalencia de *N. ceranae* en Uruguay es de 15,0%. La frecuencia de ocurrencia en los diferentes departamentos es desigual, pero la zona más afectada coincide con los departamentos de mayor producción apícola del Uruguay. Los factores que podrían explicar esta distribución son las diferentes variantes genéticas de abejas presentes en el Uruguay, ya que se ha visto que las abejas africanizadas (híbridos de *A. m. scutellata*) son más resistentes a *N. ceranae* que las abejas italianas (*A. m. ligústica*), así como la alta densidad de colmenas presentes en dichas zonas, lo que facilitaría la dispersión de *N. ceranae*. Además, se observó que las zonas donde mayormente se detectó *N. ceranae* coinciden con departamentos con mayor cantidad de hectáreas con plantaciones de *Eucalyptus grandis*, donde se ha visto que la nosemosis es un gran problema.

Estos resultados indicarían que la nosemosis es una enfermedad emergente en *A. mellifera* en Uruguay que requiere un atento seguimiento.

2. Introducción

2.1.- Importancia de *Apis mellifera*

Las dos terceras partes de los alimentos que consumimos dependen de la polinización (Crane, 1979). Los agentes polinizadores, encargados de acarrear los granos de polen de una flor a otra, aseguran la fertilización de los óvulos y con ello la formación de semillas y frutos. Por esta razón, estos agentes resultan esenciales para el mantenimiento de los ecosistemas naturales así como para la producción de alimentos, medicinas y vestimentas (Morse y Calderone, 2000).

Entre los polinizadores, las abejas melíferas *Apis mellifera* son claramente una piedra angular, debido a que poliniza muchos cultivos lo que conlleva que en muchas partes del mundo dependan de esta especie (Morse y Calderone, 2000). Su actividad polinizadora es económicamente muy importante en diversos países, no sólo por la acción que realiza la abeja como agente polinizador, lo que ocasiona que la mayoría de los cultivos necesarios para la alimentación sean dependientes de esta actividad o favorecidos por la misma en términos de tamaño del fruto, cantidad y calidad; sino que además la contribución de la polinización en cuanto al mantenimiento de la biodiversidad en diferentes ecosistemas es inestimable. Por este motivo, el desarrollo de la actividad apícola afecta a todas las cadenas de producción agropecuarias (Morse y Calderone, 2000; Potts *et al.*, 2010; Evans y Schwarz, 2011).

En años recientes, se ha reportado una devastadora pérdida de colonias de abejas melíferas en Estados Unidos y varios países de Europa. Mientras que en Europa se le llamo a este fenómeno *Honey bee Colony Depopulation Syndrome* (CDS), en Estados Unidos se lo denominó *Colony Collapse Disorder* (CCD) (Stokstad, 2007; Higes *et al.*, 2008; Neumann y Carreck, 2010; Potts *et al.*, 2010; Van Engelsdorp y Meixner, 2010). Sólo en Estados Unidos murieron entre 750.000 y 1.000.000 de colmenas en el invierno del 2007-2008 (vanEngelsdorp *et al.*, 2008). Esta pérdida anormal de colmenas es considerada uno de los problemas ecológico y sanitario más relevantes a nivel mundial.

Los investigadores han propuesto diferentes factores que podrían intervenir en la mortalidad de las colonias. El principal factor causante de problemas de salud en la colmena lo constituyen parásitos y patógenos como el ácaro *Varroa destructor*,

diferentes virus ARN y los microsporidios *Nosema apis* y *Nosema ceranae*. Por otro lado, se ha propuesto que el uso de pesticidas, insecticidas, herbicidas y el cambio climático también juegan un papel importante en la tasa de aumento de la mortalidad observada en determinadas explotaciones apícolas (Potts *et al.*, 2010; Evans y Schwarz, 2011).

2.2.- La apicultura en el Uruguay

La abeja *A. mellifera* ha acompañado al hombre prácticamente desde su origen (Crane, 1979). Los líderes políticos y económicos, que viajaban constantemente por todo el mundo, a partir de 1700 comienzan a trasladar desde el viejo mundo colmenas rústicas para América, siendo Cuba la pionera.

En abril de 1834 Bernardino Rivadavia, presidente de Argentina en ese momento, introduce la primera colonia de *A. mellifera* en la Republica Oriental del Uruguay (Cordara, 2005).

La producción y venta de los productos asociados a la colmena, como miel, polen, cera, jalea real, propóleos y apitoxinas, influye directamente en el desarrollo de la cadena agroindustrial de la miel. La importancia de la apicultura en Uruguay se basa en la exportación de miel, generando divisas al país que llegan a más de 20 millones de dólares anuales. Las primeras exportaciones de miel se realizaron en 1963. Los principales países a los que se exportan son Alemania y Estados Unidos, y en menor grado a España e Inglaterra (MGAP, 2011). Actualmente, el sector apícola cuenta con alrededor de 3000 apicultores registrados que poseen 500.000 colmenas. En 2011, el promedio de productividad nacional fue de 35.3 kg de miel por colmena (Harriet y Campá, 2012).

Sin embargo, a pesar de ser una actividad en crecimiento, el valor de miel producida en el país ha variado durante el transcurso de los últimos años ya sea por la cantidad de miel producida (la productividad en 2007-2009 ha caído significativamente, de 33,8 Kg/colmena en 2007 a 14,7 Kg/colmena en 2009, aumentando para 2011 a 35.3 kg/colmena) así como por el precio internacional de la miel (MGAP, 2009; MGAP, 2011; Antúnez *et al.*, 2011).

2.3.- Estrategias de apicultores para incrementar la producción de miel

Debido a la necesidad por parte de los apicultores de incrementar la producción de miel, muchos de ellos trasladan sus colonias a las forestaciones de *Eucaliptus grandis* al final del verano, extendiendo la temporada de zafra. De esta forma aprovechan este recurso que se encuentra en continuo crecimiento, constituyendo actualmente el 39% aproximadamente de la forestación en nuestro país (MGAP, 2010). Si las condiciones climáticas son favorables la producción de miel en estas forestaciones puede alcanzar los 50 kg/colmena, ya que estas constituyen una importante fuente de néctar y polen para las abejas (Invernizzi *et al.*, 2009). Según la Dirección General Forestal (2010) en Uruguay hay 676.096 hectáreas de diferentes especies de eucaliptos, de las cuales 217548 ha corresponden a *E. grandis*. Estas plantaciones se encuentran distribuidas sobre todo en los departamentos de Rio Negro (52.777 ha), Rivera (52.522 ha), Paysandú (42.144 ha), Tacuarembó (16.134 ha) y Durazno (13.583 ha).

Uno de los mayores inconvenientes de trasladar colmenas a *E. grandis* es la alta incidencia de la nosemosis, enfermedad causada por los microsporidios *Nosema apis* y *Nosema ceranae*. En este sentido, Invernizzi *et al.*, (2011b) encontraron que colonias libres de nosemosis trasladadas a una forestación de *E. grandis* al comienzo de la floración, presentaban esporas de *N. ceranae* al tercer día de instaladas, con un promedio de 27,6 % abejas pecoreadoras infectadas. Al final del periodo de floración el promedio de pecoreadoras infectadas alcanzó el 90,8%. Los autores plantean que la nosemosis estaría implicada en la elevada mortandad de colonias en dichas condiciones.

La pérdida de colonias por la nosemosis ocurre con frecuencia sólo en los casos en que las colonias permanecen en las forestaciones de *E. grandis* durante el invierno (Mendoza *et al.*, 2012a). Estudios recientes indican que colonias muy infectadas, retiradas de las plantaciones inmediatamente después de culminada la floración no sufren despoblamiento y llegan a la primavera en muy buenas condiciones (Mendoza *et al.*, 2012b).

2.4.- Patógenos de *A. mellifera* presentes en Uruguay

Una colonia de abejas melíferas es una gran fuente de energía, constituyendo un ambiente propicio para el desarrollo de microorganismos tanto nativos como patógenos (Morse & Nowogrodzki, 1990). Los problemas sanitarios de las abejas causan grandes

pérdidas económicas en la industria apícola en todo el mundo, principalmente en aquellos países con apiculturas desarrolladas como es el caso de Uruguay (Invernizzi *et al.*, 2011).

La presencia y coexistencia de estos patógenos indican una importante amenaza para la actividad apícola de nuestro país y están directamente relacionados con la disminución en la producción apícola detectada durante los últimos años (Antúnez *et al.*, 2011; Invernizzi *et al.*, 2011b).

Además de los microsporidios *N. ceranae* y *N. apis*, *A. mellifera* se enfrenta a una gama de otros patógenos; como *Paenibacillus larvae*, una bacteria formadora de esporas altamente resistentes, que pueden sobrevivir en larvas, panales o materiales apícolas durante muchos años. Esta bacteria produce una enfermedad en larvas altamente contagiosa, denominada Loque Americana (Hansen y Broodsgaard, 1999). La Loque Americana es una enfermedad mundialmente distribuida, detectándose por primera vez en el Uruguay en el año 2000 por Piccini y Zunino (2001). A partir de esto se desarrolló una línea de investigación en el Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable dedicada al estudio de patógenos de interés apícola. En el año 2003 se comprobó que la bacteria estaba ampliamente distribuida en el país, con una prevalencia del 51% (Antúnez *et al.*, 2004) mientras que en un relevamiento llevado a cabo recientemente se observó que este porcentaje disminuyó significativamente a 2% (Antúnez *et al.*, 2012).

Otros patógenos que infectan *A. mellifera* son los virus ARN, se han descrito en la actualidad más de 18 virus; entre ellos se encuentran el virus de la parálisis aguda (ABPV), virus de la celda real negra (BQCV), el virus de las alas deformadas (DWV), virus de la cría ensacada (SBV) (de Miranda *et al.*, 2010; Genersch and Aubert, 2010), los que constituyen una gran amenaza para la apicultura. En Uruguay se han detectado los virus ABPV, BQCV, DWV y SBV mientras que los virus IAPV, KBV no se detectaron (Antúnez *et al.*, 2005; Antúnez *et al.*, 2006). El virus que se encuentra en mayor prevalencia en abejas uruguayas y con distribución más amplia es el virus de la celda real negra (BQCV) con una prevalencia del 90% (Matilde Anido, comunicación personal).

Varroa destructor es un ácaro ectoparásito que se reproduce en las celdas con cría de *A. mellifera*, causando daños letales en las colonias, tanto por su acción directa o

como vector de virus u otros microorganismos (Morse *et al.*, 1997). Este ácaro se encuentra ampliamente distribuido en Uruguay, y es necesario aplicar al menos un tratamiento de control anual (Matilde Anido, comunicación personal).

Acarapis woodi es un ácaro traqueal, parásito interno de las abejas melífera adultas. La infestación de abejas melíferas por este ácaro produce disminución de la zona de cría, pequeñas poblaciones de abejas, una disminución en el rendimiento de miel y en última instancia, la pérdida de las colonias (Eischen, 1987; Royce y Rossignol, 1989; Morse y Nowogrodzki, 1990; Otis y Scott-Dupree, 1992). En Uruguay, actualmente este parásito no se detecta (Villalba, 2012).

La distribución geográfica de los parásitos de abejas sugiere cuales de estos han prevalecido en la emigración de las abejas melíferas por todo el mundo. La ausencia de ciertos patógenos en algunos países, puede representar una barrera ambiental o una introducción reciente de las abejas melíferas (Royce y Rossignol, 1990a).

2.5.- Nosemosis

De acuerdo a lo nombrado previamente, la nosemosis es una enfermedad de las abejas adultas causada por dos especies de hongos microsporidios, *N. apis* y *N. ceranae* (Fries *et al.*, 1996; Higes *et al.*, 2006). Estos microsporidios son parásitos oportunistas formadores de esporas. *N. apis* fue descrita por Zander (1909), mientras que *N. ceranae* fue descrita sobre la abeja melífera asiática *Apis cerana*, por Fries *et al.*, (1996).

Durante décadas se consideró que *N. apis* era el único agente causal de la nosemosis en *A. mellifera* (Fries, 2010). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que *N. ceranae*, también parasita a la abeja melífera occidental (Fries *et al.*, 1996; Higes *et al.*, 2006) y que está relacionada con la pérdida de colonias (Higes *et al.*, 2006; Higes *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2008).

Cuando *A. mellifera* fue introducida en Asia hace unos 50 años, entró en contacto con las abejas nativas (*Apis cerana*, por ejemplo) y por lo tanto con sus parásitos, como *N. ceranae*, lo que podría haber tenido consecuencias para las infecciones de microsporidios (Martin-Hernández *et al.*, 2007). Actualmente, la

prevalencia mundial de *N. ceranae* es mayor que *N. apis* (Klee *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2007; Invernizzi *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2012).

Estudios como los de Klee *et al.*, (2007), Higes *et al.*, (2007) y Chen *et al.*, (2008) destacaron la alta patogenicidad que presenta *N. ceranae* en su nuevo huésped, *A. mellifera*. Las altas tasas de mortalidad de las abejas melíferas por *N. ceranae* están vinculadas a la presencia de esporas que facilitan la rápida división y la invasión del tejido digestivo afectando las células regenerativas del aparato digestivo (Martín-Hernández *et al.*, 2007).

Las abejas adultas se infectan con *Nosema* spp. ingiriendo alimentos o bebiendo agua contaminada. Las esporas germinan en el intestino medio de la abeja liberando su filamento tubular para trasladar su esporoplasma (el parásito infeccioso) a las células epiteliales del intestino medio donde se generan mayor número de esporas, liberándose a través de las heces y generando nuevas fuentes de infección para la colonia (Chen *et al.*, 2008). Una vez expulsadas, pueden permanecer viables en el campo durante más de un año (Fries, 1993). Se pueden encontrar millones de esporas nuevas dentro del intestino de una abeja en unas pocas semanas después de la infección inicial (Bailey y Ball, 1991). De esta manera, *Nosema* spp. afecta las funciones digestivas de la abeja, produciendo desnutrición, envejecimiento fisiológico y reducción de la longevidad de estas (Fries, 1997; Hornitzky, 2008). A nivel colonial, la infección por ambas especies de *Nosema* resulta en una disminución en la producción de miel, en la actividad de forrajeo y por lo tanto en la productividad de la polinización (Bourgeois *et al.*, 2009).

Mediante técnicas de PCR, se ha detectado el ADN de *N. ceranae* no solo en el sitio de infección primaria, intestino medio, sino también en los tejidos de las glándulas hipofaríngeas, glándulas salivales, túbulos de Malpighi y en la grasa corporal de abejas melíferas (Chen *et al.*, 2009).

Además del daño directo que causa *Nosema* spp. sobre las abejas, también puede incidir de manera indirecta por la presencia de otros patógenos, principalmente virus ARN (Bacandritsos *et al.*, 2010), ya que se ha encontrado que *N. ceranae* suprime el sistema inmune de *A. mellifera* exponiéndola a la infección por diversos parásitos oportunistas (Antúnez *et al.*, 2009; Chaimanee *et al.*, 2012).

En Sudamérica, la presencia de *N. ceranae* se ha verificado en Brasil (Klee *et al.*, 2007), Argentina (Sarlo *et al.*, 2008) y recientemente en Chile (Rodríguez *et al.*,

2012). En Uruguay, históricamente la nosemosis ha sido reconocida por la presencia de esporas a través de microscopía de luz, asumiendo a *N. apis* como el agente causal. Sin embargo, Invernizzi *et al.*, (2009) evidenciaron únicamente la presencia de *N. ceranae* en muestras de abejas infectadas de varias regiones del país. Además encontraron *N. ceranae* en una muestra colectada en 1990.

Mediante registros de casos de nosemosis de muestras de abejas enviadas por apicultores a la División de Laboratorios Veterinarios “Miguel Rubino” (DILAVE), se encontró que pese a las grandes fluctuaciones de la nosemosis encontradas entre los años 1964 y 2007, no se ha registrado un crecimiento a partir de los años '90, con la presencia de *N. ceranae* en el país (Invernizzi *et al.*, 2009). Este comportamiento es muy diferente al patrón epidemiológico encontrado en España en el período 1999-2005 caracterizado por un incremento notable de muestras positivas hasta superar el 90% del total (Martín-Hernández *et al.*, 2007).

N. ceranae ha sido detectado en muchos países alrededor del mundo (Klee *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2008; Invernizzi *et al.*, 2009; Bicandritsos *et al.*, 2010; Aurori *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2012), pero parece tener distintos efectos a nivel de las colonias en las diferentes regiones geográficas. Científicos de España propusieron que este patógeno es un factor importante en el CSD (Higes *et al.*, 2009b), mientras que investigadores de EE.UU, por otra parte, reportan que *N. ceranae* no contribuye significativamente al CCD (vanEngelsdorp *et al.*, 2009), ya que el rol que cumple este patógeno en colonias de EE.UU no es muy claro.

A diferencia de la alta virulencia de *N. ceranae* evidenciada en España, en Uruguay esto no ha sido reportado. Existen diferentes factores que podrían influir en esto, por un lado la presencia de diferentes razas de abejas, el tiempo de convivencia de estas últimas con el patógeno y las condiciones ambientales a las que se enfrentan (Invernizzi *et al.*, 2009).

2.6.- Similitudes y diferencias entre *N. ceranae* y *N. apis*

Las esporas de *N. ceranae* y *N. apis* presentan diferencias en cuanto a sus resistencias; las de *N. ceranae* son más resistentes a la desecación y tienen una mayor tolerancia térmica (Fenoy *et al.*, 2009). Por el contrario, *N. apis* presenta mayor

infectividad luego de ser congelado en comparación con *N. ceranae* (Fries y Forsgren, 2009). Sin embargo, se pudo evaluar que la pérdida de infectividad de *N. ceranae* no es tan drástica cuando se mantuvo en medio estándar (RPMI+10% DMSO) (Fenoy *et al.*, 2009).

N. ceranae se adecua mejor a completar su ciclo endógeno, con un mayor potencial biótico, a diferentes temperaturas comparado con *N. apis*, manifestando las diferencias epidemiológicas entre estas dos especies de *Nosema* ya que en condiciones de campo como también a nivel de la colonia (Martín-Hernández *et al.*, 2007, 2009).

Por otro lado, *N. ceranae* puede deprimir la respuesta inmune de la abeja, disminuyendo la expresión de péptidos antimicrobianos como abaecina e himenoptaecina, así como la enzima glucosa-deshidrogenasa. Esta inmunosupresión no se observa con la infección causada por *N. apis* (Antúnez *et al.*, 2009).

En cuanto a la estacionalidad, Fries (2010), determinó que la mayor prevalencia de *N. apis* ocurre durante la primavera antes de que las abejas de invierno sean reemplazadas por las abejas jóvenes. Por otro lado, *N. ceranae* carece de estacionalidad ya que puede ser detectada en muestras durante todo el año (Martín-Hernández *et al.*, 2007). Sin embargo, Antúnez *et al.*, (2012) encontraron que la prevalencia de *N. ceranae* aumenta hacia el invierno y disminuye hacia el verano. En condiciones donde las abejas vuelan durante todo el año, la variación de los niveles de infección podría depender de las condiciones climáticas y del estrés de las colonias (Pickard y El-Shemy, 1989; De la Rocque *et al.*, 2008).

A pesar de estas diferencias, las esporas de *N. apis* y *N. ceranae* son muy similares y apenas se pueden distinguir por microscopía óptica. En la ausencia de claras características morfológicas para el reconocimiento de estas especies, utilizar marcadores moleculares puede ayudar en el diagnóstico y la identificación de microsporidios de abejas. La técnica de PCR proporciona una prueba muy sensible para detectar la infección por estos microsporidios, ya que permite la detección del parásito en niveles muy bajos de infección y puede revelar todas las etapas de su ciclo de vida (Martín Hernández *et al.*, 2007).

2.7.- Control de *N. ceranae* y *N. apis*

La fumagilina es un antibiótico que ha probado ser eficaz contra ambas especies de *Nosema*, sin embargo este medicamento podría llegar a los humanos por su residualidad en la miel (Higes *et al.*, 2008a, 2009b; Higes *et al.*, 2010). La fumagilina es 100% eficaz contra la forma vegetativa de *Nosema* spp., pero no destruye las esporas del parásito, razón por la que la infección puede ser controlada pero no erradicada.

Debido a que el uso de este antibiótico no está permitido en los países europeos (Fries, 2010) y en Uruguay está restringido únicamente a los criaderos de reinas (MGAP, 2010), se están desarrollando alternativas para la prevención de la nosemosis. Un ejemplo son los productos naturales en base a extractos de hierbas como Protofil y Api-Herb entre otros, ya que tienen un potencial en el control de *N. ceranae* (Chioveanu *et al.*, 2004; Nanetti, 2009).

2.8.- Hipótesis

N. ceranae se encuentra, en la actualidad, ampliamente distribuida en muchos países en todo el mundo, probablemente reemplazando a *N. apis* en *A. mellifera*. El presente estudio estuvo dirigido a determinar la prevalencia y distribución de *N. ceranae* y *N. apis* en Uruguay, a partir de un muestreo de abejas especialmente diseñado teniendo en cuenta la distribución de colmenas en el país.

Las hipótesis de trabajo son:

1. *N. ceranae* es la única especie de *Nosema* presente en Uruguay.
2. Las zonas de mayor densidad de colmenas así como las zonas de mayor desarrollo de forestación de *E. gradis* presentan mayor prevalencia de *N. ceranae*.

3. OBJETIVO

El objetivo del presente estudio consistió en estudiar la prevalencia y distribución en Uruguay de los microsporidios: *N. ceranae* y *N. apis*.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

Esta pasantía de grado fue realizada en el marco del proyecto “Epidemiología de los principales patógenos de interés apícola en Uruguay”, FCE 1903, financiado por ANII.

4.1.- Obtención de muestras de abejas

Se trabajó con 103 muestras de abejas pecoreadoras de apiarios pertenecientes al Registro Nacional de Propietarios de Colmena del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, (tabla 1), colectadas en marzo del 2011, en el marco del proyecto antes mencionado. La selección de los apiarios a muestrear por departamento se realizó al azar en base a la densidad de colmenas y dentro de cada departamento los apiarios se escogieron al azar. Todos los muestreos se realizaron en marzo de 2011, durante un corto período de tiempo, por técnicos del DILAVE, MGAP. Cada muestra se fijó en alcohol etílico 70%.

4.2.- Extracción de ADN

Se homogeneizaron 20 abejas de cada muestra en 10 ml de agua destilada estéril durante 120 segundos. Dicha suspensión se centrifugó durante 6 minutos a 10.000 rpm en un tubo de centrifuga; descartándose el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 400 µl de agua destilada estéril.

La extracción de ADN de las preparaciones previamente descritas se llevó a cabo mediante un kit comercial (mini kit QIAmp® Viral ARN) siguiendo las instrucciones del fabricante modificando el volumen final de 60µl de elusión con buffer AVE a un volumen final de 40µl, y no se incorporó el ARN carrier.

4.3.- Cuantificación del ADN

Se estimó la cantidad de ADN extraído en cada muestra mediante la utilización de espectrofotometría UV/Vis (Nanodrop 1000). Para esto se tomaron alícuotas de 1µl de cada muestra y se estimó la concentración de ADN utilizando la ecuación de Lambert-Beer.

4.4.- Amplificación de ADN mediante PCR múltiple

Con el fin de determinar la presencia de *N. apis* y *N. ceranae* en estas muestras, se realizó la amplificación del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S mediante el ensayo de PCR *multiplex*, de acuerdo a lo descrito por Martín-Hernández *et al.*, (2007). En este ensayo se utilizó un juego de cebadores específico para la detección de cada microsporidio.

En cada reacción de PCR se trabajó con un volumen final de reacción de 50µl conteniendo 3µl de MgCl₂ 50mM, 5µl de buffer PCR 10X, 0.4µl de Taq ADN polimerasa (5U/µl), 2µl de dNTPs 10mM, 0.5µl de cada cebador a 40µM correspondiente a *N. ceranae* y a *N. apis* y 5µl de AND molde. El resto del volumen se completó con agua destilada estéril. Los cebadores empleados para *N. apis* fueron forward 5'-GGG GGC ATG TCT TTG ACG TAC TAT GTA- 3' y reverse 5'-GGG GGG CGT TTA AAA TGT GAA ACA ACT ATG-3' para amplificar un fragmento de 321 pb de *N. apis*, mientras que para *N. ceranae* se utilizaron los cebadores forward 5'-CGG CGA CGA TGT GAT ATG AAA ATA TTA A- 3' y reverse 5'-CCC GGT CAT TCT CAA ACA AAA AAC CG- 3' para amplificar un fragmento de 218-219 pb (Martín-Hernández *et al.*, 2007).

El protocolo empleado para el PCR consistió en una desnaturalización inicial de 94°C durante 2 minutos, seguido por 10 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 61.8°C durante 30 segundos y 72°C por 45 segundos. Luego se agregó 20 ciclos más del anteriormente descrito pero adicionando 5 segundos al último paso de cada uno de los 20 ciclos. Y, por último, una extensión final de 72°C por 7 minutos. Dichas amplificaciones se realizaron empleando un termociclador ESCO® Swift Mini™.

En cada corrida de PCR se emplearon controles positivos para *N. ceranae* y para *N. apis* y un control negativo (donde no se incorporó ADN). Como controles positivos se utilizaron muestras de ADN de estos microsporidios cedidos por el Dr. Mariano Higes, Centro Agrario de Marchamalo, España.

4.5.- Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2% en TBE 0.5X (Tris 10.8 g, ácido bórico 5.5 g, EDTA 0.5 M pH 8 4 ml por 100 ml), utilizando *Gene Ruler Fermentas 1Kb* como marcador de peso molecular, a 110 V. Posteriormente, los geles se tiñeron con bromuro de etidio 0.5 µg/ml, se visualizó mediante exposición a luz UV y se tomó su correspondiente fotografía a través de una cámara Kodak (DC290).

4.6.- Secuenciación

Para confirmar la identidad de los productos amplificados, tres de los productos obtenidos se enviaron a Macrogen (Corea) para su secuenciación. Posteriormente se realizó el análisis bioinformático de las secuencias obtenidas mediante el programa BLAST del *National Center for Biotechnology Information* donde se realizó la búsqueda de similitud de secuencias.

4.7.- Prevalencia y distribución geográfica de *N. apis* y *N. ceranae* en Uruguay

A partir de los datos obtenidos, se evaluó la prevalencia de cada especie de *Nosema* mediante el cálculo de frecuencia de aparición; es decir el número de veces que se detecta la presencia de *N. ceranae* y/o *N. apis*. Posteriormente se realizó el análisis de la distribución geográfica de *N. apis* y *N. ceranae*.

5. Resultados

5.1.-Extracción y cuantificación del ADN de cada una de las muestras

A partir de muestras de abejas de diferentes orígenes geográficos se realizó la extracción de ADN y posteriormente su cuantificación de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Los resultados hallados se muestran en la tabla 1.

5.2.- Detección de *N. ceranae* y *N. apis* mediante amplificación del gen ARNr 16S

Se empleó la técnica de PCR *multiplex* mediante el uso de cebadores específicos, para analizar la presencia de los microsporidios *N. apis* y *N. ceranae* en las diferentes muestras. Mediante esta técnica se logró obtener un fragmento de 218 pb, coincidiendo con el tamaño esperado para *N. ceranae* (Figura 1). Las muestras positivas se presentan en la tabla 1. En ninguna de las muestras analizadas se logró evidenciar el fragmento de 321 pb correspondiente a *N. apis*.

Tabla 1. Localización y Georreferenciación de los apiario donde se recolectaron las muestras de abejas, se indica la concentración de ADN (ng/ul) de cada una de ellas y la presencia o ausencia de *N. ceranae*.

Departamento y número de muestra	Latitud Sur	Latitud Oeste	Concentración de ADN (ng/ul)	Muestras positivas para <i>N. ceranae</i>
Artigas (1)	30° 25' 57,5"	56° 29' 31,2"	110	
Artigas (67)	30° 32' 58,2"	57° 33' 04"	141	
Colonia (33)	34° 15' 28,0"	57° 52' 44,7"	76	X
Colonia (34)	34° 17' 45,8"	37° 45' 41,7"	77	X
Colonia (17)	34° 16' 03,7"	57° 40' 22,4"	60	
Colonia (18)	34° 16' 49,0"	57° 34' 20,7"	60	
Colonia (26)	34° 17' 46,9"	57° 30' 43,4"	84	
Colonia (27)	34° 18' 26,9"	57° 48' 25,2"	113	
Colonia (30)	34° 13' 57,3"	57° 53' 10,0"	73	
Colonia (35)	34° 12' 53,1"	57° 49' 12,4"	142	
Colonia (38)	34° 12' 21,0"	57° 50' 20,0"	120	
Colonia (49)	34° 20' 49,4"	57° 36' 30,5"	146	
Colonia (58)	34° 17' 35,2"	57° 43' 13,6"	113	
Canelones (31)	34° 43' 47,68"	55° 47' 10,87"	119	
Canelones (36)	34°36' 32,84"	55° 50' 55,60"	98	

Resultados

Canelones (39)	34° 37' 19,39"	56° 01' 53,32"	185	
Canelones (42)	34° 42' 24,31"	55° 46' 32,29"	150	
Canelones (59)	34° 39' 41,34"	56° 03' 12,40"	84	
Cerro Largo (70)	32° 23' 36,47"	54° 13' 48,48"	57	
Cerro Largo (80)	32° 28' 51,52"	54° 04' 56,14"	48	
Durazno (43)	32° 22' 55,8"	56° 30' 47,5"	76	X
Durazno (63)	33° 21' 05,8"	56° 31' 30,7"	108	X
Durazno (60)	33° 20' 18,5"	56° 28' 37,9"	99	
Durazno (61)	33° 19' 43,7"	56° 26' 02,2"	149	
Flores (12)	33° 32' 17,9"	56° 52' 19,6"	159	
Flores (13)	33° 33' 49,6"	56° 56' 58,8"	95	
Flores (14)	33° 31' 04,8"	56° 49' 34,5"	80	
Flores (15)	33° 30' 09,8"	56° 56' 04,6"	30	
Flores (16)	33° 32' 40,80"	56° 54' 40,80"	178	
Florida (46)	33° 44' 13,1"	56° 18' 41,3"	154	X
Florida (24)	33° 41' 30,9"	56° 10' 16,1"	118	
Florida (44)	33° 43' 18,6"	56° 26' 12,7"	157	
Florida (45)	33° 47' 10,3"	56° 13' 36,8"	59	
Florida (47)	33° 33' 29,8"	56° 22' 11,5"	196	
Florida (64)	33° 51' 56,7"	56° 23' 07,2"	81	
Lavalleja (41)	34° 24' 38,08"	55° 21' 37,85"	58	
Maldonado (40)	34° 03' 58,17"	55° 08' 29,49"	122	
Montevideo (65)	34° 48' 27,07"	56° 03' 55,86"	160	
Paysandú (68)	32° 21' 49,0"	57° 52' 10,2"	45	X
Paysandú (86)	31° 59' 04,1"	57° 49' 59,8"	91	X
Paysandú (57)	31° 39' 46,6"	57° 53' 11,1"	129	
Paysandú (69)	32° 10' 07,3"	57° 58' 05,9"	103	
Paysandú (76)	32° 07' 00,6"	58° 01' 40,4"	90	
Paysandú (77)	32° 07' 39,1"	58° 00' 25,4"	64	
Paysandú (78)	32° 06' 45,9"	58° 01' 20,6"	91	
Paysandú (79)	32° 21' 43,3"	57° 55' 47,8"	16	
Paysandú (85)	32° 17' 18,4"	58° 03' 08,1"	73	
Paysandú (87)	32° 21' 41,5"	57° 55' 52,2"	21	
Paysandú (88)	31° 59' 43,2"	57° 50' 22,7"	95	
Paysandú (89)	31° 58' 48,5"	57° 50' 19,2"	96	
Paysandú (96)	32° 09' 54,4"	57° 58' 42,0"	39	
Paysandú (98)	32° 09' 50,7"	57° 57' 57,5"	91	
Río Negro (75)	32° 50' 11,1"	57° 34' 31,6"	115	X

Resultados

Río Negro (52)	32° 51' 30,0"	57° 27' 55,9"	93	
Río Negro (66)	32° 49' 48,0"	57° 34' 49,1"	188	
Río Negro (91)	33° 17' 50,2"	58° 16' 10,2"	50	
Río Negro (92)	33° 16' 36,6"	58° 16' 04,3"	52	
Río Negro (94)	33° 12' 16,2"	58° 16' 52,9"	117	
Río Negro (99)	33° 18' 39,7"	58° 16' 46,3"	42	
Río Negro (100)	33° 10' 54"	58° 17' 58,0"	103	
Río Negro (101)	33° 20' 31,1"	58° 17' 17,0"	64	
Río Negro (102)	33° 12' 03,6"	58° 17' 51,3"	63	
Río Negro (103)	33° 09' 50,1"	58° 19' 19,8"	85	
Rivera (2)	31° 12' 10,3"	55° 45' 10,1"	102	X
Rivera (7)	31° 08' 54,6"	55° 39' 11,3"	196	X
Rivera (10)	31° 07' 13,9"	55° 25' 53,9"	106	X
Rivera (3)	31° 14' 13,8"	55° 41' 25,6"	89	
Rivera (4)	31° 13' 23,4"	55° 45' 19,0"	285	
Rivera (5)	31° 13' 42,9"	55° 45' 12,8"	171	
Rivera (6)	31° 10' 05,7"	55° 39' 0,35"	361	
Rivera (8)	30° 56' 44,7"	55° 32' 33,4"	236	
Rivera (9)	31° 01' 17,7"	55° 30' 57,6"	163	
Rivera (11)	31° 08' 07,5"	55° 24' 00,9"	126	
Rocha (37)	34° 36' 7,03"	54° 08' 56,16"	163	
Rocha (48)	34° 34' 14,01"	54° 7' 37,79"	101	X
San José (19)	34° 21' 42,2"	56° 43' 58,1"	70	
San José (20)	34° 18' 19,7"	56° 52' 17,8"	91	
San José (21)	34° 14' 0,27"	56° 58' 38,2"	81	
San José (23)	34° 07' 02,7"	56° 59' 16,4"	56	
San José (28)	34° 24' 33,2"	56° 33' 55,2"	287	
San José (29)	34° 22' 38,7"	56° 40' 38,0"	58	
San José (32)	34° 25' 44,3"	56° 52' 32,1"	94	
San José (53)	34° 28' 58,7"	56° 54' 10,2"	123	
Salto (56)	31° 21' 17,1"	57° 56' 17,5"	65	X
Salto (54)	31° 21' 41,8"	57° 52' 31,4"	145	
Salto (55)	31° 20' 26,0"	57° 56' 35,3"	166	
Soriano (50)	33° 37' 29,0"	57° 40' 29,5"	93	X
Soriano (51)	33° 34' 59,3"	57° 40' 53,6"	119	
Soriano (62)	33° 44' 31,8"	57° 34' 15,4"	128	
Soriano (71)	33° 35' 40,4"	57° 44' 39,8"	60	
Soriano (72)	33° 21' 26,1"	58° 10' 21,5"	40	

Resultados

Soriano (73)	33° 27' 04,4"	57° 47' 28,7"	40	
Soriano (74)	33° 29' 17,9"	58° 03' 23,4"	35	
Soriano (81)	33° 24' 22,6"	58° 14' 46,7"	68	
Soriano (82)	33° 23' 43,4"	58° 19' 16,7"	115	
Soriano (83)	33° 32' 20,7"	58° 14' 45,3"	32	
Soriano (84)	33° 31' 05,5"	58° 04' 20,5"	85	
Soriano (90)	33° 35' 23,1"	57° 45' 02,3"	70	
Soriano (93)	33° 21' 04,5"	58° 10' 43,9"	61	
Soriano (97)	33° 35' 31,1"	57° 45' 39,8"	81	
Tacuarembó (121)	31° 59' 18,1"	55° 56' 08,8"	142	X
Tacuarembó (120)	31° 46' 02,3"	55° 58' 24,1"	177	
Treinta y Tres (95)	33° 08' 36,10"	54° 19' 03,82"	110	

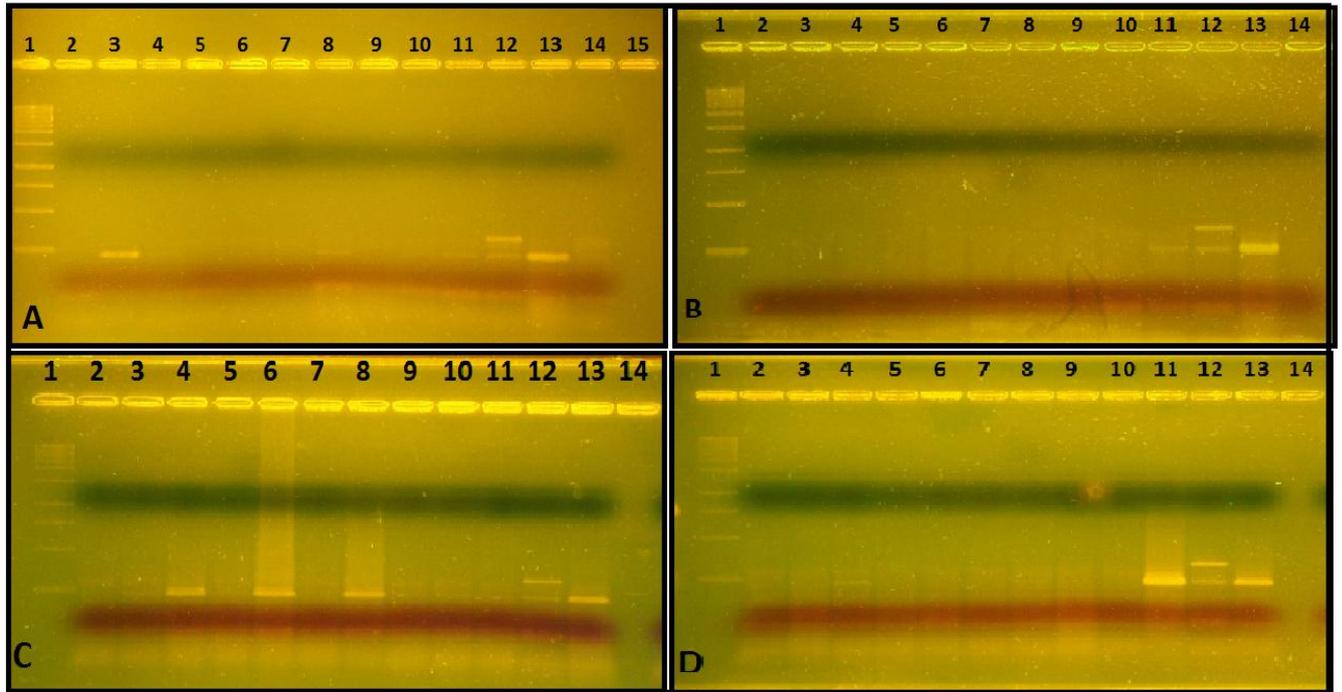


Figura 1. Amplificación de fragmentos del gen ARNr 16S de *N. ceranae* y *N. apis* utilizando cebadores específicos para estos microsporidios. El fragmento amplificado para *N. ceranae* se estimó en 218 pb y el de *N. apis* en 321 pb .En cada una de las cuatro figuras se demuestra el marcador de peso molecular en el primer carril.

A: carriles 2) Artigas (muestra N°.1) ; 3) Salto (muestra N°.56); 4) Canelones (muestra N°. 31).; 5) Maldonado (muestra N°. 40); 6) Flores (muestra N°. 12); 7) San José (muestra N°. 19); 8) Florida (muestra N°. 46); 9) Montevideo (muestra N°. 65); 10) Durazno (muestra N°. 63); 11) Soriano (muestra N°. 50); 12) Colonia (muestra N°. 35); 13) Control positivo para *N. apis*; 14) Control positivo para *N. ceranae* y 15) Control negativo. Capaz que entre paréntesis podes poner el número de muestra

B: carriles 2) San José (muestra N°. 28); 3) Lavalleja (muestra N°. 41); 4) Artigas (muestra N°. 67); 5) Treinta y Tres (muestra N°. 95); 6) Cerro Largo (muestra N°. 80); 7) San José (muestra N°. 20); 8) Flores (muestra N°. 15); 9) San José (muestra N°. 21); 10) Treinta y Tres (muestra N°. 95); 11) Colonia (muestra N°. 33); 12) Control positivo para *N. apis*; 13) Control positivo para *N. ceranae* y 14) Control negativo.

C: carriles 2) Treinta y Tres (muestra N°. 95); 3) Río Negro (muestra N°. 103); 4) Paysandú (muestra N°. 68); 5) Rocha (muestra N°. 51); 6) Tacuarembó (muestra N°. 121); 7) Rivera (muestra N°. 5); 8) Río Negro (muestra N°. 75); 9) Flores (muestra N°. 13); 10) Maldonado (muestra N°. 40); 11) Salto (muestra N°. 54); 12) Control positivo para *N. apis*; 13)Control positivo para *N. ceranae* ; 14) Control negativo.

D: carriles 2) Tacuarembó (muestra N°. 120) ; 3) Río Negro (muestra N°. 100); 4) Rivera (muestra N°. 10); 5) Paysandú (muestra N°. 78); 6) Soriano (muestra N°. 72); 7) Montevideo (muestra N°. 65); 8) Colonia (muestra N°. 30); 9) Lavalleja (muestra N°. 41); 10) Río Negro (muestra N°. 75); 11) Cerro Largo (muestra N°. 80); 12) Control positivo para *N. apis*; 13) Control positivo para *N. ceranae*; 14) Control negativo.

Se detectaron muestras positivas únicamente para *N. ceranae* en **A**: carriles 3, 8, 10 y 11. **B**: carril 11. **C**: carriles 4, 6 y 8. **D**: carriles 4 y 11. En las muestras correspondientes a los controles negativos, como se esperaba, no se evidenciaron bandas; mientras que para los controles positivos de *N. ceranae* y *N. apis* se logró observar bandas correspondientes a 218 y 321pb respectivamente.

5.3.- Identidad de los productos amplificados

Tres de los amplicones de *N. ceranae* obtenidos se secuenciaron y las secuencias obtenidas presentaron un alto porcentaje de similitud (99%) con la secuencia parcial del gen ARN ribosomal 16S de *N. ceranae*, de la cepa N063-10 obtenida en Italia. La alineación obtenida con una de las secuencias se muestra en la figura 3.

```

Query 1 CGGCGACGATGTGATATGAAAAATTAATTTGTATTACATAATAGAAATTTGAGTTTTTT 60
      |
Sbjct 1 CGGCGACGATGTGATATGAAAAATTAATTTGTATTACATAATAGAAATTTGAGTTTTTT 60

Query 61 GGCTCTGGGGATAGTATGATCGCAAGATTGAAAATTAAAGAAATTGACGGAAGAATACCA 120
      |
Sbjct 61 GGCTCTGGGGATAGTATGATCGCAAGATTGAAAATTAAAGAAATTGACGGAAGAATACCA 120

Query 121 CAAGGAGTGGATTGTGCGGCTTAATTTGACTCAACGCGAGGTAACCTACCAATATTTTAT 180
      |
Sbjct 121 CAAGGAGTGGATTGTGCGGCTTAATTTGACTCAACGCGAGGTAACCTACCAATATTTTAT 180

Query 181 TATTTTGAGAGAACGGTTTTTTGTTTGAGAATGACCGGG 219
      |
Sbjct 181 TATTTTGAGAGAACGGTTTTTTGTTTGAGAATGACCGGG 219
  
```

Figura 2. Secuencia parcial del gen ARN ribosomal 16S de *N. ceranae* de la cepa N063-10. *Query*: secuencia del amplicón; *Sbjct*: secuencia HM859898.

5.4.- Determinación de la prevalencia y distribución geográfica de *N. apis* y *N. ceranae* en Uruguay

A partir de los resultados obtenidos se analizó la prevalencia y distribución de *N. ceranae*. En primer lugar se calculó la frecuencia de ocurrencia por departamento, teniendo en cuenta el número de muestras positivas para cada departamento y el total de muestras extraídas en el mismo, los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Localización de muestras positivas para *N. ceranae*, número de muestras obtenidas por departamento y sus respectivas frecuencias de ocurrencia.

LOCALIZACIÓN	MUESTRAS TOTALES	MUESTRAS POSITIVAS	FRECUENCIA DE OCURRENCIA
Artigas	2	0	0,00
Colonia	11	2	0,18
Canelones	5	0	0,00
Cerro Largo	2	0	0,00
Durazno	4	2	0,50
Flores	5	0	0,00
Florida	6	1	0,16
Lavalleja	1	0	0,00
Maldonado	1	0	0,00
Montevideo	1	0	0,00
Paysandú	13	2	0,15
Río Negro	11	1	0,09
Rivera	10	3	0,30
Rocha	2	1	0,50
San José	8	0	0,00
Salto	3	1	0,33
Soriano	14	1	0,07
Tacuarembó	2	1	0,50
Treinta y Tres	1	0	0,00

Los departamentos que presentaron mayor frecuencia de ocurrencia de *N. ceranae* fueron Durazno, Rivera, Rocha, Salto y Tacuarembó. Mientras que para las muestras de abejas de los departamentos de Artigas, Canelones, Cerro Largo, Flores, Lavalleja, Maldonado, Montevideo, San José y Treinta y Tres no se detectó *N. ceranae*.

A nivel nacional se detectaron 15 muestras positivas para *N. ceranae* en un total de 103 muestras de abejas, lo que equivale a una frecuencia de ocurrencia de 0,150.

A partir de este dato se puede concluir que *N. ceranae* está presente en el 15,0% de los apiarios muestreados del Uruguay.

Para finalizar en la Figura 3, se muestra la ubicación geográfica de las muestras positivas para *N. ceranae* utilizando *Google Earth*.



Figura 3. Distribución geográfica de muestras positivas para *N. ceranae* en Uruguay.

A partir de los datos obtenidos de las frecuencias de ocurrencia por departamento, y construyendo rangos para estos valores, se plantearon en un mapa con diferentes colores según el rango de frecuencia, demostrando la prevalencia de *N. ceranae* en los distintos departamentos (Figura 4). Las zonas con mayor frecuencia de ocurrencia son los departamentos de Tacuarembó, Durazno, Rocha, Rivera y Salto. Mientras que en Artigas, Cerro Largo, Treinta y Tres, Lavalleja, Maldonado, Canelones, Montevideo, San José y Flores no se detectó *N. ceranae*.

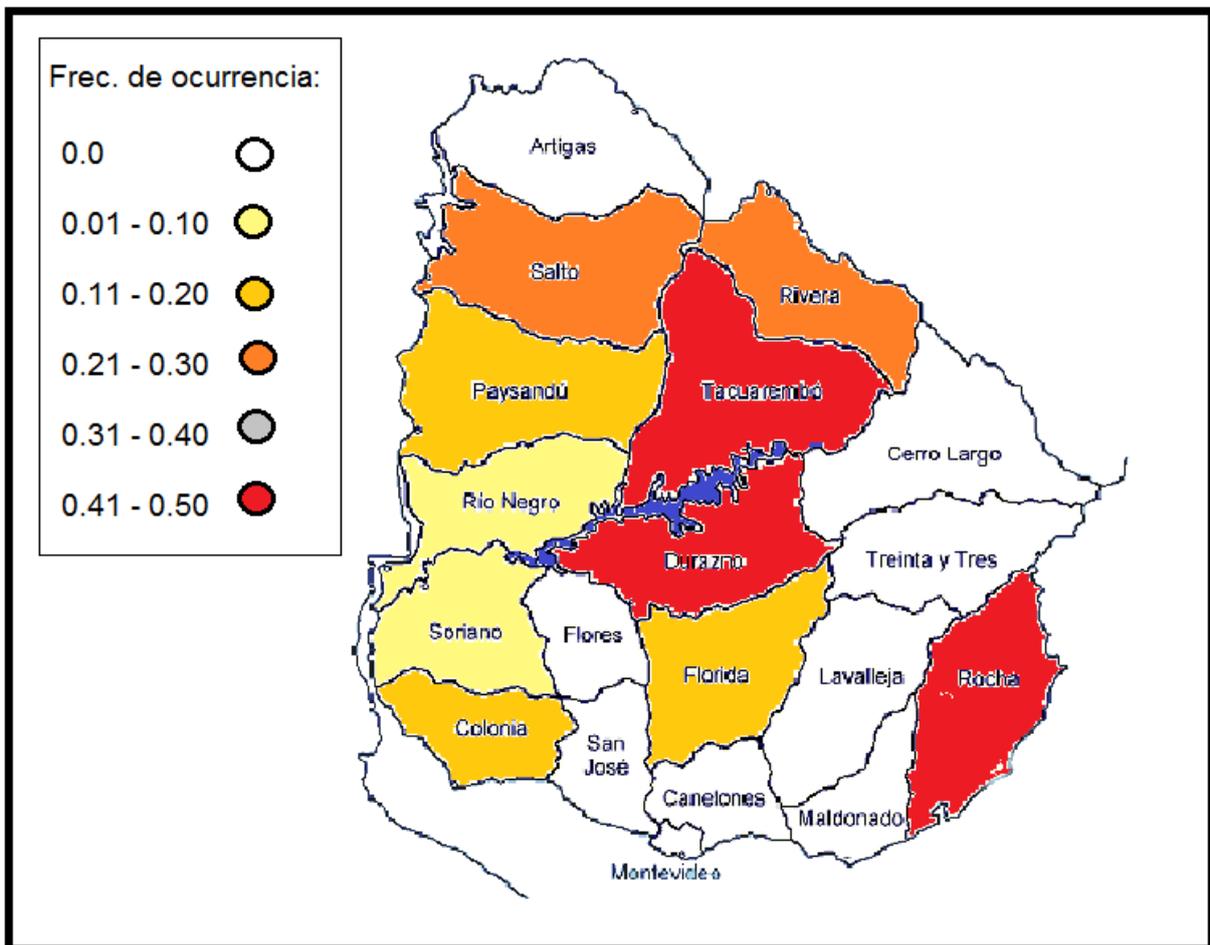


Figura 4. Prevalencia de *N. ceranae* en Uruguay.

6. Discusión

En los últimos años se ha evidenciado una devastadora pérdida de colonias de abejas en muchos países del mundo, especialmente en los países del hemisferio norte (vanEngelsdorp *et al.*, 2010), lo que lleva a que la identificación de los posibles factores responsables de esta pérdida sea el foco de muchos estudios científicos (Chen *et al.*, 2008; Higes *et al.*, 2005; Higes *et al.*, 2008; Neumann y Carreck, 2010).

En este sentido, se ha propuesto que el microsporidio *N. ceranae* podría estar implicado (Higes *et al.*, 2006; Potts *et al.*, 2010). Diversos estudios demostraron que un aumento en la pérdida de colonias de abejas estaría vinculado a un aumento en la frecuencia de ocurrencia de *N. ceranae*, como es en el caso de España (Martín-Hernández *et al.*, 2005; Martín-Hernández *et al.*, 2007; Botías *et al.*, 2012).

Detección de *Nosema* spp. en abejas pecoreadoras mediante PCR *multiplex*

En el presente trabajo se utilizaron abejas pecoreadoras para el análisis de presencia y prevalencia de *N. apis* y *N. ceranae*, ya que se ha visto que es el indicador más confiable para estimar el nivel de la nosemosis (Higes *et al.*, 2008; Hornitzky *et al.*, 2008; Higes *et al.*, 2010). Aunque recientemente se desarrolló un método para la detección de esporas de *N. apis* y de *N. ceranae* en mieles; la detección no es tan sensible (Botías *et al.*, 2012).

La técnica usada para la detección, PCR *multiplex*, proporciona una significativa mejora a la técnica convencional de PCR mediante la incorporación de múltiples cebadores que amplifican regiones de ADN de las dos especies de microsporidios simultáneamente en una sola reacción (Martín-Hernández *et al.*, 2007). Además es un método fiable, rápido, sensible, sencillo y específico para la detección de *N. apis* y *N. ceranae*. En este trabajo se utilizó un número de 20 abejas pecoreadoras por muestra, ya que según Botías *et al.*, (2012), la sensibilidad de la técnica es muy alta (25 esporas detectados en 150 μ l de abeja macerado). De todos modos, estos investigadores proponen que el tamaño de muestra es un factor que contribuye a las

diferencias obtenidas entre distintos estudios de la prevalencia para estos microsporidios, y recomienda emplear 100 abejas por muestra.

Prevalencia de *N. ceranae* en diferentes países

En Uruguay, Invernizzi *et al.*, (2009) lograron detectar *N. ceranae* en muestras históricas (colectadas desde el año 1990) de los diferentes departamentos de este país con síntomas clínicos de nosemosis; no encontrando muestras infectadas con *N. apis*. Este es el primer trabajo en el que se estudió la presencia y prevalencia de estos patógenos, utilizando muestras recolectadas al azar de todos los departamentos del país, sin tener en cuenta la presencia o no de síntomas de nosemosis, lo que permite llevar a cabo un estudio de prevalencia real y distribución de *N. apis* y *N. ceranae*. En este caso, se detectó la presencia de *N. ceranae* mientras que no se encontraron muestras positivas para *N. apis*. A nivel nacional, la prevalencia de *N. ceranae* en abejas, según los resultados de este estudio, es relativamente baja (15,0%) si se compara con España, donde se ha evidenciado un aumento progresivo en la detección de esporas de *Nosema* spp. entre los años 2003-2005 a partir de muestras de abejas adultas enviadas al Laboratorio de Patología Apícola (Centro Regional Apícola, CAR) por apicultores de diferentes regiones. El porcentaje de muestras positivas para *N. ceranae* aumentó del 54.5% correspondiente al año 2003, a 95.6% en el año 2005 (Martín-Hernández *et al.*, 2007).

En cuanto a la información disponible en la región, en Chile, al analizar la prevalencia y distribución de *N. apis* y *N. ceranae* en muestras de abejas de *A. mellifera* colectadas al azar entre la primavera de 2010 y verano de 2011, en la región de Biobío, donde se concentra el 42% de la producción nacional de miel, se encontró una prevalencia del 49% para *N. ceranae*, no detectándose *N. apis* (Martínez *et al.*, 2012). En Argentina, investigadores del Laboratorio de Artrópodos de la Universidad Nacional de Mar del Plata detectaron la presencia de *N. ceranae* en la región del Sudeste de la provincia de Buenos Aires (Sarlo *et al.*, 2008). Este laboratorio cuenta con registros de nosemosis que no concordaban con los síntomas a nivel de colonia descriptos para

N. apis, pero si con los presentados recientemente para *N. ceranae*, mortalidad sin deyecciones y desabejados masivos (Sarlo, 2008).

Calderón *et al.*, (2007) estudió la prevalencia de *Nosema* spp. en muestras de abejas melíferas adultas de Costa Rica colectadas al azar en los meses de agosto a diciembre de 2006; obteniendo una prevalencia de 28%.

En un trabajo realizado en China utilizando técnicas moleculares se logró detectar la presencia de *N. ceranae* en muestras de abejas colectadas en 12 apiarios diferentes situados en 10 provincias y 2 municipios; mientras que no se evidenció la presencia de *N. apis* (Liu *et al.*, 2008). Del mismo modo, la detección de *N. apis* y *N. ceranae* en muestras de *A. mellifera* de diferentes regiones geográficas de EEUU entre 1995 y 2007 comprobaron que el 16% de las muestras estaban infectadas con *N. ceranae* mientras que *N. apis* no fue detectado. Por otro lado, estudios epidemiológicos descriptivos realizados en 2009, con la misma finalidad, pero para muestras de abejas de colonias con síntomas CCD y de colonias sanas; comprobaron que la tasa de infección de *N. ceranae* fue de un 55% y 50% para las colonias con síntomas CCD y colonias normales, respectivamente. La tasa de infección de *N. apis* fue de 29% para las colonias con síntomas CCD y 18% para las colonias normales (vanEngelsdorp *et al.*, 2009).

Un factor que podría haber influido en la baja prevalencia de *N. ceranae* encontrada en este trabajo en abejas uruguayas, puede haber sido el periodo en que fueron colectadas las muestras (marzo, finales del verano principio del otoño), debido a que en estudios previos se observó un aumento en la prevalencia de *N. ceranae* hacia el invierno (Antúnez *et al.*, 2012b). Como este trabajo se realizó en el marco del proyecto “Epidemiología de los principales patógenos de interés apícola en Uruguay”, donde se buscaba analizar la prevalencia de todos los patógenos de importancia apícola, fue necesario realizar los muestreos en esta época (marzo de 2011), dado que en marzo-abril se aplican acaricidas en todo el país y se perdería el dato de distribución y prevalencia de *V. destructor*.

Distribución de *N. ceranae* en Uruguay

En cuanto a la distribución de *N. ceranae* en Uruguay, los resultados hallados indican que el microsporidio no presenta la misma prevalencia en todo el territorio. Los departamentos en los que se detectó fueron Salto, Rivera, Paysandú, Tacuarembó, Rio Negro, Durazno, Soriano, Florida, Rocha y Colonia; que coinciden con las áreas de mayor forestación del país (Dirección General Forestal MGAP – FAO, 2010). A la vez, esto confirma lo reportado por Invernizzi *et al.*, (2011a), quienes describen que la nosemosis generalmente se presenta en colonias que se encuentran activas en otoño e invierno en las forestaciones de *E. grandis*.

Esta distribución también pueden ser producto de la posible resistencia de las distintas variantes genéticas de abejas presentes en el país a *N. ceranae* (Invernizzi *et al.*, 2009). En un estudio realizado recientemente en Uruguay, se vio que las abejas africanizadas (híbridos de *A. m. mellifera* y *A. m. scutellata*) y las abejas italianas (*A. m. ligústica*) presentan diferentes comportamientos en cuanto a producción y resistencia a este patógeno, siendo las abejas africanizadas más resistentes a este microsporidio y las que producen más miel (Mendoza, 2012).

Por otro lado, la distribución puede estar relacionada a la alta densidad de colmenas presentes en las zonas con mayor prevalencia, lo que facilitaría la dispersión del microsporidio.

Salto de huésped de *N. ceranae* y reemplazo de *N. apis*.

Las enfermedades emergentes a menudo están ligadas a la expansión en el rango de huésped que los parásitos o patógenos pueden explotar. No todos los parásitos introducidos pueden establecerse con éxito en nuevos lugares, debido a que deben poseer características que les confieran la capacidad de competir con las especies nativas en las infecciones mixtas (Chen *et al.*, 2008b). La invasión de una especie exótica en un ecosistema es considerado actualmente como una de las fuentes más importantes de pérdida de biodiversidad y puede incluso conducir a la erradicación de especies nativas (Deredec y Courchamp, 2003).

La plasticidad de las especies de patógenos a adaptarse a los nuevos factores no solo aumentará la probabilidad de su propagación, sino que también, consolidará la invasión de nuevos ecosistemas bajo diferentes condiciones ambientales (Higes *et al.*, 2010; Fries *et al.*, 2009).

Se acepta generalmente que la temperatura de la tierra se incrementa progresivamente y las consecuencias de este efecto en los ciclos de vida endógenos y externos de parásitos es un motivo de preocupación (Brooks y Hoberg, 2007).

Los cambios en el clima, también pueden afectar a la distribución de los agentes infecciosos (De la Rocque *et al.*, 2008).

Durante el mismo período en que el síndrome de despoblación de colonias de abejas fue detectado en países del hemisferio norte, *N. ceranae* parece haber colonizado *A. mellifera* (Martín-Hernández *et al.*, 2007), y ahora es frecuentemente detectado en colonias de abejas sanas y débiles (Cox-Foster *et al.*, 2007).

Diversos estudios confirman y amplían las observaciones de Fries *et al.*, (1996), Higes *et al.*, (2006, 2007) y Huang *et al.*, (2007) donde se planteaba que la infección de *N. ceranae* no se limita a su huésped original *A. cerana*. Uno de los ejemplos más elocuentes es un análisis realizado en Finlandia con muestras de diferentes antigüedades. En muestras pertenecientes a los años 1986-1995 sólo se identificó la presencia de *N. apis*; mientras que en muestras del 1998 al 2006 contenían infecciones mixtas de *N. apis* y *N. ceranae* o infecciones puras de *N. ceranae* (Paxton *et al.*, 2007). De hecho, desde ese momento ha aumentado el número de trabajos que confirman que *N. ceranae* ha sustituido a *N. apis* (Martínez *et al.*, 2012; Botías *et al.*, 2012; Klee *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Invernizzi *et al.*, 2009; vanEngelsdorp *et al.*, 2009; Calderon *et al.*, 2007) siendo cada vez mayor también, los trabajos donde no se detecta *N. apis* (Invernizzi *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2009; Bacandritsos *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2012). Esto se ha interpretado como el proceso de sustitución de un parásito por otro (Paxton *et al.*, 2007).

La introducción de *N. ceranae* inevitablemente ejerció un efecto competitivo contra el parásito original (*N. apis*) en *A. mellifera*. Se podría sugerir que *N. ceranae* tiene mejores mecanismos para combatir la inmunidad del huésped, y/o crece y se reproduce más rápido que *N. apis* (Chen *et al.*, 2008b).

El motivo principal de la rápida expansión de *N. ceranae* en *A. mellifera* es, probablemente, el comercio mundial de abejas vivas, razón que explica también la rápida propagación del ácaro *V. destructor* en todo el mundo (Martínez *et al.*, 2012).

La presencia de *N. ceranae* en la mayoría de los países europeos así como americanos sugiere que la colonización ha sido exitosa, pero todavía hay una falta de equilibrio entre el nuevo parásito y el nuevo hospedador (Chen *et al.*, 2008b).

Este trabajo confirma las hipótesis planteada, en la que se propuso que *N. ceranae* es la única especie del género *Nosema* presente en Uruguay y que las zonas de mayor densidad de colmenas así como las zonas de mayor desarrollo de forestación *E. gradis* presentan mayor prevalencia de *N. ceranae*. Lo que demuestra que la nosemosis es una enfermedad emergente en *A. mellifera* en Uruguay, por lo que es necesario estrechar la vigilancia sobre esta situación.

7. Perspectivas

Para el desarrollo de la apicultura de nuestro país, consideramos que es de vital importancia realizar muestreos nacionales regulares para determinar la prevalencia y distribución de los principales patógenos que afectan las abejas, ya que permite tener una visión amplia de la situación sanitaria de los apiarios.

El microsporidio *N. ceranae* es un patógeno exótico en Uruguay, lo que nos impulsa a buscar alternativas para su control. Dado que la única sustancia con eficiencia probada para su control, la fumagilina, no es de uso libre en el país es necesario buscar alternativas naturales, biológicas o químicas.

Por otro lado, sería importante desarrollar estudios sobre la presencia y distribución de variantes o haplotipos de *N. ceranae*, ya que se puede presumir que los diferentes haplotipos podrían contribuir a diferencias en la virulencia de este microsporidio.

8. Bibliografía

Allen, M.F., Ball, B.V., White, R.F., Antoniw, J.F. 1986. The detection of acute paralysis virus in *Varroa jacobsoni* by the use of a simple indirect ELISA. J. Apicult. Res. 25, 100– 105.

Anderson, D.I., Trueman, J. 2000. *Varroa jacobsoni* is more than one species. Exp. App. Acarol. 24,165–189.

Antúnez, K., D'Alessandro, B., Piccini, C., Corbella, E., Zunino, P. 2004. *Paenibacillus larvae larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey. J. Invertebr. Pathol. 86, 56-58.

Antúnez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E., Zunino, P. 2005. Detection of chronic bee paralysis virus and acute bee paralysis virus in Uruguayan honeybees. J. Invertebr. Pathol. 90, 69-72.

Antúnez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E., Ramallo, G., Zunino, P. 2006. Honeybee viruses in Uruguay. J. Invertebr. Pathol. 93, 67-70.

Antúnez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., Higes, M. 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). Environ. Microbiol. 11, 2284–2290.

Antúnez, K., Invernizzi, C., Zunino, P. 2011. Why massive honeybee losses do not occur in Uruguay? In: Nova Science, E.p. (Ed.) Bees: Biology, Threats and Colonies.

Antúnez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campá, J., Martín-Hernández, R., Higes, M., Zunino, P. 2012b. Informe Proyecto INIA- FPTA 258: Despoblación de colmenas: determinación de sus causas en Uruguay. Serie técnica de difusión. En prensa.

Antúnez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campá, J., Zunino, P. 2012a. American Foulbrood in Uruguay: Twelve years from its first report. *J. Invertebr. Pathol.* 110, 129-131.

Aurori, C. M., Dezmirean, D. S., Marghitas, L. A., Moritz, R. F. 2011. *Nosema apis* and *N. ceranae* in Western Honeybee (*Apis mellifera*) –Geographical Distribution and Current Methods of Diagnosis. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies.* 68, 63-70.

Bailey, L., Ball, B.V. 1991. *Honey Bee Pathology.* Academic Press, London, UK. 193 pp.

Becandritsos, N., Granato, A., Budge, G., Papanastasiou, I., Roinioti, E., Caldon, M., Falcaro, C., Gallina, A., Mutinelli, F. 2010. Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. *J. Invertebr. Pathol.* 105, 335-340.

Bourgeois, A., Rinderer, T., Beaman, L., Danka, R. 2010. Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in the honey bee. *J. Invertebr. Pathol.* 103, 53–58.

Botías, C., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A., Martínez-Salvador, A., De La Rúa, P., Meana, A., Higes M. 2012. *Res. Vet. Science* 93,150–155.

Brodsgaard, G., Ritter, J.W., Hansen, H., Brodsgaard, H. F. 2000. Interactions among *Varroa jacobsoni* mites, acute paralysis virus, and *Paenibacillus larvae* and their influence on mortality of larval honeybees in vitro. *Apidologie* 31, 543–554.

Brooks, D., Hoberg, E.P. 2007. How will global climate change affect parasites? *Trends Parasitol.* 23, 571–574.

Bowen-Walker, P.L., Martin, S.J., Gunn, A. 1999. The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera*) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *J. Invertebr. Pathol.* 73, 101–106.

Calderón, R.A., Fallas, N., Sánchez, L.A. 2007. Detección de enfermedades en abejas africanizadas en Costa Rica. *Cienc. Vet.* 25, 335-348.

Cantwell, G.E., Shimanuki, H. 1970. The use of heat to control *Nosema* and increase production for the commercial beekeeper. *Am. Bee J.* 110, 263.

Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Yanping., Evans, J. D., Pettis, J. S. 2012. Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *J. Insect. Physiol.* 58, 1090-1095.

Chen, Y., Evans, J., Smith, B., Pettis, S. 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J. Invertebr. Pathol.* 97, 186–188.

Chen, Y., Evans, J., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., Litkowski, A.M., Pettis, J.S. 2008b. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 101, 204-209.

Chen, Y., Evans, J., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., Litkowski, A.M., Pettis, J. 2009. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 101, 204–209.

Chioveanu, G., Ionescu, D., Mardare, A. 2004. Control of nosemosis-treatment with protofil. *Apiacta* 39, 31–38.

Cordara, J. J. 2005. La Historia de la Apicultura en el Uruguay (Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de la Empresa). Montevideo, Uruguay.

Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.-L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., vanEngelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S., Lipkin, W.I. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318, 283-287.

Crane, E. 1979. Capitulo 1 “La apicultura en el mundo presente y pasado”. En: Editorial Hemisferio Sur S.R.L. “La colmena y la abeja melífera”. Montevideo, Uruguay, 25-45.

De la Rocque, S., Rioux, J. A., Slingenbergh, J. 2008. Climate change: effects on animal disease systems and implications for surveillance and control. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 27, 339–354.

Deredec, A., Courchamp, F. 2003. Extinction thresholds in host–parasite dynamics. *Ann. Zool. Fennici.* 40, 115–130.

de Miranda, J. 2010. Genetic characterization of slow bee paralysis virus of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *J. General Virol.* 91, 2524–2530

DIGEGRA. Información del Sector Apícola a Nivel Nacional. 2012.

Downey, D.L., Higo, T.T., Winston, M.L. 2000. Single and dual parasitic mite infestations on the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect. Soc.* 47, 171–176.

Downey, D.L., Winston, M.L. 2001. Honey bee colony mortality and productivity with single and dual infestations of parasitic mite species. *Apidologie* 32, 567–575.

Eischen, F.A. 1987. Overwintering performance of honey bee colonies heavily infested with *Acarapis woodi* (Rennie). *Apidologie* 18, 293–304.

Evans, J.D., Schwarz, R.S. 2011. Bee brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends Microbiol.* 19, 614-620.

Fenoy, S., Rueda, C., Higes, M., Martín-Hernández, R., Aguila, C. 2009. High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6886–6889.

Fries, I. 1993. *Nosema apis* a parasite in the honey bee colony. *Bee World* 74, 5–19.

Fries, I., Feng, F., Da Silva, A., Slemenda, S. B., Pieniasek, N. J. 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *E. Journal of Protist.* 32, 356–365.

Fries, I. 1997. Protozoa. In: Morse, R.A. (Ed.), *Honey Bee Pests, Predators and Diseases*, 3rd ed. A.I. Root Company, Medina, Ohio, USA, pp. 57–76.

Fries, I., Imdorf, A., Rosenkranz, P. 2006. Survival of mite infested (*Varroa destructor*) honey bee (*Apis mellifera*) colonies in a Nordic climate. *Apidologie* 37, 564–570.

Fries, I., Forsgren, E. 2009. *Nosema ceranae* fungerar inte som *Nosema apis*. *Nosema ceranae* does not function as *Nosema apis*. *Bitidningen* 107, juni, pp. 20–21.

Fries, I. 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 103, S73–S79.

Genersch, E., Aubert, M. 2010. Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Vet. Res* 41, 54.

Hansen, H., Brodsgaard, C. J. 1999. American foulbrood: A review of its biology, diagnosis and control. *Bee World* 80, 5-23.

Higes, M. 2005. El síndrome de despoblamiento de las colmenas en España. *Vida Apícola*, 15–21.

Higes, M., Martín, R., Meana, A. 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J. Invertebr. Pathol.* 92, 93–95.

Higes, M., Garcia-Palencia, P., Martin-Hernandez, R., Meana, A. 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invertebr. Pathol.* 94, 211-217.

Higes, M., Martin-Hernandez, R., Botias, C., Bailon, E.G., Gonzalez-Porto, A.V., Barrios, L., Del Nozal, M.J., Bernal, J.L., Jimenez, J.J. 2008. Palencia P.G. & Meana A. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol.* 10, 2659-2669.

Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., Botías, C., García-Palencia, P., Meana, A. 2008a. Regurgitated pellets of *Merops apiaster* as fomites of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores. *Environ. Microbiol.* 5, 1374-1379.

Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A. V., García-Palencia, P., Meana, A., Del Nozal, M. J. 2009b. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ. Microbiol. Reports* 1, 110–113.

Higes, M., Martín-Hernández, R., Meana, A. 2010. *Nosema ceranae* in Europe: An emergent type C nosemosis. *Apidologie* 41, 375–392.

Higes, M., García-Palencia, P., Botías, C., Meana, A., Martín-Hernández, R. 2010. The differential development of microsporidia infecting worker honey bee (*Apis mellifera*) at increasing incubation temperature. *Environ. Microbiol. Reports* 2, 745-748.

Hornitzky, M. 2008. *Nosema* Disease. RIRDC Publication No 08/006. RIRDC Project No DAN-228^a.

Hung, A.C.F., Adams, J.R., Shimanuki, H. 1995. Bee parasitic mite syndrome: II. The role of *Varroa* mite and viruses. *Am. Bee J.* 135,702.

Hung, A.C.F., Shimanuki, H., Knox, D.V. 1996. The role of viruses in bee parasitic mite syndrome. *Am. Bee J.* 136, 731– 732.

Huang, W.F., Jiang, J.H., Chen, Y.W., Wang, C.H. 2005. Complete rRNA sequence of the *Nosema ceranae* from honeybee (*Apis mellifera*). <https://gra103.aca.ntu.edu.tw/gdoc/F90632004a.pdf> (Date: 2005-11-25).

Huang, W. F., Jiang, J.H., Chen, Y.W., Wang, C.H. 2007. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* 38, 30-37.

Invernizzi, C., Rodriguez., J.P. 2007. Mejora en la senidad de la cría en colonias de abejas (*Apis mellifera L.*) seleccionadas por comportamientos higiénico. Veterinaria 42, 9-13.

Invernizzi, C., Abud, C., Tomasco, I. H., Harriet, J., Ramallo, G., Campá, J., Katz, H., Mendoza, Y. 2009. Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. J. Invertebr. Pathol. 101, 150–153.

Invernizzi, C., Antúnez, K., Campá, J., Harriet, J., Mendoza, Y., Santos, E., Zunino, P. 2011a. Situación sanitaria de las abejas melíferas en Uruguay. Veterinaria 47, 15-27.

Invernizzi, C., Santos, E., García, E., Daners, G., Di Landro, R., Saadoun, A., Cabrera, C. 2011b. Sanitary and nutritional characterization of honeybee colonies in *Eucalyptus grandis* plantations in Uruguay. Archivos Zootecnia 60, 1303-1314.

Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D. Q., Chinh, T. X., Puerta, F., Ruz, J. M., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I., Paxton, R. J. 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. J. Invertebr. Pathol. 96, 1-10.

Liu, F., Wang, Q., Dai, P.L., Wu, Y.Y., Song, H.K., Zhou, T. 2008. Natural stripe of Microsporidia of honeybee in China, Chinese Bull. Entomol. 45, 963-966.

Martín-Hernandez, R., Meana, A., Higes, M. 2005. Increase of nosemosis prevalence in Spain. Acta Parasitol. Portug. 12, 50.

Martin-Hernandez, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A. M., Garrido-Bailon, E., Higes, M. 2007. Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied Environ. Microbiol.* 73, 6331–6338.

Martín-Hernández, R., Meana, A., García-Palencia, P., Marín, P., Botías, C., Garrido-Bailón, E., Barrios, L., Higes, M., 2009. Temperature effect on biotic potential of honeybee microsporidia. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2554–2557.

Martínez, J., Leal, G., Conget, P. 2012. *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. *Parasitol Res.* 111, 601–607.

Mendoza, Y., Díaz-cetti, S., Ramallo, G., Invernizzi, C. 2011. *Nosema ceranae*, Supplementary Protein and Spring Development in Colonies wich Produce Honey in *Eucalyptus grandis* Forest. 42nd International Apicultural Congress Apimondia. 21st to 25th September 2011. Buenos Aires - Argentina.

Mendoza, Y. 2012. Resistencia de las abejas melíferas frente al microsporidio *Nosema ceranae* en forestaciones de *Eucalyptus grandis*. Tesis de Maestria en Ciencias Agrarias. Facultad de Agronomía, UdelaR. Uruguay.

Ministerio de Agricultura y Pesca (MGAP). 2009. Censo anual estadístico agropecuario 2009.

Ministerio de Agricultura y Pesca (MGAP). 2010. Decreto presidencial 14_6_2010- Oxitetraciclina y Fumagilina- Retiro y/o limitación uso en Uruguay. [En línea]. Consultado el 12 de diciembre 2011. www.mgap.gub.uy.

Ministerio de Agricultura y Pesca (MGAP). 2011. Censo anual estadístico agropecuario 2011.

Morse, R.A., Nowogrodzki, R. 1990. Honey Bee Pests, Predators and Diseases. Second edition. Comstock, Ithaca.

Morse, R.A., Flottum, K. 1997. Honey Bee Pests, Predators and Diseases (Medine, Ohio, A.I. Root Co.), 718.

Morse, R.A., Calderone, N.W., 2000. The value of honey bee pollination the United States. Bee Culture 128.

Nanetti, A. 2009. ApiHerb as an alternative product to treat Nosema infection. Proc. Workshop “Nosema disease: lack of knowledge and work standardization” (COST Action FA0803) Guadalajara, www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online (accessed on 20 Nov. 2009).

Neumann, P., Carreck, N.L. 2010. Honey bee colony losses. J. Apicul. Research 49, 1-6.

Otis, G.W., Scott-Dupree, C.D. 1992. Effects of *Acarapis woodi* on overwintering colonies of honey bees (Hymenoptera: Apidae) in New York. J. Econ. Entomol. 85, 40–46.

Paxton, R. J., 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, 558-565.

Piccini, C., Zunino, P. 2001. American Foulbrood in Uruguay: isolation of *Paenibacillus larvae larvae* form larvae with clinical symptoms and adult honeybees and susceptibility to oxytetracycline. J. Invertebr. Pathol. 78, 176-177.

Pickard, R. S., El-Shemy, A. A. M. 1989. Seasonal variation in the infection of honeybee colonies with *Nosema apis* Zander. J. Apicul. Res. 28, 93–100.

Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E. 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. Trends in Ecology & Evolution 25, 345-353.

Rennie, J., White, P.B., Harvey, E.J. 1921. Isle-of-Wight disease in hive bees. The etiology of the disease. Trans. Roy. Soc. Edinb. 52, 737–755.

Rodriguez, M., Vargas, M., Gerding, M., Navarro, H., Antúnez, K. 2012. Viral infection and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) in Chile. J. Apicul. Res. In press.

Royce, L.A., Rossignol, P.A. 1989. Honey bee mortality due to tracheal mite parasitism. Parasitology 100, 147–151.

Royce, L. A., Rossignol, P. A. 1990a. Honey bee (*Apis mellifera*) mortality due to tracheal mite (*Acarapis woodi*) infestation. Parasitology 100, 147-151.

Ruffinengo S y Maggi M. Universidad Nacional de Mar del Plata, Difusión Jornada de Manejo Sanitario en Apicultura, 2007.

Sarlo, E., Medici, S.K., Braunstein, M., Eguaras, M. 2008. Presencia y distribución de *Nosema ceranae* en la región sudeste de la Provincia de Buenos Aires. In: Actas del Segundo Congreso Argentino de Apicultura, Mar del Plata, Argentina, Agosto 2008, p. 26.

Stokstad, E. 2007. Genomics. Puzzling decline of U.S. bees linked to virus from Australia. Science 317, 1304-1305.

vanEngelsdorp, D., Hayes, J., Underwood, R. M., Pettis, J. 2008. A Survey of Honey Bee Colony Losses in the U.S. Fall 2007 to Spring 2008. *PLoS ONE*, 3(12): e4071.

vanEngelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarry, D. R., Pettis, J.S. 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One* 4(8), e6481.

vanEngelsdorp, D., Meixner, M.D. 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.* 103 Suppl 1, S80-95.

Villalba, V. 2011. “Situación de la acariosis (*Acarapis woodie* R.) en apiarios de zonas con antecedentes de la enfermedad”. Trabajo de Tesis. Facultad de Veterinaria. UdelaR.

Zander, E. 1909. Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Munchener Bienenzeitung* 31, 196–204.