



MINISTERIO DE AGRICULTURA,
PESCA Y ALIMENTACIÓN

DIRECCION GENERAL
DE SANIDAD DE LA PRODUCCIÓN
AGROALIMENTARIA Y BIENESTAR ANIMAL
SUBDIRECCION GENERAL
DE SANIDAD E HIGIENE ANIMAL Y
TRAZABILIDAD

**PROTOCOLO DEL PROGRAMA DE VIGILANCIA
SOBRE LAS PÉRDIDAS DE COLONIAS DE
ABEJAS
2023-2024**

1. PRINCIPIOS GENERALES.....	4
1.1. Objetivos.....	4
1.2. Implementación	5
1.3. Definiciones preliminares	7
2. ENFERMEDADES Y TRANSTORNOS EN LOS APIARIOS	8
2.1. Mortalidad invernal de las colonias de abejas.....	8
2.2. Infestación por <i>Varroa destructor</i> y varroosis.....	11
2.2.1. Tasa de infestación por <i>Varroa destructor</i>	11
2.2.2. Varroosis	13
2.3. Virus de las alas deformadas (DWV), virus de la parálisis aguda (ABPV)	16
2.4. Nosemosis	18
2.5. Parálisis crónica.....	22
2.6. Loque americana y loque europea	25
2.6.1. Loque americana.....	25
2.6.2. Loque europea	27
2.7. Parásitos exóticos: <i>Aethina tumida</i> y <i>Tropilaelaps spp.</i>	30
2.7.1. <i>Aethina tumida</i>	30
2.7.2. <i>Tropilaelaps spp.</i>	33
2.8. Intoxicaciones por pesticidas... ..	35
3. MÉTODO PRÁCTICO PARA LA IMPLEMENTACIÓN DEL PROTOCOLO	38
3.1. Muestreo y selección de las colonias	38
3.1.1. Número de colonias a muestrear	38
3.1.2. Selección de las colonias	38
3.2. Calendario de visitas.....	39
3.3. Síntomas clínicos, muestras y solicitud de análisis	39
3.4. Curso práctico de las visitas	48
3.4.1. Visita 1 antes del periodo invernal	48
3.4.2. Visita 2 después del periodo invernal.....	49

ANEXO I: Selección de las colmenas dentro de un colmenar de forma Simple Aleatoria	51
ANEXO II: INSTRUCCIONES PARA LA TOMA, IDENTIFICACIÓN, EMBALAJE, CONSERVACIÓN Y ENVÍO DE MUESTRAS	53
ANEXO III: LISTADO DE EQUIPO PARA LA VISITA	57

1. PRINCIPIOS GENERALES

1.1. Objetivos

Los objetivos del programa de vigilancia piloto son proponer procedimientos de vigilancia que permitan llevar a cabo una estimación adecuada de las pérdidas de colonias de abejas a nivel nacional.

Además, el programa de vigilancia da soporte a la implementación de estudios de prevalencia en las principales enfermedades y desórdenes de las abejas. El protocolo estimará la incidencia siguiendo procedimientos armonizados utilizando indicadores epidemiológicos comunes.

Los objetivos de esta investigación están encaminados a:

- Estimar la tasa de mortalidad invernal de las colonias de abejas.
- Estimar la tasa de infestación por *Varroa destructor* tanto en la primera visita otoñal como en la de primavera.
- Estimar la prevalencia clínica de las principales enfermedades de las abejas antes y después de la estación invernal: Loque americana, loque europea; varroosis, nosemosis, virus DWV, virus ABPV y virus de la parálisis crónica (CBPV).
- Asegurar una alerta temprana en el caso de la detección de dos artrópodos exóticos, *Aethina tumida* y *Tropilaelaps spp.*
- Censo de los apiarios con elevado riesgo de introducción de artrópodos exóticos.
- Vigilancia de los casos de intoxicación por pesticidas recogidos en la Directiva 2010/21/UE de la Comisión de 12 de marzo de 2010 por la que se modifica el anexo I de la Directiva 91/414/CEE por lo que respecta a las disposiciones específicas relativas a la clotianidina, el tiametoxam, el fipronil y el imidacloprid, con posibilidad de ampliar la vigilancia a otras sustancias activas para verificar la exposición real de las abejas a las mismas.

1.2. Implementación

El programa de vigilancia sobre la mortalidad de las colonias de las abejas se basa en una **vigilancia activa** apoyada en las visitas llevadas a cabo en un periodo específico por inspectores apícolas, adecuadamente formados, sobre un número representativo de colmenares seleccionados.

Para el resto del documento, por **inspector apícola** se entenderá el agente sanitario, veterinario de A.D.S apícola/asociación de apicultores, veterinario oficial o cualquier otra persona oficialmente encargada de la realización de las visitas a los apiarios.

Las visitas se llevarán a cabo en diferentes periodos, en el **intervalo máximo de un mes**, con el objetivo de obtener resultados comparables. Cada CCAA, dada la diversidad climatológica a nivel nacional, definirá el mejor mes para la realización del muestreo en su comunidad:

- *Otoño de 2023*: visita antes del periodo invernal (septiembre, octubre).
- *Primavera 2024*: visita al final del periodo invernal/inicio de la primavera (febrero, marzo, abril).

Población objetivo del muestreo:

En otoño de 2023 se seleccionarán al azar “**x colmenares**” por unidad geográfica. (Ver Programa de vigilancia sobre las pérdidas de colonias de abejas 2023-2024).

- Al menos 2/3 de los colmenares se seleccionarán de nuevo al azar.
- 1/3 de los colmenares podrán ser seleccionados de los colmenares que participaron durante el programa 2022-2023.
- Se descartarán apiarios con un número igual a una colonia de abejas.

Es importante que, una vez seleccionados los colmenares, **se envíen los códigos REGA** de las explotaciones al Laboratorio Central de Veterinaria (LCV) del MAPA en Algete, con objeto de que se pueda tener conocimiento y previsión del total de muestras que serán recibidas, y de este modo mantener una trazabilidad de cada colmenar.

2023-2024	Nº apiarios totales objeto de vigilancia	Nº apiarios elegibles de los participantes en la anterior campaña (1/3)	Nº de apiarios de nueva selección (2/3)	Nº total de visitas
ANDALUCÍA	44	15	29	88
ARAGÓN	10	3	7	20
ASTURIAS	2	0	2	4
ISLAS BALEARES	0	0	0	0
CANARIAS	2	0	2	4
CANTABRIA	2	0	2	2
CASTILLA - LA MANCHA	14	5	9	28
CASTILLA Y LEÓN	32	10	22	64
CATALUÑA	8	3	5	16
EXTREMADURA	36	12	24	72
GALICIA	8	3	5	16
MADRID	2	0	2	4
MURCIA	8	0	8	16
NAVARRA	2	0	2	4
PAÍS VASCO	3	0	3	6
LA RIOJA	2	1	1	4
VALENCIA	32	0	32	64
TOTALES	207	52	155	414

Tabla 1: Colmenares a muestrear por CCAA

Dentro de cada colmenar seleccionado se elegirán “**y colonias**” al azar (tabla 2) durante la primera visita en otoño que permita detectar la prevalencia del 20% con una confianza del 95% (Ver anexo I).

Censo colmenas	Muestra 95/20
≤ 8	todas
9-10	8
11-20	10
21-30	11
31-60	12
>61	13

Tabla 2: colmenas inspeccionadas al azar según el tamaño del colmenar

Los mismos colmenares y colonias serán visitados durante las dos visitas.

1.3 Definiciones preliminares

- **Apicultor:** persona física o jurídica, propietario o titular de una o varias colmenas.
- **Abeja:** abeja doméstica (*Apis mellifera*).
- **Colonia de abejas:** grupo de abejas criadas con el objetivo de producir miel u otros productos de las colmenas.
- **Colmena:** la unidad de hábitat de una colonia de abejas
- **Apiario/Colmenar:** Colmena o grupo de colmenas cuyo manejo permite considerarlo como una única unidad epidemiológica.

2. ENFERMEDADES Y TRASTORNOS EN LOS APIARIOS DURANTE LAS VISITAS

NOTA: A efectos del cálculo de prevalencia de enfermedades no se considerarán los apiarios:

- Que hayan tenido una mortalidad del 100% de las colonias seleccionadas al azar y no se hayan tomado muestras para investigar la causa de mortalidad.
- Que hayan vendido o cedido la totalidad de las colonias.
- Sobre los que no se ha realizado la visita.

2.1. Mortalidad invernal de las colonias de abejas

▪ Objetivos.

Estimar la tasa de mortalidad invernal.

▪ Definición de caso de mortalidad invernal de colonia de abejas.

Una colonia de abejas se considera que ha sufrido mortalidad invernal si:

- Durante la visita de otoño de 2023 (antes del periodo invernal), la colonia se registró como viva por el inspector apícola.
- Durante la visita de primavera de 2024 (después del periodo invernal):
 - La colonia presenta algunas abejas pero se considera no viable (casi muerta: menos de 500 abejas en la colonia) y no tiene el vigor suficiente para desarrollarse durante el periodo activo de pecoreo, según la experiencia del inspector.
 - **○** la colonia de abejas se encuentra en una de estas situaciones:
 - todas las abejas están muertas en el interior de la colmena;
 - todas las abejas están muertas y la colmena está vacía;
 - la colonia de abejas está sin reina y presenta abejas obreras ponedoras sin oportunidad de criar una nueva

Con el objetivo de evaluar la tasa de mortalidad invernal, la visita realizada después del periodo otoñal **deberá realizarse con la suficiente prontitud**, antes del gran incremento de población característico de las abejas que tiene lugar en primavera. La fecha deberá adaptarse a las condiciones meteorológicas de las áreas objeto de vigilancia.

■ Observaciones durante la primera visita (otoño de 2023)

- Para conseguir una buena organización durante la visita: debe preguntarse al apicultor cualquier información acerca de la actividad apícola necesaria para establecer una fecha adecuada para la visita.
- Se recomienda rellenar la parte sobre datos generales del formulario de inspección antes de comenzar la inspección.
- Anotar el número total de colonias presentes en el colmenar.
- Dibujar un croquis del asentamiento (recomendable).
- Seleccionar una muestra al azar de **“y colonias”** e identificarlas claramente y de forma indeleble (tabla 2). Se sugiere la utilización de *crotales* para ello con la identificación individual que se fijará en la cámara de cría de la colmena.
- Abrir las colonias seleccionadas y rellenar la parte del formulario que corresponde a la inspección de las colmenas. Deberá realizarse con especial atención dado que se trata de una información crucial para los siguientes análisis de datos.
- Si la colonia seleccionada al azar se considera que está muerta se elegirá otra colmena al azar con el objetivo de alcanzar el número total de colmenas objeto de muestreo. En este caso, la determinación de que una colonia esté muerta o no la realizará el apicultor/inspector apícola conforme a su experiencia.
- En el resto de casos (colmenas débiles) se mantendrán en el muestreo.

Nota importante: no es adecuado descartar ninguna colonia que esté en malas condiciones incluso si el inspector piensa que la colonia no sobrevivirá el invierno. Si no se hace de esta manera se introducirá un sesgo en el muestreo.

■ Observaciones durante la segunda visita (primavera de 2024)

- Anotar el número total de colonias presentes en el colmenar.
- Abrir y examinar cada colmena seleccionada e identificada para el estudio.
- Rellenar el formulario para la visita 2.
- Por favor, también indicar en relación a las colonias seleccionadas:
 - El número de colonias que han sido vendidas, movidas del emplazamiento o partidas en el intervalo de estas visitas.
 - El número de colonias que se han unido entre las dos visitas especificando los motivos.

- El número de colonias muertas.

Nota importante: La *tasa de mortalidad observada por el apicultor* puede registrarse en el formulario tanto si está relacionada específicamente con el apiario como con la explotación apícola en general.

Por lo tanto, se registrarán dos tasas de mortalidad de las colonias de abejas:

- Una para las colonias que son objeto de muestreo (aquéllas que están identificadas).
- Una dada por el apicultor en relación tanto del apiario como de la explotación apícola en general.

■ **Desarrollo de datos:**

Indicador epidemiológico: número de colonias seleccionadas que sufre de mortalidad invernal (ver definición de caso) / Número de colonias muestreadas que fueron registradas vivas por el inspector apícola durante la primera visita (otoño 2023).

Esto se registrará *como tasa de mortalidad de las colonias por colmenar*.

2.2. Infestación por *Varroa destructor* y varroosis

■ Objetivos

- Evaluar la infestación en los colmenares por *Varroa destructor* durante la 1ª y 2ª visita (otoño y primavera).
- Evaluar la infestación de las colonias a nivel de colmenar por *Varroa destructor* durante la 1ª y 2ª visita (otoño y primavera).
- Estimar la prevalencia clínica de la varroosis durante las dos visitas.

2.2.1. Tasa de infestación por *Varroa destructor*

■ Definición de caso

Una colonia se considera infestada por *Varroa destructor* cuando al menos se ha encontrado una varroa en una muestra de una colonia de abejas.

Comentario: **Medida del grado de infestación por varroa.**

La infestación de la colonia se mide evaluando el número de ácaros varroa que se desprenden por 100 abejas adultas, de una muestra de al menos 300 abejas.

■ Información, muestras y observaciones

● Información sobre el tratamiento utilizado contra la varroosis:

- Nombre del producto comercial/ principio(s) activo(s).
- Fecha(s) de lo(s) tratamiento(s) realizados durante el año 2022.
- Modos de aplicación.

● Muestras

- Muestrear 300 abejas adultas en las colonias seleccionadas al azar, de uno o varios cuadros de cría sin opercular (**en la primera y segunda visita**)

- **Observación:** rellenar el formulario (XX) con los síntomas clínicos de varroosis observados (mirar más adelante la forma de presentación de la enfermedad).

- **Análisis laboratoriales**

Los ácaros varroa deben de contarse en las muestras de abejas recogidas del interior de la colmena, basado en el método de diagnóstico de la OIE. Este método se basa en el lavado de abejas con alcohol o agua con detergente para desprender los parásitos foréticos que se encuentran sobre las abejas.

https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.02.07_Varroosis.pdf

Nota importante: si durante la realización del cálculo de la tasa de parasitación por varroa en muestras de abejas se detectase la presencia de una reina se dará aviso inmediato al apicultor para que pueda reponerla lo antes posible para minimizar el perjuicio que pueda ocasionarse en la colonia de abejas.

- **Desarrollo de datos**

Indicadores epidemiológicos:

Tasa de infestación:

- Número de colmenares controlados infestados por Varroa destructor durante la visita/ Número total de apiarios controlados.
- Número de colonias infestadas por Varroa destructor durante la visita/ Número total de colonias muestreadas por colmenar.
- Número de varroas/ 100 abejas/ colonia.

Valoración de resultados:

Para la valoración de las tasas de infestación de *Varroa spp* se han considerado cinco niveles de gravedad en función de la infestación, tanto para apiarios como para colonias. No obstante, hay que tener en cuenta que no hay estándares europeos ni internacionales que hayan normalizado este parámetro para la época estudiada, por lo que su agrupación es una estimación de la gravedad:

1. Muy débil o nula: la tasa de infestación es inferior a 1 varroa en 100 abejas o no se ha detectado.
2. Débil: la tasa de infestación varía entre 1 y 5 varroas por 100 abejas.
3. Moderada: la tasa de infestación varía entre 5 y 10 varroas por 100 abejas.
4. Grave: la tasa de infestación varía entre 10 y 20 varroas por 100 abejas.
5. Muy grave: la tasa de infestación es superior a 20 varroas por 100 abejas.

2.2.2. Varroosis

■ Definición de caso

Un apiario se considera positivo si la varroosis ha sido diagnosticada en una o más colonias.

Sospecha:

Cualquier colonia que presente signos clínicos, **con o sin detección de parásitos** en la colonia, se considerará sospechosa de padecer varroosis.

- Signos clínicos en abejas adultas:
 - Presencia de ácaros de varroa sobre las abejas (varroas foréticas que también pueden verse sobre los panales) (figura 2).
 - Abejas con alas deformadas y/o alas atrofiadas (figura 4).
 - Abejas que presenten abdomen reducido.
- Signos clínicos en la cría de abeja:
 - Cría de abeja en mosaico/ cría salteada (ver figura 1). Síntomas Signos clínicos similares a la loque americana o loque europea.
 - Presencia de opérculos con pequeños agujeros (ver figura 6).
 - Presencia de parásitos (de color marrón en el caso de las hembras maduras, con estadios inmaduros de color blanquecino):
 - Sobre las abejas adultas (sólo hembras maduras) (figura 2).
 - En las celdillas y sobre las larvas de abejas (figuras 7 y 8).
 - Abejas muertas con alas deformadas en celdillas selladas/pupas muertas/abejas muertas emergiendo de las celdillas (sólo emerge la cabeza, con la lengua proyectada hacia fuera) (figuras 3 y 4).
 - Canibalismo en las larvas o pupas (figura 5).
 - Presencia de larvas de color marrón claro a marrón (ausencia de aspecto viscoso propio de la loque americana).
 - Larvas muertas secas.
 - Presencia de pupas de 5-7 días desoperculadas.



Figura 1: cría salteada o en mosaico



Figura 2: varroa forética



Figura 3: abejas muertas con la lengua proyectada



Figura 4: abejas con alas deformadas

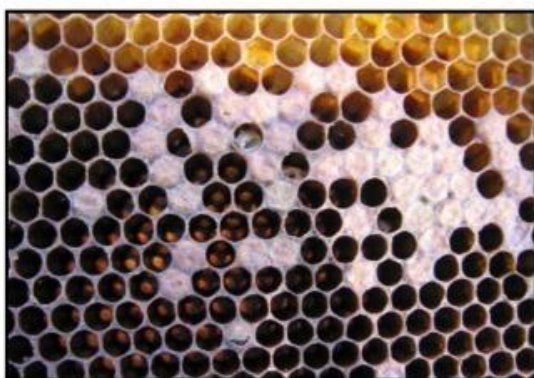
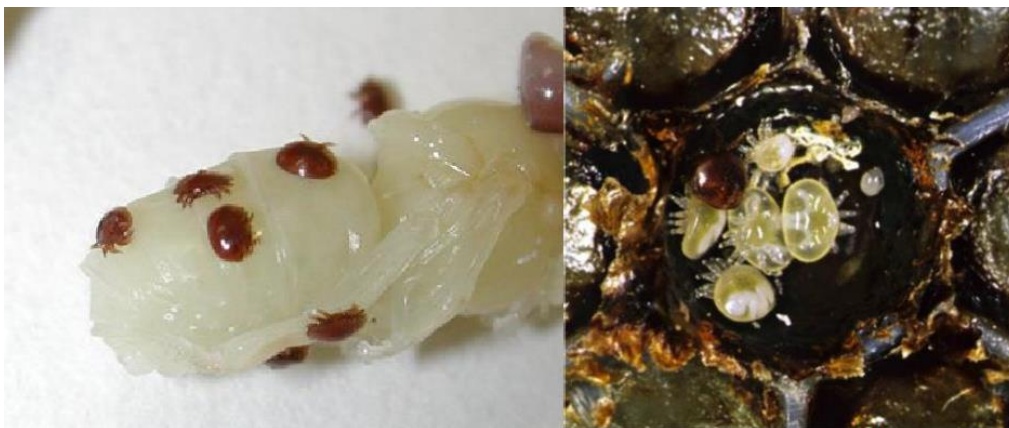


Figura 5: canibalismo de la larva o pupa



Figura 6: presencia de opérculos con pequeños agujeros



Figuras 7 y 8

Figura 7: larva de abeja parasitada con ácaros adultos (LCV Algete-MAPA).

Figura 8: familia de ácaros con la madre (ácaro marrón rojizo) y diferentes estadios de los descendientes en el fondo de una celdilla en la que se ha extraído la pupa de abeja. Photo: Denis Anderson

Nota importante: Algunos casos con signos clínicos de varroosis son similares a los signos ocasionados por la presencia de la loque americana o el ácaro *Tropilaelaps spp.* El registro de los datos clínicos observados debe realizarse lo más preciso y completo posible.

Confirmación:

Una colonia se considera que es positiva a varroa si a nivel de campo se registran signos clínicos típicos (ver forma de presentación de la enfermedad), y /o si un diagnóstico de laboratorio confirma la presencia del parásito (ver más adelante las condiciones para el muestreo).

En caso de enviar muestras al laboratorio para su confirmación, a efectos de prevalencia se considerará definitivo el resultado de laboratorio.

■ Muestras y observaciones

- Muestras de cría de abeja: el muestreo debería realizarse únicamente en caso de que se observen signos clínicos en la cría aunque no haya detección del ácaro varroa durante la observación (sospecha de otras enfermedades asociadas, por ejemplo loque americana, *Tropilaelaps spp.*):
 - Muestra de cría sintomática: trozo de panal de 10 x 10 cm².
 - Si el muestreo compromete la viabilidad de la colonia (por ejemplo, si la cantidad de cría es muy pequeña), podrán tomarse elementos de la muestra sintomática (por ejemplo larvas enfermas) en tubos Eppendorf.

- Observación: rellenar el formulario (XX) con los signos clínicos observados.

■ **Análisis laboratoriales:**

El diagnóstico laboratorial se basa en una aproximación sintomática: observaciones de campo combinado con el examen de muestras de cría.

Se deben de llevar a cabo análisis complementarios con el objetivo de buscar otras enfermedades asociadas.

■ **Desarrollo de datos:**

Indicadores epidemiológicos:

- Varroosis:
 - Número de apiarios que presentan varroosis/ número total de apiarios controlados.

2.3. Virus de las alas deformadas (DWV), virus de la parálisis aguda (ABPV)

■ **Objetivos**

- Estimar la prevalencia clínica de ABPV y DWV en los *colmenares*

■ **Definición de caso**

Se considera que un colmenar está infectado por DWV si cualquier colonia seleccionada presenta signos clínicos típicos y se ha confirmado laboratorialmente la presencia de DWV.

Se considera que un colmenar está infectado por ABPV si cualquier colonia seleccionada presenta signos clínicos típicos y se ha confirmado laboratorialmente la presencia de ABPV.

Sospecha:

Cualquier colonia que esté infectada con DWV y que presente signos clínicos compatibles con DWV es considerada sospechosa.

Cualquier colonia que esté infectada con ABPV y que presente signos clínicos compatibles con ABPV es considerada sospechosa.

Síntomas clínicos del DWV:

- Presencia de abejas con malformaciones, abdómenes reducidos, alas rotas (figuras 9 y 10).



Figura 9: abeja con alas rotas



Figura 10: abeja con alas deformadas
(fuente: LCV Algete)

Síntomas clínicos del ABPV:

- Las abejas presentan temblores, las abejas se arrastran.
- Abejas muertas delante de la colmena.
- Abejas negras y de pequeño tamaño, brillantes y sin pelo, rechazadas de la colmena por abejas guardianas (observación en la piquera) (figura 11).
- Piquera ocupada por un gran número de abejas.
- Diarrea.



Figura 11: abeja negra de pequeño tamaño, brillante y sin pelo, rechazadas de la colmena (fuente: LCV Algete).

■ Muestras y observaciones

Se recogerán en un recipiente aparte al menos 60 abejas adultas del interior (DWV) y del exterior (ABPV) de las colonias seleccionadas al azar, siempre que se detecten síntomas compatibles con estos virus.

■ Análisis laboratoriales

Se llevará a cabo la detección de DWV y ABPV por PCR. En el caso de sospecha de ABPV será necesario llevar a cabo el diagnóstico diferencial con el virus de la parálisis crónica (CBPV).

■ Desarrollo de los datos

Indicadores epidemiológicos:

- Número de colmenares que presentan DWV sobre número total de colmenares controlados.
- Número de colmenares que presentan ABPV sobre número total de colmenares controlados.

2.4. Nosemosis

■ Objetivo

- Estimar la prevalencia clínica de la enfermedad de nosemosis en los colmenares investigados.

■ Definición de caso

Se considera que un colmenar es positivo a nosemosis si cualquier colonia seleccionada presenta signos clínicos típicos y se ha detectado la presencia de *Nosema spp.*

Sospecha:

Cuando cualquier colonia seleccionada infestada por *Nosema spp* y presenta signos clínicos se considera sospechosa de padecer nosemosis.

Criterios sintomáticos:

- Presencia de abejas muertas delante de la colmena (figura 14).
- Presencia de abejas arrastrándose, subiendo por la hierba (figura 15).
- Restos de diarrea fuera o dentro de la colmena (figura 12 y 13).
- Despoblamiento.



Figura 12 y 13: restos de diarrea



Figura 14: Presencia de abejas muertas delante de la colmena

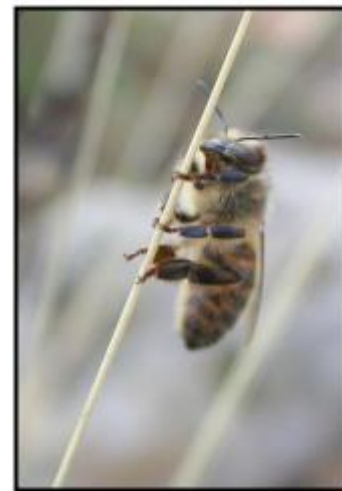


Figura 15: Abeja subiendo por la hierba

Photos © Anses por la hierba & Jean-Paul Faucon

Nota importante: algunos síntomas clínicos son similares a otras enfermedades tal como la parálisis crónica (CBPV).

Confirmación:

Una colonia se considera positiva a nosemosis si se registran signos típicos (ver forma de presentación de la enfermedad) y se han detectado y cuantificado esporos de *Nosema spp.* (figura 16).

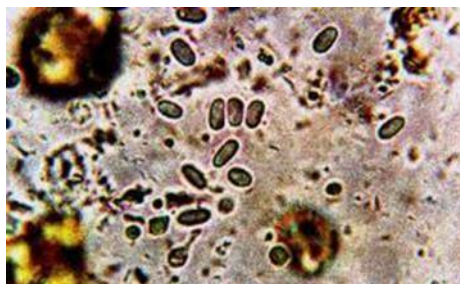


Figura 16: esporos de *Nosema spp.* (Fuente: LCV Algete)

■ Muestras/Observaciones

Muestras con síntomas: en el caso de que se sospeche la presencia de nosemosis (enfermedad). Se tomarán al menos 30 abejas sintomáticas o moribundas de la piquera.

En ausencia de suficientes abejas sintomáticas (menos de 10) y presencia de abejas muertas recientes (menos de una semana) pueden tomarse muestras de estas abejas y analizarse de forma independiente a las anteriores.

■ Análisis laboratoriales

Se llevará a cabo la detección y cuantificación de esporos de *Nosema spp* por microscopía óptica sobre las abejas según el método recogido por la OIE. Las muestras sintomáticas para estudio de *Nosema spp* se analizarán en pools según cuatro grupos: Pool A (1-3), Pool B (4-6), Pool C (7-9), Pool D (10-13).

https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.02.04_NOSEMO_SIS_FINAL.pdf

Se llevará a cabo la diferenciación de especies *Nosema apis* y *Nosema ceranae* por PCR.

Nota importante: el diagnóstico de la enfermedad de nosemosis se concluirá teniendo en cuenta la presencia de signos clínicos Y de los resultados analíticos de esta enfermedad.

Valoración de resultados:

Para la valoración de las tasas de infestación por *Nosema spp*. se han considerado seis niveles de gravedad en función de la infestación, tanto para apiarios como para colonias. A pesar de que en algunos estudios se establece que a partir de 1 millón de esporos por abeja *Nosema spp*. puede provocar daños sobre las abejas (Rennich et al, 2012), no hay estándares europeos ni internacionales que hayan normalizado este parámetro, por lo que su agrupación es una estimación de la gravedad:

1. No detectado: la tasa de infestación tiene valor cero.
2. Muy débil: la tasa de infestación es superior o igual a 1 espora e inferior a 100.000 esporas de *Nosema spp*. por abeja
3. Débil: la tasa de infestación es superior o igual a 100.000 esporas/abeja e inferior a 1.000.000 esporas de *Nosema spp*. por abeja.
4. Moderada: la tasa de infestación es superior o igual a 1.000.000 esporas/abeja e inferior a 2.500.000 esporas de *Nosema spp*. por abeja.

5. Grave: la tasa de infestación es superior o igual a 2.500.000 esporas/abeja e inferior a 5.000.000 esporas de *Nosema spp.* por abeja.
6. Muy grave: la tasa de infestación es superior o igual a 5.000.000 esporas de *Nosema spp.* por abeja.

■ Desarrollo de datos

Indicadores epidemiológicos:

- Número de colmenares que presentan nosemosis/ Número total de colmenares muestreados.
- No se tendrán en cuenta a efectos de prevalencia los apiarios en los que la toma de muestra haya sido "abejas vivas internas".

2.5. Virus de la parálisis crónica (CBPV)

■ Objetivos

- Estimar la prevalencia clínica del virus de la Parálisis crónica (CBPV)

■ Definición de caso

Un colmenar se considerará positivo si la parálisis crónica se ha diagnosticado en al menos una colonia.

Sospecha:

Cualquier colonia infectada con CBPV y que presente signos clínicos es considerada sospechosa de sufrir parálisis crónica.

Criterios sintomáticos (sospecha):

- Piquera ocupada por un gran número de abejas (figura 16).
- Las abejas presentan temblores, las abejas se arrastran.
- Abejas muertas delante de la colmena (figura 17).
- Abejas negras y de pequeño tamaño, brillantes y sin pelo, rechazadas de la colmena por abejas guardianas (observación en la piquera) (figura 18 y 19).
- Diarrea.



Figura 17: Piquera ocupada, abejas muertas delante de la piquera



Figura 18: Abeja negra, sin pelo de pequeño tamaño



Figura 19: abejas negras rechazadas en la piquera

Fuente: LCV Algete

Confirmación:

- Límite de detección/cuantificación del Dpto. Diagnóstico Molecular: $\geq 8 \times 10^3$ copias de genoma viral/abeja.

- Se denominará como CBPV probable o CBPV declarado cuando el nº de copias/abeja sea $\geq 10^6$ y no existan síntomas (probable) o sí los haya (declarado) (tabla 3).

RESULTADO LABORATORIAL	INTERPRETACIÓN
Negativo y $\leq 0,8 \cdot 10^4$	Virus no detectado
$> 0,8 \cdot 10^4$ y $< 1 \cdot 10^6$	Virus detectado
$\geq 1 \cdot 10^6$ y $< 1 \cdot 10^{10}$ Sin síntomas	CBPV probable
$\geq 1 \cdot 10^6$ y $< 1 \cdot 10^{10}$ Con síntomas	CBPV declarado
$> 1 \cdot 10^{10}$	CBPV declarado

Tabla 3: Criterios laboratoriales para declarar positivo una sospecha de CBPV

■ Muestras/Observaciones

Se deben muestrear al menos 30 abejas sintomáticas (con temblores) o abejas moribundas de la **piquera**.

En ausencia de suficientes abejas sintomáticas (menos de 10) se podrán recoger abejas muertas recientemente (menos de una semana), estas últimas deberán tomarse y analizarse de forma independiente a las muestras de abejas vivas.

■ Análisis laboratoriales

Se llevará a cabo por la detección y cuantificación de la carga viral por PCR a tiempo real.

Nota importante: la conclusión analítica dependerá de la carga viral por abeja Y de la presencia de signos clínicos.

■ Desarrollo de datos

Indicadores epidemiológicos:

Número de colmenares que padecen parálisis crónica/número total de colmenares controlados.

NOTA: No se tendrán en cuenta a efectos de prevalencia los apiarios en los que la toma de muestra haya sido "abejas vivas internas" (falsos negativos).

Nota importante: la sintomatología clínica de la parálisis crónica normalmente aparece durante la primavera y a comienzos del verano. Normalmente es una enfermedad esporádica y desaparece rápidamente. Por lo tanto, la observación de los colmenares por el apicultor es esencial para detectar de forma temprana sus

signos clínicos. El chequeo debería incluir un rápido pero cuidadoso examen de la piquera sin que sea necesario examinar el interior de la colmena.

2.6. Loque americana y loque europea

■ Objetivos

- Estimar la prevalencia clínica de la loque americana y la loque europea.

2.6.1. Loque americana

■ Definición de caso:

Un colmenar se considera positivo si la loque americana se ha detectado en al menos una colonia.

Sospecha:

Cualquier colonia seleccionada que presente signos clínicos se considera sospechosa de padecer loque americana.

Criterios sintomáticos (sospecha):

- Cría salteada/ Cría en mosaico (figura 20)
- Opérculos con colores diferentes/opérculos oscuros y hundidos/opérculos agujereados (figura 21, 22 y 23)
- Larvas de color café (figura 24)
- Larvas viscosas (prueba del palillo) (figura 25)
- Escamas pegajosas
- Olor agrio de las larvas enfermas

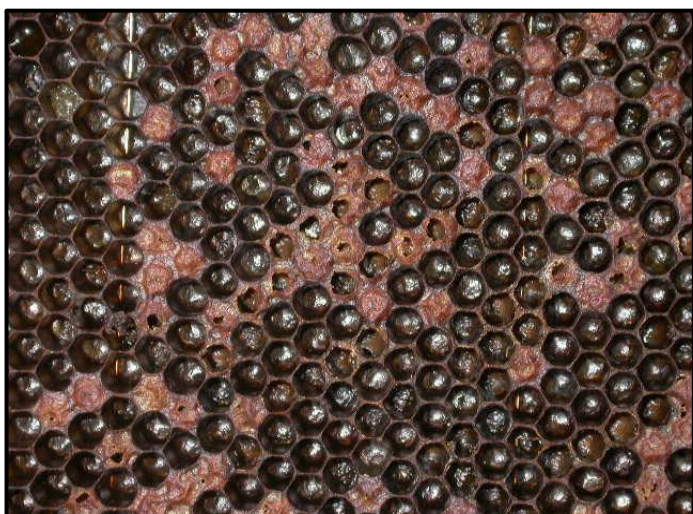


Figura 20: Cría salteada



Figura 21: Opérculos oscuros y hundidos



Figura 22: Agujeros en los opérculos



Figura 23: Opérculos oscuros y hundidos

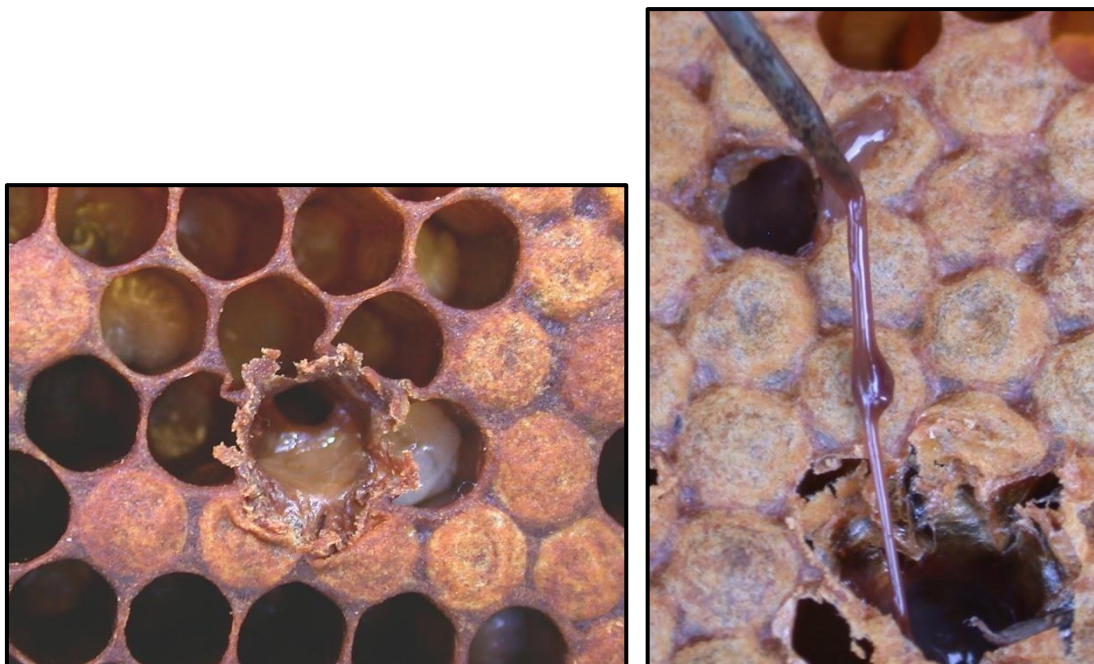


Figura 24 y 25: Prueba del palillo, larva viscosa

Photos © Anses & Jean-Paul Faucon

Confirmación:

Cualquier colonia que presente signos clínicos y esté infectada con *Paenibacillus larvae* se considera que padece loque americana.

■ **Muestras/Observaciones**

Muestrear cría con síntomas (trozo de panal con cría de 10 x 10 cm²) o, si este muestreo compromete la viabilidad de la colmena (presenta una pequeña cantidad de cría), sólo muestrear elementos que presenten síntomas (larvas enfermas) e introducirlos en tubos Eppendorf.

■ **Análisis laboratoriales**

La presencia de *Paenibacillus larvae* debería confirmarse por métodos bacteriológicos (microscopía óptica y cultivo de medios específicos). Si fuera necesario, este examen puede completarse con un análisis por PCR para identificar el agente patógeno de la loque americana.

El diagnóstico se realizará conforme al manual de diagnóstico de la OIE:

https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.02.02_Logue_americana.pdf

■ **Desarrollo de datos**

Indicadores epidemiológicos:

Número de colmenares positivos a loque americana/ número total de colmenares controlados.

2.6.2. Loque europea

■ **Definición de caso:**

Un colmenar se considera positivo si la loque europea se ha detectado en al menos una colonia.

Sospecha:

Cualquier colonia seleccionada que presente signos clínicos se considera sospechosa de padecer loque europea.

Criterios sintomáticos (sospecha):

- Cría salteada/ Cría en mosaico (figura 26).
- Presencia de larvas que se desprenden con facilidad (figura 27).
- Presencia de larvas de color amarillento a color marrón en **celdillas no operculadas** (figuras 28 y 29). Diagnóstico diferencial con Ascosferosis, que en sus primeros estadios presenta también estos síntomas.
- Opérculos agujereados (figura 30).
- Olor agrio de las larvas enfermas.



Figura 26: Larva desprendida en celdillas no operculadas

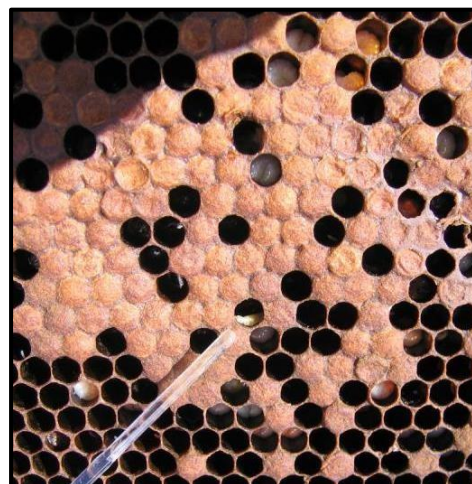


Figura 27: Larva desprendida



Figura 28: Larva de color marrón



Figura 29: larvas afectadas



Figura 30: larvas afectadas (Fuente: Ministerio de Agricultura y Alimentación de Australia)

Confirmación:

Cualquier colonia que presente signos clínicos y esté infectada con *Melissococcus plutonius* se considera que padece Loque europea.

■ **Muestras/Observaciones**

Muestrear cría con síntomas (trozo de panal con cría de 10 x 10 cm²) o, si este muestreo compromete la viabilidad de la colmena (presenta una pequeña cantidad de cría), sólo muestrear elementos que presenten síntomas (larvas enfermas) e introducirlas en tubos Eppendorf.

■ Análisis laboratoriales

La presencia de *Melissococcus plutonius* debería confirmarse por métodos bacteriológicos (microscopía óptica y cultivo de medios específicos). Si fuera necesario, este examen puede completarse con un análisis por PCR para identificar el agente patógeno de la loque europea.

El diagnóstico se realizará conforme al manual de diagnóstico de la OIE:

https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.02.03_Loque_europea.pdf

■ Desarrollo de datos

Indicadores epidemiológicos:

Número de colmenares positivos a loque europea/ número total de colmenares controlados.

2.7. Parásitos exóticos: *Aethina tumida* y *Tropilaelaps spp.*

■ Objetivos

- Asegurar la alerta precoz en caso de detección de estos dos artrópodos exóticos, *Aethina tumida* y *Tropilaelaps spp.*
- Estimar el censo de los colmenares seleccionados que presenten un elevado riesgo de introducción de artrópodos exóticos.

Con el objetivo de tener en cuenta el censo de colmenares con elevado riesgo de introducción de artrópodos exóticos, se deberá investigar la presencia de un aeropuerto o puerto internacional cercano al colmenar o si realizan importación de reinas.

2.7.1. Pequeño escarabajo de la colmena (*Aethina tumida*)

■ Definición de caso

Sospecha

Detección de escarabajos sospechosos, huevos o larvas .

Criterios de sospecha:

La detección de escarabajos sospechosos, huevos o larvas durante el examen de la colmena.

Detección de signos característicos de infestación por el Pequeño escarabajo de la colmena:

- Observación de escarabajos foréticos, larvas o huevos (figura 31, 32, 33).

- Galerías excavadas en los cuadros (figura 34).
- Presencia de cría destruida (figura 31).
- Modificación del color de la miel y presencia de miel fermentada.

Nota importante: Debe recordarse que estos signos clínicos ocurren en un estadio avanzado de la infestación. Por lo tanto, resulta crucial detectar escarabajos atípicos, huevos o larvas.

Estas comprobaciones pueden realizarse en colmenas con abejas y en colmenas vacías, ya que los escarabajos se sienten atraídos por el olor de las colmenas.



Figura 31: escarabajo adulto de *Aethina tumida*

Figura 32: Escarabajo adulto entre las abejas



Figura 34: galerías excavadas



Figura 33: larva de *Aethina tumida*



Figura 31: escarabajo adulto de *Aethina tumida*

Confirmación:

Identificación de *Aethina tumida* a nivel nacional y confirmación a nivel del Laboratorio Europeo de Referencia.

■ **Muestras/Observaciones**

Toma de muestras de escarabajos, larvas y huevos de cualquier espécimen sospechoso.

Nota importante: Cada EEMM debe implementar exhaustivamente el **Reglamento Delegado (UE) 2020/692 de la Comisión, de 30 de enero de 2020**, que completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas para la entrada en la Unión, y para el desplazamiento y la manipulación tras la entrada, de las partidas de determinados animales, productos reproductivos y productos de origen animal. En el Título 4 se establecen las condiciones generales y específicas para la introducción de determinadas especies de abejas en la Unión Europea (*Apis mellifera* y *Bombus spp*) en relación a presencia de loque americana, el pequeño escarabajo de la colmena (*Aethina tumida*) y el ácaro *Tropilaelaps spp*.

■ **Análisis laboratoriales**

Se debe de proceder a la identificación morfológica junto con identificación molecular. Los resultados deben de ser confirmados por el Laboratorio Europeo de Referencia.

Nota importante: En caso de detección, la alarma debe elevarse a escala nacional y europea. Se deben implementar procedimientos de emergencia adecuados y restricciones de sanidad animal (La autoridad competente deberá ser informada de forma inmediata ante la sospecha de la presencia de éstos dos parásitos). Seguir procedimiento establecido en el Manual Práctico de Operaciones de Lucha contra *Aethina tumida* y *Tropilaelaps spp*.

https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/manualpracticoaethinatumidanuevo2021_tcm30-111430.pdf

■ **Desarrollo de datos.**

Indicadores epidemiológicos:

Número de brotes sospechosos por año.

Número de brotes confirmados por año.

2.7.2. Tropilaeopsosis (*Tropilaelaps* spp)

■ Definición de caso

Sospecha

Detección macroscópica de ácaro(s) distintos a varroa en las abejas, cría de abejas o en la piquera de la colmena.

Criterios de sospecha:

La detección de ácaros atípicos/sospechosos, distintos a varroa durante el examen de la cría de abejas, abejas o en la piquera (figura 35).

Nota importante: los signos clínicos de la infestación producida por *Tropilaelaps* spp son similares a los signos clínicos de varroosis:

- Presencia de abejas con alas deformadas.
- Abdómenes de abejas deformados.
- Opérculos con pequeños agujeros.
- Cría salteada.
- Cría muerta.

Sin embargo, es preciso recordar que estos signos clínicos tienen lugar en estadios avanzados de la infestación. Por lo tanto, resulta crucial la detección de ácaros atípicos con anterioridad.



Figura 35: *Braula coeca* (arriba) comparada con *Varroa* (derecha), *Tropilaelaps* (abajo en el centro) y *Melittiphis* (izquierda). Cortesía de The Food and Environment Research Agency (Fera), Crown Copyright

Confirmación:

Identificación de *Tropilaelaps spp.* a nivel nacional Y confirmación a nivel del Laboratorio Europeo de Referencia.

Muestras/Observaciones

Toma de muestras de cualquier ácaro sospechoso.

- La detección puede ocurrir durante el recuento de varroa sobre las muestras sistemáticas de abejas.
- Para el caso de apiarios que presenten un elevado riesgo de introducción de artrópodos exóticos:
 - o Tomar una muestra de cría (10 x 10 cm²).
 - o Verificar la presencia de ácaros sospechosos en la piquera cuando aparezcan signos clínicos inesperados de este parásito. Este requisito no excluye la comprobación de ácaros inusuales incluso en el caso de la observación de varroa.

Observación: *Tropilaelaps spp.* también se buscará en las muestras sintomáticas sospechosas de estar parasitadas por *Varroa destructor*.

Nota importante: Cada EM debe implementar exhaustivamente el Reglamento Delegado (EU) 2020/692 de 30 de enero de 2020 para evitar la introducción de estos dos parásitos exóticos y asegurar una alerta precoz en caso de introducción. Este Reglamento implica en el caso de España una participación activa de las CCAA que en último término deben de proceder al envío de abejas acompañantes junto con el material de los envíos de importaciones de abejas reinas al Laboratorio Nacional de Referencia de Algete.

■ **Análisis laboratoriales**

Se debe de proceder a la identificación morfológica. Los resultados deben de ser confirmados por el Laboratorio Comunitario de Referencia.

Nota importante: En caso de detección, la alarma debe elevarse a escala nacional y europea. Implementación de procedimientos de emergencia adecuados y de restricciones de sanidad animal (La autoridad competente deberá ser informada de forma inmediata). Seguir procedimiento establecido en el “Manual Práctico de Operaciones de Lucha contra *Aethina tumida* y *Tropilaelaps spp.*”.

https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/manualpracticoaethinatumidanuevo2021_tcm30-111430.pdf

▪ **Desarrollo de datos.**

Indicadores epidemiológicos:

Número de brotes sospechosos por año.

Número de brotes confirmados por año.

2.8. Intoxicaciones por residuos de pesticidas

▪ **Objetivos**

- Verificar la exposición real de las abejas a los mismos para dar cumplimiento a **Reglamento de ejecución (UE) Nº 485/2013 de la Comisión** de 24 de mayo de 2013 por el que se modifica el Reglamento de Ejecución (UE) n o 540/2011 en lo relativo a las condiciones de aprobación de las sustancias activas clotianidina, tiametoxam e imidacloprid, y se prohíben el uso y la venta de semillas tratadas con productos fitosanitarios que las contengan.

Estimar la prevalencia clínica de intoxicaciones por pesticidas durante las dos visitas.

- **Definición de caso.** Un apiario se considerará positivo cuando la presencia de uno o más pesticidas haya sido detectada en una o más colmenas y cuyas concentraciones supongan un riesgo de mortalidad para las abejas. Para ello se tendrán en cuenta las DL50 (Dosis letales 50) y la TL50 (Tiempo letal 50).

- **TL50 < 2 días** : riesgo elevado de mortalidad
- **TL50 2-7 días**: riesgo moderado de mortalidad.

Sospecha de intoxicación por pesticidas: cualquier colmenar que presente signos clínicos se considerará sospechoso de padecer una intoxicación:

- Signos clínicos
 - alta mortalidad de las colonias, en un corto tiempo y de forma masiva (figura 36 y 37).
 - disminución significativa de abejas en los panales.
 - presencia de síntomas nerviosos, desorientación, con poco movimiento y nula agresividad.
- Se llevará a cabo un diagnóstico diferencial con el virus de la parálisis crónica (CBPV).



Figura 36: mortalidad elevada delante de la piquera



Figura 37: abejas dispersas muertas en los alrededores de las colmenas

■ Muestras y observaciones

- Ante un **caso sospechoso de intoxicación por pesticidas** se recogerán :
 - **Abejas:** de forma independiente se tomará:
 - Una muestra representativa de **abejas vivas externas con síntomas y/o abejas muertas** para el análisis de residuos de pesticidas de todas las colonias seleccionadas al azar sospechosas de al menos 50 gramos (unas 500 abejas) para su envío al Laboratorio Arbitral Agroalimentario (LAA).
 - Una muestra representativa de al menos **30 abejas vivas externas con síntomas y/o muertas** de las colonias seleccionadas al azar sospechosas para el envío al LNR de Algete para llevar a cabo un diagnóstico diferencial con el virus de la parálisis crónica.

- **Panal con polen y/o miel:** una muestra representativa de todas las colonias seleccionadas al azar que presenten síntomas de al menos 300 gr para su envío al LAA.
- Las muestras para la investigación para residuos de pesticidas se enviarán directamente al Laboratorio Agroalimentario de Aravaca del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Este envío se comunicará previamente a la SG de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad mediante envío por fax/email de toda la encuesta y ficha de hoja de toma de muestras de la visita realizada.

A la atención de: Ana Belén Lozano Rodríguez
Laboratorio de Arbitral Agroalimentario de Aravaca.
Calle Aguarón 13.

Ctra. de A Coruña, Km. 10,700. 28023 Madrid

Teléfono: 91 347 49 43

e-mail: ablozano@mapa.es ; jurunuel@tragsa.es

▪ **Análisis laboratoriales**

- Análisis multirresiduos.

3. MÉTODO PRÁCTICO PARA LA IMPLEMENTACIÓN DEL PROTOCOLO

3.1. Muestreo y selección de las colonias

3.1.1. Número de colonias a muestrear

Las colonias seleccionadas por colmenar nos permitirán detectar una prevalencia esperada del 20%. El número de colmenas a muestrear en función del tamaño del colmenar queda reflejado en la tabla siguiente.

Censo colmenas	Muestra 95/20
≤ 8	todas
9-10	8
11-20	10
21-30	11
31-60	12
>61	13

Tabla 4: número de colmenas a muestrear al azar en el apiario seleccionado

3.1.2. Selección de las colonias

■ Selección al azar de las colonias (ver anexo I)

Durante la primera visita las colonias objeto de estudio se seleccionarán al azar sobre el total de número de colonias del colmenar. Si la colonia está muerta se elegirá una nueva, pero si está débil se mantiene en el muestreo.

Las colonias seleccionadas serán las que van a ser objeto de estudio durante las dos visitas. La visita de primavera (2ª visita), por razones prácticas, deberá realizarse antes del periodo de trashumancia

■ Detección de colonias con síntomas durante el examen externo.

Esta detección se lleva a cabo sobre la base de signos clínicos/anomalías de vuelo en la piquera o en el frente de la colmena: mortalidad, abejas con anomalías morfológicas (malformaciones, atrofia de las alas, color negro, presencia de abejas

con poco pelo...), comportamientos anormales (temblores, abejas arrastrándose, aferradas a la hierba, abejas rechazadas por abejas guardianas), restos de diarrea sobre la colmena, actividad reducida en la entrada de la colmena.

Otras colonias pueden ser objeto de investigación a instancia del apicultor “Extracolonia” (por ejemplo colmenas que en las visitas anteriores se hayan detectado signos de loque americana, etc). Estas colonias no se considerarán dentro de la investigación si no han sido seleccionadas, pero podrán investigarse.

3.2. Calendario de visitas

La primera visita tendrá lugar al final del periodo de actividad apícola, antes del inicio del invierno (otoño de 2023). La segunda visita se realizará al final del periodo invernal / inicio de la primavera (2024).

Nota importante: El mes de muestreo será elegido por cada CCAA en función de sus características climáticas y eventual calendario de trashumancia. Todas las visitas de cada periodo de muestreo se llevarán a cabo en el **intervalo máximo de un mes**, con el objetivo de obtener resultados comparables.

3.3. Síntomas clínicos, muestras y solicitud de análisis

La siguiente tabla contiene un resumen sobre las muestras, los análisis y la implicación de los laboratorios.

La medida de la tasa de infestación por *Varroa destructor* se llevará a cabo en la primera y segunda visita.

Cualquier otra toma de muestras sólo se llevará a cabo en caso de observarse síntomas clínicos. La pericia de los inspectores indicará los análisis solicitados de acuerdo con los síntomas clínicos.

El diagnóstico de varroosis (enfermedad) puede realizarse directamente en el campo por un inspector apícola, sin necesidad de confirmación por un laboratorio, en función de los síntomas clínicos detectados y las tasas de infestación del parásito que deberán de ser anotados en el formulario de inspección.

Nota importante: La toma de muestras clínicas se realizará de cada colmena enferma. No se mezclarán las muestras de varias colmenas enfermas.

Durante la visita, la toma de muestra de panal de cría, en ocasiones, podría comprometer la viabilidad de una colonia. En ese caso podrán tomarse muestras de elementos anormales o enfermos (larvas, pupas, escamas de loque americana...)

que se pueden transportar en tubos Eppendorf. Todas las muestras deberán identificarse adecuadamente y relacionarse con el registro de las observaciones clínicas (es muy importante la formación del inspector apícola).

Deberá desinfectarse el material apícola entre inspección de colonias, **evitando el uso de lejía**, que por su capacidad de destrucción vírica podría afectar a las muestras que se recojan para la detección de virus.

	MUESTRAS	COLONIAS OBJETO DE MUESTREO	INVESTIGACIONES	LABORATORIO IMPLICADO
Visita 1: antes del periodo invernal	Muestras sistemáticas			
	<ul style="list-style-type: none"> ■ Abejas del interior de la colmena; - Próximas al nido de cría (<i>Varroa destructor</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Deben muestrearse todas las colonias seleccionadas 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Tasa infestación <i>Varroa destructor</i> ■ Detección de ácaros <i>Tropilaelaps spp, Aethina tumida</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Laboratorios Oficiales de las CCAA (tasas de infestación de <i>Varroa destructor</i>) ■ LCV Algete y EU-RL para la salud de las abejas para confirmación en caso de detección de <i>Tropilaelaps spp, Aethina tumida</i>
	Muestras en colonias con síntomas			
	<ul style="list-style-type: none"> ■ Muestras de panal de cría 10 x 10 cm ■ Y/O muestras con elementos con síntomas en tubos eppendorf 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Colonias con signos clínicos en la cría de colmenas seleccionadas al azar 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Varroosis/ <i>Tropilaelaps spp/Aethina tumida</i> ■ Loque americana ■ Loque europea 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Laboratorio Central de Veterinaria de Algete ■ EU-RL para la salud de las abejas para confirmación en caso de sospecha de <i>Tropilaelaps spp y Aethina tumida</i>
<ul style="list-style-type: none"> ■ Muestras de abejas con síntomas (al menos 30) - Abejas internas: varroosis, <i>Tropilaelaps spp, DWV</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Colonias con signos clínicos en las abejas adultas de colmenas seleccionadas al azar 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Varroosis/ <i>Tropilaelaps spp</i> ■ Nosemosis ■ CBPV ■ ABPV 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Laboratorio Central de Veterinaria de Algete ■ LCV Algete y EU-RL para la salud de las abejas para confirmación en caso de sospecha de <i>Tropilaelaps spp,</i> 	

	- Abejas externas : Nosemosis, CBPV, ABPV		■ DWV	
	■ Muestras de abejas con síntomas (al menos 50 gramos), trozo de panal con miel y polen (al menos 300 gr)	■ Colonias con signos de intoxicación por pesticidas de las colonias seleccionadas al azar	■ Pesticidas	■ Laboratorio Arbitral Agroalimentario de Aravaca
	■ Ácaro sospechoso (similar a <i>Tropilaelaps spp</i>) ■ Escarabajo(s), larva(s) o huevo(s) sospechoso(s) (<i>Aethina tumida</i>)	■ Toda colonia con elementos sospechosos	■ <i>Tropilaelaps spp</i> , identificación ■ <i>Aethina tumida</i> identificación	■ Laboratorio Central de Veterinaria de Algete ■ EU-RL para la salud de las abejas para confirmación
■ Visita 2 ■ finales del invierno, ■ principio de la primavera	Muestras sistemáticas			
	■ Abejas del interior de la colmena; - Próximas al nido de cría (<i>Varroa destructor</i>)	■ Deben muestrearse todas las colonias seleccionadas	■ Tasa infestación <i>Varroa destructor</i> ■ Detección de ácaros <i>Tropilaelaps spp</i> , <i>Aethina tumida</i>	■ Laboratorios Oficiales de las CCAA (tasas de infestación de varroa) ■ LCV Algete y EU-RL para la salud de las abejas para confirmación en caso de detección de <i>Tropilaelaps spp</i> , <i>Aethina tumida</i>

Muestras en colonias con síntomas			
<ul style="list-style-type: none"> ■ Muestras de panal de cría 10 x 10 cm ■ Y/O muestras con elementos con síntomas en tubos eppendorf 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Colonias con signos clínicos en la cría de colmenas seleccionadas al azar 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Varroosis/ <i>Tropilaelaps spp/Aethina tumida</i> ■ Loque americana ■ Loque europea 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Laboratorio Central de Veterinaria de Algete ■ EU-RL para la salud de las abejas para confirmación en caso de detección de <i>Tropilaelaps spp</i> y <i>Aethina tumida</i>
<ul style="list-style-type: none"> ■ Muestras de abejas con síntomas (al menos 30). - Abejas internas: varroosis, <i>Tropilaelaps spp</i>, DWV - Abejas externas: Nosemosis, CBPV, ABPV 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Colonias con signos clínicos en las abejas adultas de colmenas seleccionadas al azar 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Varroosis/ <i>Tropilaelaps spp</i>. ■ Nosemosis ■ CBPV ■ ABPV ■ DWV 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Laboratorio Central de Veterinaria de Algete ■ EU-RL para la salud de las abejas para confirmación en caso de detección de <i>Tropilaelaps spp</i>.

	<ul style="list-style-type: none"> ■ Ácaro sospechoso (similar a <i>Tropilaelaps spp.</i>) ■ Escarabajo(s), larva(s) o huevo(s) sospechoso(s) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Toda colonia con elementos sospechosos 	<ul style="list-style-type: none"> ■ <i>Tropilaelaps spp.</i>, identificación ■ <i>Aethina tumida</i> identificación 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Laboratorio Central de Veterinaria de Algete ■ Confirmación por el EU-RL para la salud de las abejas
	<ul style="list-style-type: none"> ■ Muestras de abejas con síntomas (al menos 50 gr), trozo de panal con miel y polen (al menos 300 gr) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Colonias con signos de intoxicación por pesticidas de las colonias seleccionadas al azar 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Pesticidas 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Laboratorio Arbitral Agroalimentario de Aravaca

* Laboratorio previsto para el envío de estas muestras.

Análisis laboratoriales a llevar cabo durante el programa de vigilancia

Enfermedad diana	Patógeno	Método de laboratorio	MATRIZ	Fecha acreditación
Infestación del colmenar por <i>Varroa destructor</i>	<i>V.destructor</i>	■ Detección de <i>Varroa destructor</i> y recuento por lavado de abejas adultas (método de la OIE)	■ Abejas vivas del interior de la colmena (> 300) (cercanas a la puesta de cría)	19/04/2013
		■ Examen de síntomas +/- detección de la presencia del parásito (OIE)		
Varroosis	<i>V.destructor</i>	■ Diagnóstico bacteriológico (OIE validado por el EU-RL)	■ Cría con síntomas (panal 10 x 10 cm ²) o muestras de larvas, escamas enfermas en tubos Eppendorf	08/04/2016
		<u>completado si fuera necesario por identificación molecular por PCR</u> (OIE validado por el EU-RL)		
Loque americana	<i>P. larvae</i>	■ Diagnóstico bacteriológico (OIE validado por el EU-RL)	■ Cría con síntomas (panal 10 x 10 cm ²) o muestras de larvas, escamas enfermas en tubos Eppendorf	17/11/2017
		<u>completado si fuera necesario por identificación molecular por PCR</u> (OIE validado por el EU-RL)		
Loque europea	<i>M. plutonius</i>	■ Diagnóstico bacteriológico (OIE validado por el EU-RL)	■ Cría con síntomas (panal 10 x 10 cm ²) o muestras de larvas, escamas enfermas en tubos Eppendorf	17/11/2017
		<u>completado si fuera necesario por identificación molecular por PCR</u> (OIE validado por el EU-RL)		

Nosemosis	<i>N.apis</i> <i>N.ceranae</i>	<ul style="list-style-type: none"> ■ Detección y cuantificación de esporos de <i>Nosema spp</i> por microscopía óptica (método establecido por la OIE) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Al menos 30 abejas externas adultas con síntomas <p>Observación: No mezclar abejas vivas con síntomas con las abejas</p>	19/04/2013
		<ul style="list-style-type: none"> ■ Diferenciación de especies de <i>Nosema apis/ Nosema ceranae</i> (OIE validado por el EU-RL) 		08/04/2016
Parálisis Crónica	CBPV	<ul style="list-style-type: none"> ■ Identificación molecular y cuantificación (recomendaciones del EU-RL) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Al menos 30 abejas externas adultas con síntomas ■ En ausencia de abejas sintomáticas se recogerán 30 abejas muertas (menos de una semana) <p>Observación: No mezclar abejas vivas con síntomas con las abejas</p>	08/04/2016
DWV	DWV	<ul style="list-style-type: none"> ■ Diagnóstico molecular: detección y/o cuantificación (recomendaciones del EU-RL) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Abejas con síntomas del interior de las colmenas 	28/11/2014
ABPV	ABPV	<ul style="list-style-type: none"> ■ Diagnóstico molecular: detección y/o cuantificación (recomendaciones del EU-RL) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Abejas con síntomas del interior y exterior de las colmenas 	28/11/2014

<p>Aethinosis/ Pequeño escarabajo de la colmena</p>	<p><i>A. tumida</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ Detección durante el lavado de las abejas ■ Detección durante el examen de muestras sintomáticas ■ Identificación del escarabajo por examen morfológico (OIE validado por el EU-RL; acreditación LCV 18/01/2022) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Abejas adultas recogidas del interior de las colmenas (> 300) ■ Formas adultas del escarabajo, larvas o huevos ■ Panales de cría/miel/polen dañados 	<p>No aplica</p>
<p>Tropilaelapsosis</p>	<p><u><i>Tropilaelaps spp</i></u></p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ Detección durante el lavado de las abejas ■ Detección durante el examen de muestras sintomáticas ■ Identificación por examen morfológico directo de los ácaros (OIE validado por el EU-RL) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Abejas adultas recogidas del interior de las colmenas (> 300) ■ Ácaro sospechoso ■ Cría con síntomas 	<p>No aplica</p>
<p>Residuos de pesticidas</p>	<p><i>Pesticidas</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ El que determine el Laboratorio Arbitral Agroalimentario de Aravaca 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Ante sospecha de intoxicación: <ul style="list-style-type: none"> - Abejas con síntomas y/o muertas (al menos 20 gr -unas 250 abejas) - Trozo de panal con miel y polen (al menos 150 gr) 	<p>No aplica</p>

3.4. Curso práctico de las visitas

3.4.1. Visita 1 antes del periodo invernal

1. Contactar previamente con el apicultor. Solicitar el envío previo de una fotocopia del **Libro de Explotación Apícola** al inspector(es) que vayan a realizar la visita, con el objetivo de agilizar la recogida de datos para rellenar el formulario de inspección
2. Al inicio de la visita hay que explicar al apicultor los objetivos y las formas de vigilancia así como recoger información relativa a las prácticas apícolas que lleva a cabo, localización de las colmenas e información medioambiental (ver formularios de visita).
3. Al llegar al colmenar es conveniente dibujar un croquis con la situación de las colmenas para asignarles un número. A continuación se realiza la selección de las colonias al azar.
 - a. Selección al azar de las colonias que serán seguidamente controladas
 - b. Marcado de las colonias con una referencia individual (uso de crotales). Rellenar el formulario con las referencias individuales.
4. Examen de las colonias elegidas al azar.
 - a. Se realizará un examen a cada colonia/colmena. Primero externo y luego interno.
 - i. Examen externo: se observará cada colonia con el propósito de detectar signos clínicos o alteraciones en la piquera o justo fuera de la colmena.
 - ii. Examen interno

Observación: Si la colonia seleccionada al azar está muerta, se elegirá al azar otra colonia para mantener el número total de colonias seleccionadas. En los demás casos (colonias débiles) se mantendrán para el muestreo.

Nota importante: el examen no debería de comprometer la viabilidad de la colmena.

- b. Toma de muestras:
 - i. En todas las colonias seleccionadas al azar:
 1. se muestrearán **abejas del interior de la colmena** para estimar la tasa de infestación por *Varroa destructor*
 - a. 300 abejas para el análisis de *Varroa destructor* (preferentemente que ocupen panales con cría no operculada):
 - ii. De las colonias seleccionadas al azar con síntomas: muestrear cría de abeja/abejas/panal con miel y polen en función de los síntomas observados.
 - c. Anotar en el formulario de inspección todas las observaciones, las muestras recogidas y las solicitudes de análisis para cada muestra.

5. Embalar y enviar las muestras al laboratorio competente junto con una copia del formulario de inspección o ficha de identificación de la muestra (ver Anexo I: Instrucciones para la toma, identificación, embalaje y envío de muestras).
 - a. Muestras sistemáticas (*Varroa destructor*):
 - i. Envío a **Laboratorio Oficial de las CCAA** junto con el formulario completo.
 - b. Muestras clínicas (excepto muestras con sospechas de intoxicación por pesticidas):
 - i. Envío de muestras al **Laboratorio Central de Veterinaria de Algete** junto con el formulario completo
 - c. Muestras sintomáticas para investigación de intoxicación por pesticidas
 - i. Envío de las muestras al junto con la ficha de identificación de la muestra al **Laboratorio Arbitral Agroalimentario de Aravaca**.
 - ii. Envío del formulario completo y notificación de la toma de estas muestras a la SG Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad para la coordinación con el Laboratorio Arbitral Agroalimentario de Aravaca.

3.4.2. Visita 2 después del periodo invernal

1. Explicar algunos elementos en el contexto de la vigilancia y completar la parte simplificada del formulario de inspección sobre información general del apiario.
2. Examen externo del apiario:
 - a. Identificar las colmenas con posibles desórdenes o signos clínicos en la piquera o cerca de la colmena
3. En las colonias seleccionadas durante la primera visita:
 - a. Visitar las colonias y anotar la mortalidad invernal (ver definición de caso de mortalidad)
 - b. Anotar el número de colonias vendidas, dadas, movidas entre las dos visitas y el número de colonias fusionadas (especificando el motivo)
 - c. En todas las colonias seleccionadas al azar se muestrearán abejas del interior de la colmena para estimar la tasa de infestación por *Varroa destructor*
 - d. Tomar muestras de la cría con síntomas/ abejas en función de los signos clínicos detectados.
 - e. Anotar las observaciones en el formulario de inspección, las muestras y las solicitudes de análisis requeridos.
4. Embalar y enviar las muestras al laboratorio competente junto con una copia del formulario de inspección o ficha de identificación de la muestra.
 - a. Muestras sistemáticas (*Varroa destructor*):

- i. Envío a **Laboratorio Oficial de las CCAA** junto con el formulario completo.
- b. Muestras sintomáticas (excepto muestras con sospechas de intoxicación por pesticidas): Empaquetar las muestras y enviarlas al Laboratorio Central de Veterinaria de Algete con una copia del formulario de inspección (ver Anexo II: Instrucciones para la toma, identificación, embalaje y envío de muestras)
- c. Muestras sintomáticas para investigación de intoxicación por pesticidas
 - i. Envío de las muestras al junto con la ficha de identificación de la muestra al **Laboratorio Arbitral Agroalimentario de Aravaca**.
 - ii. Envío del formulario completo y notificación de la toma de estas muestras a la SG Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad para la coordinación con el Laboratorio Arbitral Agroalimentario de Aravaca

ANEXO I: Selección de las colmenas dentro de un colmenar de forma Simple Aleatoria.

1. En el formulario de inspección se elaborará un croquis con la disposición de las colmenas en el colmenar.
2. Se enumeraran todas las colmenas de manera consecutiva.
 - Del **1 a 'N'**, siendo "**N**" el número total de colmenas que constituyen el colmenar.
3. Se calculará el número de muestras necesario '**n**' en función de "**N**", tal y como se muestran en la tabla siguiente (tabla 1).

Censo colmenas	Muestra 95/20
≤ 8	todas
9-10	8
11-20	10
21-30	11
31-60	12
>61	13

tabla 1

4. Se seleccionaran las colmenas mediante el uso de la **tabla de números aleatorios** (Tabla 2).
 - Para elegir el número por el que vamos a iniciar a seleccionar la muestra, se deja caer un lápiz sobre la tabla de números aleatorios sin mirar.
 - A partir de ese número, hacia la derecha y en horizontal, se dividen los números de la tabla aleatoria en números de cifras iguales a los dígitos de "**N**" (número total de colonias del colmenar). Ej. Si **N_80**, se dividirán los números de la tabla de dos en dos
 - Las colmenas seleccionadas son aquellas cuyos números sean menores que el número total de colmenas '**N**' y sin que se repitan los números.

Ejemplo. Seleccionar 10 colmenas de un apiario de 80 colmenas.

- En el croquis enumeramos las colmenas de manera consecutiva del 1 al 100.
- Dejamos caer un lápiz en la tabla y elegimos el número por el que vamos a iniciar la selección. Ej: segundo número de segunda fila (7).
- Empezamos a seleccionar los números de dos cifras que forman nuestra muestra: 71, 83, 11, 38, 72, 41, 94, 88, 11, 38, 19, 18, 31, 14.
- Los números mayores de 80 o aquellos repetidos se eliminarán. En nuestro caso el 11, por ser repetido y los números 83, 94, 88 por ser mayores de 80 serán eliminados.

En este caso las colmenas seleccionadas serán las colmenas numeradas con el 71, 11, 38, 72, 41, 38, 19, 18, 31, 14

Tabla de números aleatorios

0	3	4	2	0	6	9	0	5	4	3	3	3	5	2	9	0	7
8	7	1	8	3	1	1	3	8	7	2	4	1	9	4	8	8	1
1	3	8	1	9	1	8	3	1	1	4	5	9	9	4	8	3	1
1	2	0	2	9	5	9	4	0	1	0	0	4	6	4	8	3	2
3	8	4	0	8	9	9	2	4	4	7	9	5	1	1	5	1	5
6	2	3	5	7	5	4	8	0	7	3	0	0	3	2	8	5	9
7	9	7	2	0	0	4	4	5	9	5	9	1	6	0	8	1	6
6	6	6	6	5	7	2	3	3	9	9	2	9	7	5	2	4	5
9	0	3	8	1	1	8	1	9	7	3	0	8	2	0	7	0	3
6	1	8	0	0	7	2	3	3	2	8	2	5	1	9	0	6	7
8	7	6	5	6	7	5	1	1	2	2	2	1	6	3	5	3	1

ANEXO II: INSTRUCCIONES PARA LA TOMA, IDENTIFICACIÓN, EMBALAJE, CONSERVACIÓN Y ENVÍO DE MUESTRAS

Toma de muestras

■ Abejas:

- Muestras sistemáticas: recuento de varroa + detección del ácaro *Tropilaelaps spp.*
 - Tomar una muestra de **abejas vivas del interior de la colmena**
 - 300 abejas para el análisis de varroa de uno o varios panales (preferentemente) sobre cría no operculada.
- Si se observan anomalías en las colonias: ABPV + DWV + CBPV+ varroosis + nosemosis + intoxicación por pesticidas:
 - Muestrear prioritariamente **abejas vivas con signos clínicos** o que presenten comportamientos anormales (al menos 30 abejas).
 - Cuando el número de abejas con síntomas es muy pequeño (menos de 20 abejas) o cuando los signos clínicos no son específicos y/o solo se observa mortalidad, podrán tomarse **abejas muertas recientemente** (menos de una semana). Estas abejas muertas se recogerán de forma separada de las abejas con síntomas. De otra manera la calidad del resultado disminuiría. Muestrear al menos 30 abejas muertas recientemente, preferiblemente 60.
 - Las abejas muestreadas en el caso de sospecha de **Nosemosis** o **Virus de la Parálisis Crónica** (CBPV) y **Virus de la parálisis aguda** (ABPV) serán siempre **abejas vivas externas, recogidas de la piquera.**

Nota importante:

- Se debe tener cuidado con la conservación de las muestras de abejas muertas: si las abejas están secas o putrefactas, el análisis no debería de llevarse a cabo.
- Si fuera posible, conviene separar abejas con diferentes síntomas clínicos (especificando los signos que se observan en el formulario).

■ Cría: loque americana + loque europea + varroosis + ascosferosis

- Cortar un trozo de tamaño 10 x 10 cm de cría que contenga al menos 15 larvas y/o ninfas con un aspecto anormal.
- Muestrear larvas sintomáticas/ninfas u otros elementos sospechosos in tubos Ependorf (incluir una memoria detallada relativa a la muestra).

■ Parásitos sospechosos

- Tomar muestra de cualquier espécimen sospechoso.

■ Intoxicación por pesticidas

- Ante la sospecha de una intoxicación por pesticidas, además de muestras de abejas (500 abejas), se debe completar la toma de muestras con la recogida de un trozo de panal que contenga miel y polen (al menos 300 gr).

Identificación de las muestras

Número de explotación apícola/ A23/ (para el otoño de 2023)/Nº de la colonia/ Matriz + número (=1, 2, 3....)

Si se tratara de una extracolonia (colonia fuera del estudio al azar) delante del Nº de la colonia se pondrá EC seguido del número correlativo al número de extracolonia que se estudien

Ejemplo: ES281180000015/A23/EC01/HB1

Abreviaturas de las matrices:

HB = Abejas (Honeybee). Incluye las abejas recogidas de colonias con síntomas por intoxicación por pesticidas.

BR = Cría (Brood)

PAR = Parásito (Parasite)

POL= Panal polen (muestras con síntomas de intoxicación por pesticidas)

SYS1 = Muestras Sistemáticas para la determinación de la tasa de infestación por varroa

Ejemplo: ES281180000015/A23/7/HB1 (para la primera muestra de abejas con síntoma recogida de la colonia número 7 durante la primera visita (otoño de 2023).

Nota importante: si varios colmenares pertenecen al mismo apicultor, cada colmenar será identificado añadiendo un centenario al número de la colonia.

Ejemplo:

- ES281180000015/A23/**107**/HB1 para la primera muestra de abejas recogida en el primer colmenar de la colonia número 7 durante la primera visita (otoño de 2023).
- ES281180000015/A23/**207**/HB1 para la primera muestra de abejas recogida en el segundo colmenar de la colonia número 7 durante la primera visita (otoño de 2023).

Embalaje

■ Abejas:

- Abejas con síntomas: las abejas se introducen en un envase de 50 ml con la referencia de la muestra y cerrado.
- Abejas del interior de las colmenas: utilizar envases (cajas de cartón, recipientes de plástico, cristal) Evitando aplastar las abejas.

■ Cría de abejas:

- Utilizar papel de filtro y sobres, cajas de cartón, evitando aplastar el panal.
- Para pequeños elementos utilizar tubos Eppendorf.

Nota importante: recomiendan el uso de envases de cristal o papel más que bolsas de plástico, para evitar que se produzcan maceraciones.

■ Sospecha de parásitos:

- Introducir los parásitos sospechosos en alcohol 99% en un frasco perfectamente cerrado.

■ Panal de miel y polen

- Utilizar papel de filtro y sobres, cajas de cartón, evitando aplastar el panal.

Envío de muestras

- Para el envío de muestras al Laboratorio Central de Veterinaria de Algete, contactar previamente con el laboratorio para la facilitar la recepción de las muestras en el laboratorio:
 - Contactar con Leticia Hernández Martínez (Jefa de Servicio del Departamento de Patología de Abejas y Peces).

lhmartinez@mapa.es

Teléfono contacto: 91 347 92 48

- Para el envío de muestras al Laboratorio Arbitral Agroalimentario de Aravaca, contactar previamente con el laboratorio y con la SG de Sanidad Animal) para la facilitar la recepción de las muestras en el laboratorio:

Ana Belén Lozano Rodríguez y Javier Uruñuela
Laboratorio de Arbitral Agroalimentario de Aravaca.
Calle Aguarón 13.

Ctra. de A Coruña, Km. 10,700. 28023 Madrid

Teléfono: 91 347 49 45/Fax:91 347 49 41

e-mail: ablozano@mapa.es ; jurunuel@traqsa.es

Sergio Bonilla García
SG Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad.
e-mail: sbonilla@mapa.es
Teléfono: 91 347 69 64

- Una vez tomada la muestra, debe utilizarse para su transporte un refrigerador para el transporte **en menos de 48 horas al laboratorio de destino (4º C)**, así como cajas resistentes para evitar aplastamientos.

- **Si no pueden enviarse las muestras refrigeradas en menos de 48 horas al laboratorio pertinente las muestras hasta su envío se almacenarán de forma general:**
 - Sistema de frío: Si las muestras se congelan (-20° C, -80°C)
 - Sistema de conservación con etanol (99%): sólo para el caso de las muestras de parásitos

Se debe adjuntar todo el formulario de inspección al envío (sin olvidar especialmente el listado de muestras que se han tomado en el colmenar y el análisis solicitado). La documentación deberá ir fuera del embalaje con el objetivo de evitar riesgos laborales por picaduras de abejas a su llegada al laboratorio.

■ MUESTRAS SISTEMÁTICAS:

- **Abejas para el cálculo de las tasas de infestación de varroosis:**
 - Se enviarán al Laboratorio Oficial de la CCAA.

■ MUESTRAS CLÍNICAS.

- **Panales de cría (10x10cm²):** se enviarán al LCV Algete.
- **Abejas:** se enviarán según proceda al LCV Algete o al Laboratorio Arbitral Agroalimentario de Aravaca.
- **Abejas y panales de cría (10x10cm²):** se enviarán al LCV Algete
 - Se enviarán al Laboratorio Arbitral Agroalimentario de Aravaca.
- **Parásitos:** se recogerán en tubos con etanol 99% para su envío al LCV de Algete
- **Abejas y panal de polen para la investigación de sospechas de intoxicación por pesticidas:**
 - Se enviarán al Laboratorio Arbitral Agroalimentario de Aravaca.

ANEXO III: LISTADO DE EQUIPO PARA LA VISITA

- GPS
- Equipo de protección adecuado
- Material para el muestreo:
 - Sobres de papel kraft (de envolver), cajas de cartón, botes plástico, cristal, para las muestras de abejas (para todo tipo de análisis)
 - Grapadora para cerrar los sobres.
 - Cuchillo / escalpelo para la toma de muestras de la cría de abejas.
 - Cajas para las muestras de cría.
 - Papel vegetal para envolver las muestras de cría
 - Tubos con alcohol 99% para la recogida de parásitos sospechosos
 - Tubos con alcohol 99% para abejas para los análisis virales y parasitológicos
 - Tubos Eppendorf y palillos de plástico para el muestro de la cría.
 - Rotuladores para el marcaje de las muestras.
 - Marcadores para la identificación de las colmenas y grapas. Pueden utilizarse crotales.
 - Desinfectante para después del uso del material.
 - Pinzas.