

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA, LEÓN

UNAN - LEÓN

MEDICINA VETERINARIA

MAESTRIA EN MEDICINA PREVENTIVA – CON MENCIÓN EN

SALUD PÚBLICA VETERINARIA



Tema:

Haplotipos de *Varroa destructor* relacionados al grado de infestación en colmenas de *Apis mellifera* de apiarios centinela de Nicaragua, 2015 al 2016.

Elaborado por: Lic. Henry José Osejo Uriarte

Tutora: Dra. MDV Christiane Duttmann, MSc.

“A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD”

Resumen

La abeja melífera (*Apis mellifera*), como todo organismo vivo, es susceptible a la acción de diversos agentes etiológicos y amenazas medio ambientales, de las cuales algunas han aumentado significativamente en los últimos 5 a 10 años. Entre ellos se encuentra el ácaro *Varroa destructor*, que representa una de las grandes problemáticas sanitarias para las abejas productoras de miel. Desde un punto de salud pública el riesgo de la desaparición de *Apis mellifera* es de mayor interés, ya que con la disminución en la actividad de las abejas, se ocasionan severas pérdidas de miel y polen, además de restringir la polinización de cultivos agrícolas y el posible efecto negativo al equilibrio de los ecosistemas.

A través del reciente estudio se determinó el haplotipo de *Varroa destructor* presente en el país y su relación con el grado de infestación en las colmenas de *Apis mellifera* de apiarios centinela de Nicaragua. Se recolectaron muestras de abejas adultas de la cámara de cría de 29 apiarios centinelas a nivel nacional, con presentación de la fase forética del ácaro. Del total de los ácaros encontrados en las muestras de abejas recolectadas, se hicieron 24 pool, separados por diferentes zonas. Se determinó el haplotipo mitocondrial de las hembras adultas de varroa encontrado en el estudio, mediante el análisis con enzima de restricción Sac I, demostrando que los ácaros pertenecen al haplotipo Coreano.

En relación al grado de infestación de las colmenas con el ácaro, se identificó el 70% con una taza baja, el 20 % con infestación media y el 10% resultaron con infestación alta. En 3 departamentos muestreados se encontraron resultados que superan el 10% del nivel de infestación de varroa, indicando la necesidad de realizar un buen manejo para el control de esta parasitosis.

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios Padre TODOPODEROSO, por haberme concedido sabiduría, paciencia y fortaleza necesaria todo este tiempo para poder culminar mis estudios.

A mis Padres y hermanos, por brindarme su apoyo incondicional en todo el transcurso de mis estudios, y trabajo demostrándome siempre que somos una unidad familiar.

A la Dra. Christiane Duttmann por haber confiado en mi persona y llevar a cabo esta investigación que ha sido muy enriquecedora en mi carrera.

A la Dra. Gladys Castillo Paguaga, por concederme parte de su tiempo para ayudarme en las correcciones del trabajo.

Al INSTITUTO DE PROTECCION Y SANIDAD AGROPECUARIO (IPSA), por haberme dado la oportunidad de realizar ésta Maestría, que de lo contrario no hubiese sido posible ampliar mis conocimientos, logrando alcanzar una visión más amplia en el ámbito profesional y laboral.

DEDICATORIA

A Dios, porque me ha prestado vida y me ha permitido alcanzar mis metas propuestas.

A mi Familia, quienes me brindan su apoyo incondicional, deseándome siempre éxitos para lograr mis objetivos sin mirar atrás.

Al Instituto de Protección y Sanidad Agropecuario (IPSA) por el apoyo económico brindado.

GLOSARIO

Apiario: Conjunto de colonias instaladas en un lugar determinado.

Apicultor/a: Hombre o mujer que se dedica a la crianza y el manejo técnico de abejas.

Ahumador: Instrumento para apaciguar a las abejas con humo.

Cámara de cría: Caja de colmenas donde la reina realiza la postura.

Colmena: Habitación donde vive un conjunto de abejas.

Colonia: Familia de abejas que cuentan con un nido de postura.

Emigración: Abandono de una colmena por parte de las abejas.

Enjambre: Conjunto de abejas que abandonan su colonia para establecer una nueva colonia madre.

Fresia: Unión del parásito con el huésped tiene predilección por alguna parte del cuerpo.

Imago: Resultado de la última metamorfosis del insecto, cuando este ya ha adquirido su aspecto definitivo.

Larva: Cría de abeja que no ha llegado a su etapa de pupa.

Nodriz: Abeja que se dedica a alimentar y cuidar abejas y larvas.

Opérculo: Tapa de cera; las abejas cubren las celdas llenas de miel o crías.

Pecoreadora: Abeja que recolecta néctar, polen, propóleos y agua.

Pillaje: Fenómeno de agresividad de las abejas atacando una colmena con el fin de robar la miel.

Propóleos: Sustancia cerosa con que las abejas bañan las colmenas.

Trashumancia: Traslado del apiario con el fin de obtener más miel.

Trofolaxia: Cambio mutuo de alimentos entre nodrizas y los que necesitan ser alimentados como las larvas, los zánganos y la reina.

INDICE DE CONTENIDO

I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
III. Problema de Investigación	5
IV. Justificación	6
V. Objetivos	8
VI. Marco Teórico	9
VII. Diseño Metodológico	21
VIII. Resultados	26
IX. Discusión	30
X. Conclusiones	32
XI. Recomendaciones	33
XII. Bibliografía	34
XIII. Anexos	38

I. Introducción

La abeja melífera (*Apis mellifera*), como todo organismo vivo, es susceptible a la acción de diversos agentes etiológicos, ya sean biológicos como químicos y depredadores, que causan el deterioro de su salud y, por consecuencia, ocasionan importantes mermas productivas. La afectación directa por enfermedades endémicas, así como la afectación indirecta de las enfermedades exóticas, impide el desarrollo del sector apícola y la productividad de las colmenas en Nicaragua.

Las abejas tienen un gran aporte en la polinización de los cultivos agrícolas y por ende inciden en la seguridad alimentaria a nivel mundial. En este proceso la abeja melífera asume un grado destacado por su eficiente trabajo en la polinización, además de ser la principal protagonista de una de las actividades milenaria de los humanos, permitiendo la fecundación de las plantas. Sin embargo, desde hace algunos años las poblaciones de las abejas melíferas están sufriendo un declive importante por cambios climáticos, pérdida o deterioración de hábitad, monocultivos, plaguicidas y enfermedades endémicas como la varroosis. Esta situación amenaza la seguridad alimentaria en todo el planeta (1).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), de 100 cultivos que dan el 90% de los alimentos del mundo, 71 son polinizados por abejas. En Europa el 84% de las especies de 264 cultivos son polinizados por insectos. No hace falta tener mucha imaginación para percatarse del impacto brutal que la desaparición de los polinizadores tendría en la agricultura. Y lo mismo cabe decir el impacto que podría tener la flora silvestre y su biodiversidad. Miles de especies vegetales existen gracias a los insectos. Nada más que el 87% de las plantas con flores del mundo dependen de animales para la polinización (2).

Los datos antes mencionados demuestran la importancia de las abejas en producción, tanto en la ecología como en la economía para la vida de los

humanos. Por eso los estudios de las patologías apícolas son relevantes para determinar las afectaciones directas y su impacto sobre las colonias. Para buscar las medidas adecuadas de prevención y control de las enfermedades, se trata de mantener la triada ecológica en equilibrio, siendo el agente patógeno uno de los tres pilares en la historia de las enfermedades.

El género *Varroa*, comprende cuatro especies bien diferenciadas: *V. jacobsoni* Oud, descrita como parásito de *Apis cerana* abejas de la isla de Java, extendido en Asia; *V. underwoodi*, descrita como huésped de *A. cerana* en Nepal; *V. rindereri* ectoparásito de *A. mellifera* Koschevnikovi en Borneo y *V. destructor* patógeno de *Apis mellifera scutellata*; éste último distribuido ampliamente en América (20). En algunos países se han realizado estudios con técnicas moleculares determinando los haplotipos presentes del ácaro *Varroa destructor* (2).

En Nicaragua nace la necesidad de un estudio para determinar los haplotipos de varroa presentes en el país, utilizando técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de polimerasa (PCR), que podría ser una herramienta de gran importancia y significativa para diagnósticos más certeros. Los resultados obtenidos a través del presente estudio pueden fortalecer el Plan de Vigilancia Epidemiológica a nivel nacional, que contribuirá a proteger la existencia y la salud de abejas polinizadoras tanto de la forma silvestre y abejas manejadas bajo sistemas de explotación, suponiendo la desaparición de las abejas como un problema de salud pública muy grave (3).

II. Antecedentes

En Nicaragua y en el mundo uno de los principales desafíos en la apicultura es mantenerlas colmenas libres de enfermedades, principalmente de la varroosis, la cual se considera una enfermedad devastadora por lo que además de provocar daños directos en la colmena, el ácaro es portador de virus, hongos y bacteria capaces de desaparecer colmenas.

Se realizó un estudio sobre un algoritmo para la detección y seguimiento del ácaro, proporcionado por el Centro de Investigación Apícola Tropical (CINAT-Costa Rica). Estos registros corresponden a la presencia del ácaro *Varroa destructor* en una celda de abeja africanizada, en un entorno controlado. El objetivo principal en este documento es, presentar las diversas etapas de desarrollo del algoritmo y mostrar los resultados obtenidos en el porcentaje de éxito en la detección. Por lo tanto, se ha implementado un sistema de calibración con el fin de tener un marco mejorado en comparación con el vídeo original. Esta calibración se realiza mediante la búsqueda del área activa, movimiento y definición del ácaro *Varroa destructor*, y finalmente, una detección y seguimiento automático. Este se logró hasta el 93,75% para la detección y el seguimiento de la derecha, trabajando en tiempo real en un entorno controlado (4).

En algunos países de Centroamérica se han realizados estudios genéticos con reinas de abejas con el fin de minimizar riesgos de enfermedades (posible resistencia) y así incrementar la producción de miel. (2) Además, otros estudios sobre la importancia de la biodiversidad apícola para la seguridad alimentaria en Costa Rica. En Centroamérica no se ha detectado el haplotipo que predomina en esta zona o la variedad existente en varroa, aunque se han hecho estudios del agente desde la aparición de *Varroa jacobsoni* (nomenclatura obsoleta) en 1996, como los estudios realizados en Costa Rica, comparando la habilidad reproductiva y mortalidad del ácaro *Varroa destructor* en celdas con crías de obreras y zánganos en abejas africanizadas y la evaluación de diferentes concentraciones de acaricidas comerciales el control de *Varroa destructor* (5).

En España se encontró el haplotipo Coreano según estudios realizados en el año 2006 y 2007. El objetivo principal de este estudio fue detectar aquellos agentes patógenos relacionados con la pérdida de colonias de abejas melíferas en España utilizando para ello técnicas moleculares basadas en la reacción de cadena de la polimerasa (PCR). Los resultados obtenidos muestran una alta detección de *Varroa destructor* (haplotipo Coreano) y *Nosema ceranae* y una relevante prevalencia de *Acarapis woodi* y una baja detección de *Nosema apis*, *Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae* y *Melissococcus pultoni* (6).

III. Problema de investigación

La varroosis es considerada como la enfermedad parasitaria más seria de las abejas melíferas. La patología es producida por el ácaro *Varroa destructor* este acaro se alimenta de la hemolinfa del estado adulto y de los distintos estadios juveniles de desarrollo de las abejas, produciendo una serie de efectos negativos: disminución de la vida media de las abejas infectadas durante su desarrollo pupal, pérdida de peso y malformaciones de las abejas emergentes en las alas, patas y abdomen (13). Evidentemente es un problema para el apicultor de tener que combatir este parasito, ya que necesita aplicar tratamiento y cada tratamiento requiere de cuatro a siete aplicaciones según el caso. El proceso del tratamiento conlleva tiempo, dinero y riesgo de contaminación y lo que es peor a veces de haber tratado las colmenas se debilitan y mueren (14). Este tipo de parasitosis se destaca en el síndrome del despoblamiento de las colmenas, por lo consiguiente podría emerger un problema en la seguridad alimentaria de nuestro país, su dispersión se ha expandido por falta de controles sanitarios y prácticas deficientes derivadas de la actividad comercial entre apicultores (20).

Sin la polinización entomófila (realizada por insectos) aproximadamente un tercio de los cultivos que consumimos tendrían que ser polinizados por otros medios o producirían otra cantidad de aliento significativamente menor. Bajaría la productividad hasta un 75% de nuestras cosechas. Sin duda, los cultivos más nutritivos e interesantes para nuestra dieta entre ellos, muchas frutas y verduras, así como ciertos cultivos forrajeros utilizados para la producción de carne y lácteos se verían afectados de manera grave por un descenso de insectos polinizadores (15).

Por consiguiente, lo antes mencionados ¿Cuáles son los haplotipos de *Varroa destructor* relacionados al grado de infestación en colmenas *Apis mellifera* de apiarios centinela de Nicaragua?

IV. Justificación

La apicultura en Nicaragua tiene un impacto positivo en la economía del país por el aumento en las exportaciones de miel a nivel internacional. Además, creció el interés de realizar investigaciones sobre la frecuencia y la diseminación de enfermedades, así como la aplicación de las buenas prácticas en apicultura.

Aun así, hay muchos temas todavía no investigados, siendo uno de estos la genética de *Varroa destructor*. Con el presente estudio se pretende analizar, a nivel nacional, el haplotipo de varroa que se encuentra en nuestro país. El fin del estudio es identificar el grado de riesgo al que se enfrentan los apicultores de Nicaragua, haciendo énfasis en los haplotipos de varroa encontrados mediante la técnica de PCR y así aportar a las medidas adecuadas para la prevención y control de varroosis.

Nicaragua cuenta con cinco regiones principales en la producción de miel, siendo la región de occidente, la más importante por su producción de miel y por la mayor cantidad de apicultores concentrados en esta región.

En los últimos años se destaca la apicultura por la apertura de nuevos mercados internacionales, dada la excelente reputación en la producción de miel orgánica. Indudablemente la flora apícola es el principal aliado de los apicultores para alcanzar buenas cosechas de miel y polen, las que inciden de forma directa en la seguridad alimentaria.

Históricamente Nicaragua tiene muy pocos estudios realizados en abejas, así como de las patologías apícolas, debido a que es un rubro relativamente nuevo en el país. Existen grandes desafíos, con muchas oportunidades de crecer, debido al potencial favorable que se encuentra en nuestra zona para la apicultura.

Con este estudio pretendemos dar un nuevo conocimiento para la apicultura en Nicaragua determinando específicamente el agente etiológico de la varroosis

mediante el diagnóstico molecular. Los resultados podrían ser aplicadas para desarrollar nuevas técnicas de control de la parasitosis incluyéndolas dentro del Plan Sanitario Nacional (7).

V. Objetivos

Objetivo general:

Determinar los haplotipos de *Varroa destructor* relacionados al grado de infestación en colmenas de *Apis mellifera* de apiarios centinela de Nicaragua, 2015 al 2016.

Objetivos específicos:

1. Determinar el nivel de infestación de *Varroa destructor* en las colmenas estudiadas de los apiarios centinelas del país.
2. Identificar los haplotipos de *Varroa destructor* en las colmenas estudiadas de los apiarios centinelas del país mediante la técnica de PCR.

VI. Marco teórico

La apicultura en Nicaragua.

La apicultura en Nicaragua inició en los años sesenta, pero es hasta el 2001 que se inicia un proceso de organización del sector. La actividad apícola en Nicaragua se encuentra desde hace años en franco crecimiento. Según el censo apícola realizado por el Ministerio de Agricultura Ganadería y Forestal (MAGFOR) en ese entonces hoy Instituto de Protección de Agricultura y Ganadería (IPSA) en el 2014 en Nicaragua existen unos 1400 apicultores. En el país con unas 35,000 colmenas en total, entre colmenas de 3 cuerpos o alzas, colmenas de dos cuerpos, cámaras de crías y núcleos. Estas colmenas están distribuidas principalmente en la región de El Sauce, Boaco, Jinotega, Matagalpa, Managua y Chinandega. Si se toma en cuenta la extensión territorial de Nicaragua, se puede decir que se está desaprovechando una buena parte del potencial apícola del país. Si hacemos una simple comparación con respecto a la apicultura de los demás países de Centroamérica, nuestro país es el que cuenta con menos desarrollo apícola, estando a la cabeza El Salvador con un área geográfica 6 veces más pequeña que la nuestra, en donde logran albergar unas 75,000 colmenas (23).

Comercialización de miel en Nicaragua.

La comercialización de la miel producida en Nicaragua sigue un flujo agroalimentario que abarca todo el espectro de la miel, desde el néctar hasta los consumidores. Este último es un agente de los sistemas agroalimentarios que esta revolucionado la forma de producción y comercialización de los productos alimenticios. El consumidor se ha convertido en el punto de partida para cualquier sistema de producción agroalimentaria, principalmente para la miel de abeja por ser considerado un producto de especialidad de alta calidad (22).

Tabla. 1 Países a que se exporta la miel de Nicaragua.

Establecimiento	Francia	Alemania	EE.UU	Suiza	Costa Rica	Bélgica	Italia
COSATIN RL	X	X					X
INGEMANN		X					
NICARAOCOOP			X	X	X	X	
APIDOSA		X					
NOCA		X					
AUGUSTO GARCIA		X					

Plan Apícola Nacional.

El 13 de enero del 2011 en Managua, Nicaragua el Ministerio Agropecuario y Forestal, a través del Área Apícola de la Dirección General y Protección Agropecuaria (DGPSA), en el marco del proyecto Plan Sanitario de Nicaragua, presentó el análisis de los resultados del Diagnóstico de las Enfermedades Apícolas de los apicultores monitoreados a nivel Nacional. El estudio tuvo como objetivo determinar la prevalencia e incidencia de 7 enfermedades, de las cuales 6 son de declaración obligatoria a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (24).

Sin embargo, se hace necesario diseñar un Plan de Vigilancia Epidemiológica Apícola, que abarque desde la inspección, diagnóstico, control, prevención y tratamiento de las principales enfermedades que afectan a las abejas, enfatizando en las de notificación obligatoria de la OIE (24).

Con la implementación de este plan a los consumidores, internos y externos, se les podrá garantizar la calidad y la inocuidad de los productos de la colmena, lo que mejoraría el consumo por el nivel de confianza, que generarían estos productos. Igualmente se podrá certificar el estatus sanitario, requisito indispensable para las exportaciones (24).

En Nicaragua como en el mundo uno de los mayores problemas sanitarios que limita la producción en apicultura es la parasitación de *Apis mellifera* por *Varroa destructor*, que origina la varroosis. La aplicación de adecuados programas de control de esta parasitación es requisito indispensable para asegurar la viabilidad de cualquier explotación apícola (24).

Varroosis.

Agente etiológico:

Es una parasitosis de las abejas causada por el ácaro *Varroa destructor* (16), que afecta a las tres castas de abejas melíferas en sus etapas de larva, pupa y adulto, considerándosele como el peor enemigo de la apicultura (8).

Tabla.2 Clasificación taxonómica de *varroa*.

Phylum:	<i>Arthropoda</i>
Subphylum:	<i>Chelicerata</i>
Clase:	<i>Arachnida</i>
Subclase:	<i>Acarida</i>
Orden:	<i>Gamasida</i>
Familia:	<i>Varroidae</i>
Género:	<i>Varroa</i>
Especie:	<i>Varroa destructor</i>

La varroosis está producida por el ácaro *Varroa jacobsoni*, de la especie *Apis cerana* (abeja oriental o abeja asiática), por el ácaro *Varroa destructor* en *Apis mellifera* (abeja europea occidental) y por el ácaro *Varroa rindereri* a la especie *Apis koschevnikovi*. En *Apis cerana* la cantidad de ácaros adultos varía de 0 a 700 y se genera un equilibrio donde coexisten el huésped y el parásito. El ciclo reproductivo de esta especie se lleva a cabo en las celdas de los zánganos y no en la de obreras, como es el caso de *Varroa destructor*. Además *Apis cerana* tiene la particularidad de quitar las varroa de las celdas, de quitarse las mismas entre los adultos, con lo cual se mantiene un equilibrio constante. En 1963 se detecta *Varroa destructor* sobre *Apis mellifera* (21).

Estos ácaros tienen ocho patas en estado adulto que terminan en ventosas, mientras en estado larval poseen seis patas. Las hembras son las que parasitan a las abejas, y son de un color castaño rojizo claro a rojizo oscuro. Los machos son de color blanquecino amarillento, tienen menor consistencia y son mucho más pequeños que las hembras por poseer dimorfismo sexual. El cuerpo de la hembra varroa adulta está adaptado al parasitismo y a la foresia, tiene una forma elipsoidal, es deprimido dorso ventralmente. La hembra mide alrededor de 1500 μm , de ancho, lo que es muy grande para un ácaro. El macho no está adaptado al parasitismo, ya que su cuerpo es casi esférico; y mide 400 μm (9).

Ciclo Biológico.

La hembra de varroa parasita sobre la abeja adulta, principalmente dentro de la colmena antes de iniciar su ciclo reproductivo. La hembra fundadora entra a la celda de la larva de la abeja que va a parasitar aproximadamente 15 horas antes de la operculación que ocurre en celdas de abeja obrera al noveno día, y en abeja zángano al décimo día. Esto es aproximadamente cuando la larva de obrera pesa 100 mg. y la de zángano 200 mg. Este momento es crucial, porque apenas entra la hembra fundadora, se sitúa en el fondo de la celda con el propósito de no ser eliminada por las abejas obreras limpiadoras. Al parecer el ácaro se guía por esteroides de ácidos grasos que las larvas de abejas emiten con el fin de provocar la operculación, que son atractivos para varroa también (palmitato de metilo). Para su reproducción, el ácaro prefiere la celda del zángano, en virtud del mayor período de metamorfosis que tiene el macho de las abejas (23 días), así pudiendo criar de 5 a 7 ácaros en una celda de zángano y de 3 a 6 en una de obrera. La ovoposición de la varroa hembra se produce en el interior de la celda, una vez operculada. El primer huevo puesto por la hembra varroa da como resultado un macho por no ser fecundado (huevo haploide), y los siguientes son hembras (al ser huevos fecundados diploides), poniendo un huevo cada 30 horas aproximadamente. Cuando la celda es infestada con una sola hembra de varroa fundadora, el apareamiento sólo puede ocurrir entre el macho y sus hermanas, y es entonces consanguíneo. El macho se apareará con la primera hembra tan pronto

como llega a la fase adulta. El apareamiento puede ser repetido hasta 9 veces. Cuando la segunda hija llega a ser madura, el macho abandona la primera hija, para aparearse con ella. Si una tercera hija llega a ser adulta, se repite el mismo escenario (21).

El género *Varroa* incluye actualmente cuatro especies: *Varroa jacobsoni*, descrita originalmente de la isla de Java como ectoparásito de *Apis cerana*, se ha descrito por toda Asia; *Varroa underwoodi* descrita como parasito de *Apis cerana* en Nepal; *Varroa rindereri* descrita en Borneo como ectoparásito de *Apis koschevnikovi*; *Varroa destructor* descrita como ectoparásito de *Apis cerana* y *Apis mellifera* con el nombre de *Varroa jacobsoni* (21).

Varroa destructor, un ectoparásito, constituido como un agente patógeno de *Apis mellifera scutellata* a nivel mundial, se le atribuye la pérdida de cientos de colonias y billones de dólares en relación al beneficio de la agricultura, Se le ha responsabilizado del síndrome de despoblamiento de colmenas, que se viene presentando a nivel mundial el cual aún no ha sido completamente explicado, Ningún otro patógeno, como este ácaro ha causado tanto impacto sobre las abejas en toda la historia de la apicultura, teniendo en cuenta que las pérdidas en la actualidad son incalculables (21).

El ectoparásito, genera efectos sinérgicos negativos sobre el estado inmunológico y nutricional de las abejas de manera individual y colectiva, no sólo causando lesiones físicas, sino permitiendo la proliferación de hongos, bacterias y virus en las colonias que parasita, actuando como vector de microorganismos (21).

Diversos microorganismos, han sido identificados en colonias de abejas, que se asocian a la presencia y actividad de *Varroa*, entre ellos los virus de la parálisis crónica (VPC) y aguda (VPA) que causan hinchamiento del abdomen, cambios fenotípicos y capacidad de vuelo; el de las alas deformes (VAD) de procedencia Polaca, genera reducción de tamaño de las abejas, deformación y presencia de

alas atrofiadas, con presencia en colmenas de África, Asia y Europa el de Kashmir (VK), parálisis lenta (PPL), entre otros (21).

Se ha demostrado que VPA, se encuentra diseminado en colonias de abejas de todo el mundo, su dispersión se ha expandido por falta de controles sanitarios y prácticas deficientes derivadas de la actividad comercial entre apicultores, VPA, se identificó por primera vez en paquetes de abejas introducidas Estados Unidos desde Australia en el año 2005 y en jalea real China (17).

Durante los últimos 30 años, la varroosis se ha convertido en la plaga más perjudicial para la apicultura. El responsable de esta enfermedad fue descrita por primera vez desde Java por Oudemans (1904), como un parásito de la abeja melífera oriental, *Apis cerana*, y fue llamado *Varroa jacobsoni*. Este parásito natural de *A. cerana* se desplazó a la abeja melífera occidental, *A. mellifera*, cuando éste se introdujo en Asia por razones apícolas. En las dos especies hospedador, el parásito fue considerado por primera vez como perteneciente a la especie *V. jacobsoni* (18).

Sin embargo, un estudio detallado de Anderson & Trueman (2000), basado en las secuencias del ADN mitocondrial, reveló la existencia de al menos dos especies: *Varroa jacobsoni* es *stricto sensu* presente en Indonesia y Malasia sobre *A. cerana*, mientras que la especie recientemente descrita, *V. destructor*, se encuentra principalmente en *A. cerana* de Asia continental. Sólo *V. destructor* parasita *A. mellifera*, a pesar de todas las publicaciones antes del cambio de la nomenclatura en 2000. Al mediado del siglo pasado, el parásito invade Europa, seguido de una rápida expansión a casi todo el mundo (18).

Para el análisis de microsatélites y escribiendo ADNmt, se extrajo ADN de ácaros hembra por un método de Chelex descrito por Walsh et al. (1991), en un volumen de 100 µl adaptado al tamaño pequeño de los ácaros (ca. 1 mm longitud) (18).

Para las amplificaciones de la secuenciación de fragmentos de ADN mitocondrial del PCR, se usa ADN total extraído por un cetiltrimetilamonio bromuro (CTAB), un procedimiento adaptado para organismos pequeños (18).

Varroa jacobsoni fue descrita por primera vez como un ácaro ectoparásito natural de la abeja melífera oriental (*Apis cerana*) en toda Asia (Oudemans, 1904a). Más tarde se cambió la sede de la abeja occidental (*Apis mellifera*) se ha convertido en una plaga grave de las abejas en todo el mundo. Los estudios reportan genotípico, fenotípico y variaciones reproductiva entre *V. jacobsoni* que infestan *A. cerana* a en toda Asia, demuestran que *V. jacobsoni* es un complejo de al menos dos especies diferentes. En una nueva clasificación *V. jacobsoni* es aquí redefinido abarcando nueve haplotipos (ácaros con secuencias de genes del ADN mitocondrial distinta CO-I) que infestan *A. cerana* en la región de Malasia e Indonesia. Se incluye un haplotipo de Java, se utilizaron muestras de los cuales para describir primero *V. jacobsoni* en el comienzo de este siglo. Un nuevo nombre, *V. destructor* sp., se da a seis haplotipos que infestan *A. cerana* en Asia continental. Las hembras adultas de *V. destructor* son significativamente más grande y menos de forma esférica que las hembras de *V. jacobsoni* y también son reproductivamente aislado de las hembras de *V. jacobsoni*. Las posiciones taxonómicas de las otras tres haplotipos únicos que infestan *A. cerana* en las Filipinas es incierto y requiere más estudio.

Otros estudios reportan muestra que sólo dos de los 18 haplotipos diferentes dentro del complejo de ácaros que infestan *A. cerana* se han convertido en plagas de *A. mellifera* en todo el mundo. Ambos pertenecen a *V. destructor*, y no son *V. jacobsoni*. El más común es un haplotipo Coreano, llamada así porque se encontró parasitando *A. cerana* en Corea del Sur. Fue identificado en *A. mellifera* en Europa, la Oriente Medio, África, Asia y las Américas. Menos común es el haplotipo Japón / Tailandia, llamado ya que también se encontró parasitando *A. cerana* en Japón y Tailandia. Se identificó en *A. mellifera* en Japón, Tailandia y América.

Para la determinación del haplotipo *Varroa destructor*, hasta el momento, sólo dos de los seis haplotipos de *Varroa destructo* han conseguido infestar y reproducirse en *Apis mellifera*: el Coreano y Japonés/tailandés, siendo el haplotipo coreano el más prevalente y virulento. Un haplotipo en genética es una combinación de alelos de diferentes *loci* de un cromosoma que son transmitidos juntos. Un haplotipo puede ser un locus, varios *loci*, o un cromosoma entero dependiendo del número de eventos de recombinación que han ocurrido entre un conjunto dado (16)

El estudio de ADN mitocondrial (ADNmt) de este acaro ha permitido la descripción de dos haplotipos (Japonés y Coreano) que tienen diferente virulencia (patogenicidad). En España solo está presente uno de los haplotipos, el coreano, el cual es el más virulento y de más amplia distribución mundial.

Situación zoonositaria de varroosis

En la apicultura mundial *Varroa destructor*, ha causado un impacto negativo, por lo que ha sido necesario realizar evaluaciones sobre su dispersión; en las décadas 60 y 80, se detectó en países del Este de Europa, a raíz de importaciones de abejas del Archipiélago Indonésico. El ácaro procedente del sudeste asiático, en pocos años se extendió de manera significativa en Grecia (1975), Alemania (1977), Italia (1980), Francia (1982), Holanda (1983), Israel (1984) y España (1985), pero solo fue oficialmente aceptada por los organismos de control y vigilancia en 1986, países suramericanos en los 70's (Argentina, Paraguay y Brasil), Estados Unidos (1987) , México (1992) y Nicaragua (1996) (25).

La infestación en Suramérica, fue causada presuntamente por la donación de paquetes de abejas por parte de Japón a Paraguay en 1971, Chile, estuvo libre del ácaro, a causa de las condiciones geográficas que impedían su ingreso desde Argentina, La Oficina Internacional de Epizootias, hasta 1991, había clasificado al país austral, libre de ésta parasitosis, situación que se hizo contraria en marzo de 1992 (25).

En México, el ectoparásito, se había expandido desde los años 90 poniendo en evidencia su efecto en el rendimiento y cosecha de miel. Actualmente, Argentina lo ha considerado como un parásito hiperendémico. En Canadá se ha evidenciado el efecto devastador del ácaro sobre el tamaño y fortaleza de más de 400 colonias evaluadas en distintos periodos estacionales. Efectos similares se han reportado en Estados Unidos y en Europa. En Portugal se había reportado que colonias infestadas por varroa, eran responsables de la pérdida de la capacidad productiva de miel con 45% de descenso en relación a las colonias no infestadas (25).

En Colombia, la situación no ha sido diferente, las primeras colmenas infestadas fueron reportadas para el departamento de Cundinamarca. En 1994; en Venezuela, fue registrado por primera vez en apiarios ubicados en el estado Barinas en 1991. La reducción, pérdida y muerte de colonias infestadas independiente de la zona geográfica en el mundo, ocurren en un periodo de 2 a 4 años de iniciada la infestación; esto obedece principalmente a la duración de estadio adulto de las abejas parasitadas, que viven en promedio la mitad del tiempo en relación a las no infestadas (17).

El ectoparásito se ha expandido, debido a las dificultades que presenta erradicarlas, a la mala manipulación de las abejas, a la rápida reproducción y diseminación 100 veces por año. El desequilibrio a favor de varroa obedece en principio a la falta de conocimiento de mecanismos que faciliten su persistencia y condiciones sanitarias por parte de los apicultores en relación al manejo de sus colonias y a la ausencia de tratamientos adecuados para su control y que no alteren el metabolismo de *Apis mellifera* (17).

Los factores que provocan que varroa se instale en las celdas, podría estar influenciado por componentes químicos de naturaleza hormonal propia de las larvas, que inciden en la penetración del ácaro al interior de la celda. El ácaro puede desarrollarse y reproducirse sanamente a partir de la hemolinfa de las abejas. La abeja, como hospedero final, presenta sintomatologías que van desde

la pérdida de patas y alas, hasta parálisis crónica. El impacto de la varroosis en la apicultura presenta dimensiones diversas en términos geográficos, que se presentan en función de la incidencia, mientras que en globalidad representan un grave problema (17).

En Brasil, los híbridos de abejas africanas exhiben comportamientos diferenciados, presentando cierta resistencia y tolerancia al ácaro. Se desconoce sin embargo, la severidad del impacto causado por varroa sobre los haplotipos de abejas de una zona determinada, aunque estudios que correlacionan los genotipos, indican que están en función de su fertilidad en diferentes entornos, encontraron una tasa reproductiva de varroa algo menor en colonias de abejas africanizadas respecto de las abejas europeas (25).

De acuerdo a la capacidad de los ácaros para la reproducción en *Apis mellifera* en climas tropicales es independiente de la raza de abejas. Desde que Oudemans, (1904) describiera el ácaro, numerosos autores han venido ampliando la información sobre la morfología externa del parásito y su dinámica poblacional alrededor del mundo reconoce cambios morfológicos por selección natural con el fin de sobrevivir a efectos climatológicos y geográficos para satisfacer sus necesidades (24).

En Colombia la población apícola es predominantemente africanizada, con cerca de 13 haplotipos de linaje africano A, que sugieren más de un episodio de hibridación, introgresión y expansión del fenómeno de africanización. Sobre algunas de estas poblaciones se ha observado la presencia de varroa, pero no se ha establecido la incidencia en función de su origen geográfico. El objetivo de este trabajo se ha centrado en la caracterización morfométrica, la incidencia y distribución del agente epizootiológico de la varroosis en su fase forética, sobre ecotipos de abejas establecidas en zonas biogeográficas colombianas, determinando el impacto (17).

Método de diagnóstico PCR

Este método se basa en la introducción de fragmentos de ADN, uno de los cuales contendrá el gen de interés, en vectores. Éstos son moléculas de ADN (plásmidos o ADN de bacteriófagos) capaces tanto de transportar fragmentos ajenos a su estructura original como de multiplicarlos dentro de bacterias. Si se conoce un pequeño tramo de la secuencia de aminoácidos de una proteína cuyo gen se desea "clonar" (multiplicar), se pueden diseñar métodos para identificar qué bacterias llevan el vector que transporta dicho gen. Este reconocimiento también se puede realizar si se dispone de un anticuerpo contra la proteína resultante del gen que se desea clonar. En este caso se reconoce la bacteria portadora porque fabrica la proteína codificada por el fragmento de interés, la cual se une específicamente al anticuerpo (26).

La molécula de ADN es una estructura constituida por dos cadenas que codifican la información genética de un organismo. Cada cadena es una secuencia de nucleótidos. La lectura de esta secuencia de nucleótidos proporciona la información genética propia del organismo. Con la técnica de la PCR (Polymerase Chain Reaction: reacción en cadena de la polimerasa) es posible obtener millones de copias de un fragmento del ADN (por ejemplo, de un gen de interés). La proteína que lleva a cabo el proceso de copia de las cadenas del ADN es la ADN polimerasa (26).

En el primer ciclo de la PCR se consigue duplicar el fragmento de interés porque cada cadena del ADN sirve de molde para la síntesis de otra cadena. Como en cada ciclo aumenta el número de cadenas que sirven de molde para la ADN polimerasa, en tan sólo 25 ciclos de copia la técnica de la PCR permite obtener millones de copias de un fragmento que se encontrara presente como copia única al comenzar el proceso (26).

Los aspectos importantes para la PCR in situ incluyen la fijación y la permeabilización durante la preparación de la muestra, un mecanismo para ciclación y el material celular en la solución o en laminillas de cristal. Antes de llevar a cabo la PCR in situ, las células o las muestras del tejido fino son fijadas y permeabilizadas para preservar la morfología y permitir el acceso de los reactivos de PCR a las secuencias intracelulares que se quieren amplificar. La amplificación de PCR de las secuencias blanco se realiza después en las células intactas en tubos micro-Eppendorf o directamente en preparaciones citocentrifugadas o secciones del tejido fino en laminillas de cristal (26).

Las células en la mezcla de reacción de PCR son termocicladas en tubos microEppendorf usando cicladores convencionales de bloque. Después de la PCR las células son citocentrifugadas sobre las laminillas de cristal con la visualización de los productos intracelulares de PCR por ISH o inmunohistoquímica. La PCR in situ en las laminillas de cristal es realizada sobreponiendo las muestras con la mezcla de PCR debajo de una tira que se sella con cera o aceite mineral para prevenir la evaporación de la mezcla de reacción. Un ciclo térmico se completa poniendo las laminillas de cristal sobre los bloques de calentamiento de un termociclador convencional o diseñado especialmente o usando hornos que completan un ciclo térmico. La detección de los productos de PCR intracelular se realiza por dos técnicas diferentes: 1) Indirectamente por ISH con sondas específicas para el producto de PCR (PCR in situ indirecto) 2) Sin ISH con la detección directa de los nucleótidos etiquetados (digoxigenina-11- dUTP, fluoresceína-dUTP, 3H-CTP o biotina-16-dUTP) que se han incorporado en los productos de PCR (PCR in situ directa) (26)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplificaciones para la secuenciación de fragmentos de ADN mitocondrial para v. destructor se usa ADN total extraído por un cetiltrimetilamonio bromuro (CTAB) procedimiento adaptado para organismos pequeños (Navajas et al., 1998) (18).

VII. Diseño Metodológico

Tipo y área de estudio:

Se realizó un estudio de corte transversal vinculado a las actividades de la vigilancia epidemiológica de la sanidad apícola en Nicaragua realizado por el IPSA. Las muestras incluidas para obtener los resultados de este estudio se tomaron a lo largo del año 2015.

Población de estudio:

En total existen 1202 apiarios a nivel nacional, de los cuales 42 están destinados para el monitoreo tipo centinela. (Fuente: Censo apícola 2012, IPSA).

Selección y toma de la muestra:

La selección de la muestra era no-probabilística, realizando un muestreo por conveniencia en apiarios centinela: apiarios identificados por estar en zonas fronterizas y/o zonas donde hay mayor practica de apicultura en riesgo de entrada y propagación de una determinada enfermedad o plaga.

Se tomaron muestras de 2 colmenas por apiario, tomando en cuenta aquellas colmenas que el apicultor considere tenga colonias bajas por causa de alguna enfermedad para su debido diagnostico conservándolas en vasos plásticos con alcohol al 90%. Por colmena seleccionada se recolectaron 200-250 abejas adultas de 3 diferentes panales de la cámara de cría, para su posterior análisis.

Unidad de análisis:

Para determinar el grado de infestación de varroosis la unidad de análisis fueron las colmenas de los apiarios centinela y para la determinación de los haplotipos de *Varroa destructor* la unidad de análisis fueron 5 ácaros hembras adultas por muestra unidas en un pool determinado por la zona del muestreo.

Fuente de datos:

Se elaboró una la base de datos a través de la información obtenida por las fichas técnicas (ver anexo) durante la inspección en el muestreo, y además se incluyeron

los resultados del diagnóstico obtenidos por el laboratorio de CENAPROVE (diagnóstico de varroosis) y el laboratorio CEVEDI Medicina Veterinaria de la UNAN – LEON (diagnóstico de PCR para determinar los haplotipos de los ácaros).

Tabla. 3 Operacionalización de las variables:

Nombre	Definición	Medición	Escala
Haplotipos	Haplotipos de <i>Varroa destructor</i> identificados en la colmena estudiada.	PCR	Haplotipo coreano(K) Haplotipo japonés(J)
Varroosis	Nivel de infestación de varroosis de la colmena estudiada	Determinación del nivel de la infestación en el laboratorio	0 – 5%= bajo 5 – 10%= medio >10%= alto
Apiarios centinela	Lugares de mayor concentración de apicultura y/o sitio fronterizo.	Distribución geográfica del país	Departamento de Nicaragua
Periodo	Tiempo en que se realiza el muestreo.	Meses del año	Mayo 2015 hasta Mayo 2016.

Análisis:

Prevalencia en abejas adultas:

Elementos necesarios:

- Todas las abejas de la muestra con alcohol.
- Sistema de colador doble con tamiz grueso para retención de abejas y tamiz de malla fina para retención de varroa.
- Agua corriente

Descripción del Método:

1. Se toma la muestra de abejas nodrizas en alcohol y se agita por dos minutos. El alcohol provoca el desprendimiento de los ácaros, separándolos de las abejas.
2. Se vierte el contenido del frasco dentro de un filtro de malla doble; las abejas quedan retenidas en el primer filtro, y los ácaros en el segundo filtro.
3. Lavar la muestra debajo del grifo con abundante agua y remover durante algunos minutos para quitar todos los ácaros que puedan quedar entre las abejas.
4. Contar por separado los ácaros y las abejas contenidos en la muestra.
5. Calcular la relación porcentual entre el número de ácaros y el número de abejas. Utilizando para ello la siguiente formula:

$$\text{Prevalencia en adultas (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{Ácaros} \times 100}{\text{N}^\circ \text{Abejas}}$$

Determinación de haplotipos de *Varroa destructor*

El haplotipo mitocondrial está asignado a uno de los dos tipos de ADN Mitocondrial de *Varroa destructor*; se determinará mediante la restricción Sac I de la PCR, producto de un fragmento del gen. Un nuevo par de cebadores fue diseñado por Navajas et al (2002) desde la completa secuencia del ADN mitocondrial: (18)

Tabla. 4 Secuencias del ADN

Primer	Secuencia 5' - 3'	Amplificación
co-i	TACAAAGAGGGAAGAAGCAGCC	128/124bp
co-i	GCCCCTATTCTTAATACATAGTGAAAATG	252/256bp

Extracción del ADN

- 1- Formar los pools de 5 especímenes (hembras adultas), basándose en las características morfométricas y la procedencia.
- 2- Cortar los parásitos en trozos pequeños con bisturí y colocarlos en un vial de 2 ml.
- 3- Agregar 200 µl de agua libre de nucleasas y macerar con un mortero estéril hasta obtener una textura pastosa, posteriormente agregar 200 µl más de agua libre de nucleasas.
- 4- De la mezcla anterior colocar 200 µl en un vial nuevo y seguir los procedimientos descrito por el kit comercial de QiaGen.

Reacción de PCR

- 1- Rotular los viales para PCR con la identificación de cada muestra
- 2- Preparar la mezcla de reacción sin agregar el DNA de las muestras a como se muestra en la tabla 5 :

Tabla. 5 Reactivos del PCR

Reactivo	Volumen (µl)
Quantimix 2X	25
Primer mtDNA F	2
Primer mtDNA R	2
Agua libre de nucleasa	16

- 3- Agregar 5 µl de DNA extraído previamente
- 4- Amplificar utilizando el siguiente protocolo: Calentamiento previo a 94 °C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 52 °C por 1.30 min, 72 °C por 1.30 min, y una extensión de 72 °C por 7 min y finalmente 4 °C q.

Digestión con enzima SacI

- 1- Agregar 0,4 µl de enzima Sac I al producto del PCR.
- 2- Incubar a 37 °C por una hora.
- 3- Correr la electroforesis en gel agarosa al 1.5% en 80 voltios por 30 minutos.

- 4- Observar en la luz ultravioleta y tomar la foto del gel.

Interpretación

Si se observan dos bandas corresponderá a *Varroa destructor* haplotipo japonés (J)

Si se observa una banda corresponderá a *Varroa destructor* haplotipo coreano (K).

Materiales y reactivos

- 1- Kit de extracción de DNA QiaGen.
- 2- Enzima de restricción SacI
- 3- Mastermix o quantimix 2X
- 4- Primer mtDNA F y Primer mtDNA R
- 5- Agua libre de nucleasas
- 6- Viales de 2 ml
- 7- Viales de PCR
- 8- Bisturí
- 9- Morteros de plástico
- 10- Microcentrífuga
- 11- Termociclador
- 12- Lámpara UV
- 13- Cámara fotográfica
- 14- Alcohol al 90%
- 15- Agua en abundancia
- 16- Tamiz grueso
- 17- Tamiz fino
- 18- Vasos plásticos
- 19- Trajes apícolas (overol, velo blusa y guantes)
- 20- Espátula
- 21- Ahumador

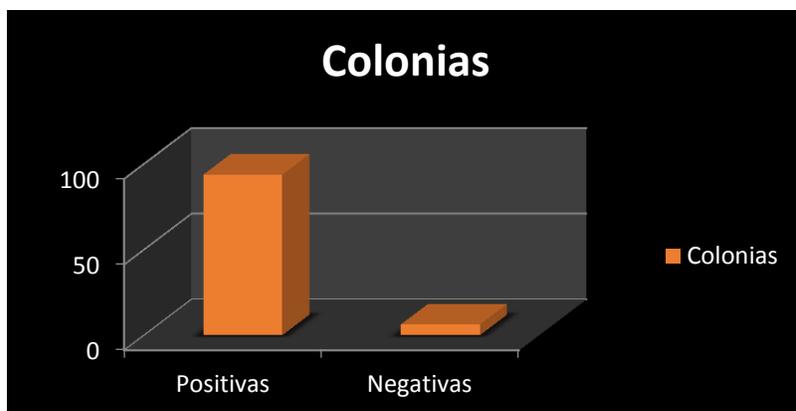
VIII. Resultados

Se realizaron visitas técnicas de campo para la ejecución del muestreo entre los meses mayo de 2015 y mayo de 2016. Se incluyeron zonas biogeográficas de intensa actividad apícola en los departamentos Rivas, Carazo, Granada, Masaya, Managua, León, Chinandega, Matagalpa, Estelí, Madrid, Nueva Segovia, Boaco y RACCS, comprendido las cuatro regiones de Nicaragua.

De los 42 apiarios centinelas visitados, se recolectaron muestras de abejas adultas de la cámara de cría de 29 apiarios centinelas nivel nacional, debido a que el resto de los apiarios centinelas en su momento del muestreo estaban en trashumancia. Además, por la época de crisis se encontraron apiarios con pocas colmenas y colmenares bajas en población. Otra situación fueron zonas con abundante lluvia que no permitieron la toma de muestra. Un total de 78 muestras fueron colectadas aplicando técnicas de muestreo aleatorio simple (MAS) y analizadas en los laboratorios del Instituto de Protección y Sanidad Agropecuaria (IPSA) y de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN - León). El material biológico que se recolectó, fue de 250 a 300 abejas y se trasladó en vasos de plástico en alcohol al 90%.

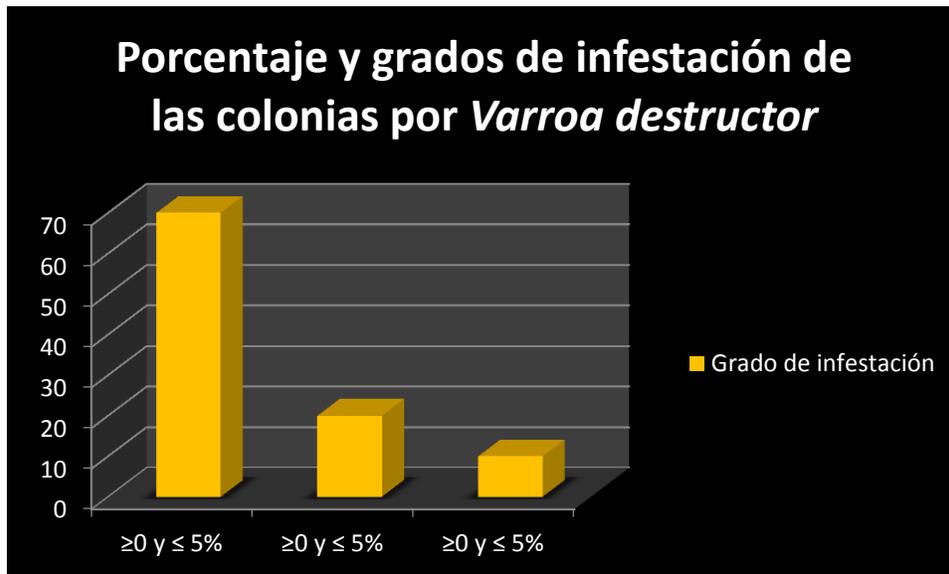
En los 29 apiarios centinelas muestreados, se encontró *Varroa destructor* en el 93.67 % de las colonias muestreadas (Gráfico.1).

Gráfico.1 Colonias con presencia de *Varroa destructor*.



De las colonias estudiadas, se clasificaron por su intensidad de infestación a partir de la relación porcentual entre ácaros presentes y abejas adultas. En el Grafico 2 se aprecia la diferencia porcentual de la Intensidad de Infestación (II), presentado el mayor porcentaje (70%) de colonias con II baja (≥ 0 y $\leq 5\%$)

Gráfico. 2. Nivel de infestación de varroa de apiarios centinelas del país.



Porcentajes de infestación por departamento:

Como se puede observar en la tabla 6, existe variabilidad en los diferentes resultados de las muestras tomadas en el periodo de mayo 2015 a mayo 2016 según su porcentaje de infestación por departamento. Es necesario recalcar que entre valores porcentuales encontrados, se observan datos por encima de 10% lo que no indica infestaciones altas, que se describen tanto el valor más alto como el valor más bajo, los departamentos que presentaron colmenas con mayor porcentaje de infestación de varroa Nueva Segovia con 11.30%, León 18.60% y Matagalpa 11.88%.

Tabla.6 Porcentaje de infestación de las colonias por *Varroa destructor* según Departamento.

Departamento	Porcentaje de infestación	
	Mayor %	Menor %
Boaco	7.69%	0.00%
Carazo	3.40%	3.40%
Chinandega	3.81%	0.53%
Estelí	6.00%	2.08%
Granada	3.28%	3.28%
León	18.60%	0.00%
Madriz	6.78%	0.00%
Managua	1.61%	0.37%
Masaya	2.58%	2.58%
Matagalpa	11.88%	2.30%
Nueva Segovia	11.30%	7.14%
RACCS	5.58%	1.79%

Resultados PCR

Del total los ácaros encontrados en las muestras de abejas colectadas, se hicieron 24 pool, separados por diferentes región y grados de infestación de las colmenas con el acaro.

Del total los ácaros encontrados en las muestras de abejas colectadas, se hicieron 24 pool, separados por diferentes región y grados de infestación de las colmenas con el acaro.

Al realizar el análisis de todos los ácaros encontrados en las muestras de abejas colectadas, se hicieron 24 pool, separados por municipios, departamentos y las diferentes región del país y grados de infestación de las colmenas con el acaro de 5 *Varroa* cada uno. El haplotipo de *varroa* se determinó mediante la restricción de Sac I de la PCR producto de un fragmento del gen de CO-I (Anderson & Fuchs 1998) Un nuevo par de cebadores fue diseñado desde la completa secuencia del ADN mitocondrial (Navajas et al., 2002):

Según Navajas et al., (2002). Al realizar el PCR con los ácaros encontrados en el presente estudio, se observó, que los 24 pool se marcaron 252/256 bp, lo que demuestra que el ectoparásito varroa que se encuentra en Nicaragua, es *Varroa destructor* haplotipo Coreano.

IX. Discusión

Niveles de infestación:

En muestreos que se han realizado en diferentes zonas apícolas en años anteriores, se encontró que los departamentos de Rivas, Madriz y Jinotega obtienen un porcentaje de infestación mayor del 6.16% en año 2013, en 2014 Nueva Segovia, Estelí y Masaya presentan un porcentaje arriba del 5.9%. En este estudio se observó que León, Nueva Segovia, Estelí, Madriz y Matagalpa obtienen los porcentajes más altos desde 6% debido a que muchos de los apicultores no aplican ningún tipo de tratamiento ante esta parasitosis y muchos de los apicultores del norte no realizan la trashumancia. Además que los niveles de precipitación asociados a las zonas de vida, el clima frío favorece la proliferación y actividad de la varroa.

Los niveles de infestación de forma general en promedio son bajos según el protocolo de técnicas laboratoriales de diagnóstico para enfermedades y plagas apícolas realizado por el Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA). El porcentaje de la infestación se considera de una intensidad de infestación baja por debajo del 5%, y en Nicaragua, se encontró un promedio 3.6% a nivel nacional en el año 2015-2016, y en algunas de los casos había existían valores por encima de 10 debido a la falta de las buenas prácticas apícolas en las que más influye podemos mencionar tratamiento contra varroa, panales negros, colonias bajas, alimentación etc.

PCR:

La presente investigación reporta por primera vez en Nicaragua, la caracterización molecular del haplotipo de *Varroa destructor* en abejas *Apis mellifera*.

El estudio realizado en España entre los años 2006 y 2007, utilizando las técnicas moleculares basadas en la reacción de cadena de la polimerasa (PCR). Los resultados obtenidos muestran una alta detección de *Varroa destructor* (haplotipo Coreano).

En este estudio se utilizó la variación del haplotipo mitocondrial asignado al ADN mitocondrial, mediante la restricción de *SacI* de la PCR producto de un fragmento del gen de CO-I (Anderson & Fuchs 1998). Un nuevo par de cebadores fue diseñado desde la completa secuencia del ADN mitocondrial (Navajas et al., 2002): Obteniendo un 99.99% de las muestras se observan con un peso molecular de 252/256 bp indicando haplotipo coreano.

X. Conclusiones

El 93.67% de las colonias muestreadas de 29 apiarios centinelas resultaron positivas a *varroa destructor* y solo el 6.33% fueron negativas.

Las colonias estudiadas se clasificaron por su intensidad de infestación a partir de la relación porcentual entre ácaros presentes y abejas adultas con rango de ≥ 0 y $\leq 5\%$, la intensidad es baja, > 5 y $\leq 10\%$ es media y $> 10\%$. Resultando la baja con un 70%, la media 20% y la alta 10%.

Los departamentos León, Nueva Segovia, Estelí, Madriz y Matagalpa presentaron porcentajes de infestaciones en la colonia mayor de 6%, existiendo variabilidad en los diferentes resultados de las muestras tomadas en el periodo de mayo 2015 a mayo 2016 según su porcentaje de infestación por departamento.

El perfil genético del ácaro *Varroa destructor* infestando colonias de *Apis mellifera* situada en la región del pacífico, norte, centro y caribe del país, ha sido determinado mediante análisis la restricción Sac I de la PCR, producto de un fragmento del gen. Un nuevo par de cebadores fue diseñado por Navajas et al (2002). El haplotipo coreano de *V. destructor* se encontró presente en todas las muestras analizadas, confirmando con este estudio la distribución mundial del haplotipo coreano.

XI. Recomendaciones

1. Continuar con este tipo de investigaciones, ampliando las áreas de estudio tomando en cuenta la aplicación de tratamientos contra varroa en el momento del muestreo.
2. Es necesario efectuar un muestreo y diagnóstico anual de las abejas adultas de cada apiario (10% de las colmenas). Lo ideal es realizarlo unos 3 a 4 meses antes de la floración principal para contar con el tiempo necesario y de acuerdo con los resultados del diagnóstico, dar tratamiento adecuado a los apiarios.
3. No introducir enjambre silvestre directamente a los apiarios (cuarentenarlos).
4. Evitar el intercambio indiscriminado de panales entre colmenas.
5. No colocar las colmenas y apiarios en sitios donde prevalezca humedad, los vientos o las altas temperaturas.
6. No trasladar colmenas a áreas en las que se han diagnosticado brotes recientes.
7. En general es recomendable establecer un programa de control sanitario, con la mayor cantidad de apicultores para incentivarlos en las Buenas Prácticas Apícolas y así poder tener colmenas sanas y con poblaciones adecuadas a su espacio.

XII. Bibliografía.

1. Calderón A., Memorias X Congreso Nacional de Apicultura, Apicultura y su impacto en la seguridad Alimentaria, 2009, CINAT-UNA-SANSA-MAG-CANAFAPI, Cartago Costa Rica.
2. FAO, Alimentacion Mundial: Riesgo por declive de las Abejas, 2014. <http://www.taringa.net/posts/ciencia-educacion/18077023/Alimentacion-mundial-riesgo-por-dec>.
3. González M., Plan de Vigilancia Epidemiológica de Nicaragua. MAGFOR, 2012.
4. Ramírez M, Travieso E, Calderón R Arrollo J, Salas O, Mora F., Detección y seguimiento de objetos presentes en video 2d con MatLab, Inicio Vol. 27, Numero 2 (39-50), 2013.
5. Lalama K., Evaluación de la efectividad de tres acaricidas y el control del acaro *V. jacobsoni* en abejas *Apis mellifera* en Costa Rica. CINAT, 2000.
6. Bailon G., Encarna B., Hernández M., Martin R., Martin A., et al. Prevalencia de los principales agentes patógenos de *Apis mellifera iberiensis* en la Cabaña Apícola Española. Anales, vol. 25, 109-130, Dic. 2012.
7. Hilmi M. The Marketing of Organic Honey. 244p. numerous graphics, 1er. Ed. 2003.
8. Garibay S. y Zamora E. Producción orgánica en Nicaragua: Limitaciones y Potencialidades. 109p, 1er. Ed. Managua. SIMAS, 2003.

9. Conte Y. y Crauser D., Relación huésped-parasito, para varroa destructor y su importancia en la selección de abejas tolerantes, a este parasito. *Agro sur* 35(1), 61-63, 2007.
10. Franco C., Evaluación de tres productos naturales para el control alternativo del acaro varroa (*Varroa destructor* Anderson y Trueman) en colmenas de abejas *Apis mellifera* usando gel como sustrato portador. Biblioteca, USAC. edu. gt Guatemala, 2009.
11. Flores J., Padilla F. y Pérez A., Aspectos aplicados del ciclo biológico de varroa y de su dinámica estacional. *El colmenar* No 88 http://www.uco.es/dptos/zoologia/Apicultura/Enfermedades_abejas/pato_adu2.htm
12. Gentry C., Manual de Apicultura para el Desarrollo. Elaborado para el Cuerpo de Paz, 1984.
13. Damiani N. y Marcangeli J. 2006 Control del parasito *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) en colmenas de la abeja *Apis mellifera* (Himenóptera: Varroidae) mediante la aplicación de la técnica de entrapado. ISSN 073-5680 *Rev. Soc. Entomol Argent.* 65 (1-2): 33-42, 2006.
14. Valega O., Mejor prevenir que curar. Apícola don Guillermo. 1/9p, Argentina, 2016.
15. Reyes T, Gergely S y Paul J. 2013 El declive de las abejas peligro para la colonizadora y la agricultura de Europa. Nota técnica de los laboratorios de Greenpeace. Revisión 1/2013.
16. Anderson D. y Trueman J., *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp. Acarol.* 24(3): 165-189. 2000.

17. Salamanca G. Osorio P. Rodriguez N, Presencia e Incidencia de *Varroa destructor* (Mesostigma, Varroidae) en colonias de abejas *Apis mellifera* (Himenoptera Apidae) en Colombia. Zootecnia Top. Vol 30 No 2 Maracay Jun. 2012
18. Solignac M., Cornuet J., Vautrin D., Conte Y., Anderson D. Evans J. et al., The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the western honeybee (*Apis mellifera*) are two partly isolated clones. Proc. R. Soc. B (2005) 272, 411–419 USDA.
19. Valladares A: Perdomo R. Lanzas M, Miranda A Cubero A. et al., Protocolo de técnicas laboratoriales de Diagnóstico para enfermedades y plagas apícolas. OIRSA, 2012.
20. Calderón R. y Ortiz A., Manual de Patología Apícola, CINAT/PRAM, Heredia 2002.
21. Moreno F .Eduardo F., Evaluación de la aplicación estival de apilife var en el control de *Varroa destructor* Anderson y Trueman, ectoparásito de *Apis mellifera*, Universidad Austral de Chile Facultad de Ciencias Agrarias Escuela de Agronomía Chile 2006
22. Swisscontact Nicaragua. Estudio de mercado de miel de abeja y estrategia de comercialización Nicaragua y Honduras Noviembre 2010 Managua, Nicaragua.www/Mific.gob.ni
23. BID, PyMerural, Swisscontact, Guía técnica de sanidad apícola. Vaquero J. Vargas P. Plata D. Basado en el manual de sanidad Apícola elaborado por el MV Dr, Jorge Demedio Lorenzo, 2010.

24. IICA, MAGFOR, JICA. Cadena Agroindustrial de la miel de Abeja, Nicaragua 2008.

25. Martínez J. Alcala K. Leal M. Prevención de Varroa y Suplementación, Centro Nacional de investigación disciplinaria en microbiológica Animal, Cuajimalpa D.F Folleto técnico No 6 ISBN978-607.425-555-3 Mayo 2011.

26. Cortázar A. Y Silva P., Métodos Físico-Químicos En Biotecnología PCR, Universidad Nacional Autónoma De México Instituto De Biotecnología, 2004.

XIII. ANEXOS.

Cronograma de toma de muestra 2015-2016

Departamento	2015				2016									
	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	
Boaco	X													
Carazo		X												
Chinandega			X											
Chontales				X										
Estelí					X									
Granada						X								
Jinotega							X							
León								X						
Madriz									X					
Managua									X					
Masaya									X					
Matagalpa										X				
Nueva Segovia										X				
RAAN														
Rivas				X								X	X	
Total														

Tabla: 7 Planificación de la vigilancia pasiva IPSA.

Departamento	Apiarios presentes	Apiarios centinela	# de muestras
Boaco	185	6	12
Carazo	14	1	2
Chinandega	165	4	8
Chontales	37	1	2
Estelí	24	2	4
Granada	48	2	4
Jinotega	99	2	4
León	245	6	12
Madriz	68	6	12
Managua	68	2	4
Masaya	38	2	4
Matagalpa	151	4	8
Nueva Segovia	17	1	2
RAAN	12	0	0
Rivas	31	3	6
Total	1202	42	84

INSPECCION OFICIAL SANITARIA DE APIARIOS

Nombre del Propietario:

Ubicación del Apiario:

Departamento: _____ Municipio: _____

Comarca: _____ Coordenadas: Longitud: _____ Latitud: _____

Fecha Inicio del Evento: _____

Fecha de Notificación: _____

Fecha de Inspección Sanitaria: _____ Otros: _____

Visitó el Establecimiento Si No. Cuadro Clínico Observado _____

Diagnóstico Presuntivo: _____

Con el fin de minimizar los riesgos posibles de contaminación y dispersión de enfermedades, el Departamento de Vigilancia, Epidemiología a través del Área Apícola, sugiere llevar a cabo las siguientes actividades técnicas – sanitarias:

El Cumplimiento de las presentes recomendaciones es responsabilidad del propietario del apiario.

Inspector Oficial Persona que atendió la Inspección

CONTROL SANITARIO EN APIARIOS

Tipo de Caso: Denuncia Vigilancia Otros
 Muestreo Inspección Sanitaria

Fecha: ____/____/____ Objetivo de la Visita:

Datos del Apicultor

Nombre: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____ Total de Apiarios: _____

Datos del Apiario

Departamento: _____ Municipio: _____

Comarca: _____ Finca: _____

No. De Colmenas: 3C _____ 2C _____ 1C _____ Núcleos:
_____ Otros _____

Total colmenas _____ Rendimiento de colmena por ciclo: _____ kg.

Tipo de Apiario: Estacionario Trashumante

Coordenadas: Longitud: _____ Latitud: _____

Condiciones Generales

Relación Sol / Sombra Adecuada Exceso de Sol Exceso de Sombra

Maleza en el Apiario Controlada Abundante

Basura en el Apiario Controlada Abundante

Estado de las Cajas (fondos, tapaderas) Aceptable Deterioradas

Estado de los Marcos Aceptables Deteriorados

Aceptables Oscuros Deteriorados Viejos

Tabla. 8 Porcentajes de infestación por Departamento y Municipio a nivel Nacional.

Departamento	Municipio	Comunidad o comarca	# abejas	# varroa	% Infestación	Intensidad Infestación
Boaco	Boaco	Boaco	177	1	0.56	baja
Boaco	Boaco	Boaco	208	6	2.88	baja
Boaco	Boaco	Boaco	300	2	0.67	baja
Boaco	Boaco	Boaco	238	9	3.78	baja
Boaco	Boaco	Boaco	138	7	5.07	media
					2.59	
Boaco	Teustepe	Teustepe	231	4	1.73	baja
Boaco	Teustepe	Teustepe	188	0	0.00	baja
Boaco	Teustepe	Teustepe	212	12	5.66	media
Boaco	Teustepe	Teustepe	213	6	2.82	baja
					2.55	
Boaco	santa lucia	santa lucia	195	15	7.69	media
Boaco	santa lucia	santa lucia	160	12	7.50	media
Boaco	santa lucia	santa lucia	231	5	2.16	baja
					5.79	
Carazo	Santa Teresa	chacocente	206	7	3.40	baja
					3.40	
Chinandega	Somotillo	Somotillo	203	2	0.99	baja
Chinandega	Somotillo	Somotillo	258	7	2.71	baja
Chinandega	Somotillo	Somotillo	202	7	3.47	baja
					2.39	
Chinandega	Villanueva	Villanueva	260	6	2.31	baja
Chinandega	Villanueva	Villanueva	189	1	0.53	baja
Chinandega	Villanueva	Villanueva	244	7	2.87	baja
Chinandega	Villanueva	Villanueva	236	9	3.81	baja
					2.39	
Esteli	Esteli	Esteli	336	7	2.08	baja
Esteli	Esteli	Esteli	259	6	2.32	baja
Esteli	Esteli	Esteli	200	12	6.00	media
Esteli	Esteli	Esteli	243	11	4.53	baja
					3.73	
Granada	Malacatoya	Malacatoya	305	10	3.28	baja
					3.28	
León	El Jicaral	Zaesales	188	0	0.00	baja
León	El Jicaral	Zaesales	245	7	2.86	baja
León	El Jicaral	Zaesales	245	6	2.45	baja

León	El Jicaral	Zaesales	144	9	6.25	media
					2.89	
León	El Sauce	El Sauce	176	9	5.11	baja
León	El Sauce	El Sauce	258	2	0.78	baja
León	El Sauce	El Sauce	314	6	1.91	baja
					2.60	
León	Lareinaga	Lareinaga	285	42	14.74	alta
León	Lareinaga	Lareinaga	161	11	6.83	media
León	Lareinaga	Lareinaga	215	40	18.60	alta
León	Lareinaga	Lareinaga	173	7	4.05	baja
León	Lareinaga	La reinaga	160	5	3.13	baja
León	Lareinaga	La reinaga	209	3	1.44	baja
					8.13	
León	León	León	525	3	0.57	baja
					0.57	
León	Malpaisillo	Malpaisillo	156	0	0.00	baja
León	Malpaisillo	Malpaisillo	307	3	0.98	baja
					0.49	
Madriz	Somoto	Somoto	149	8	5.37	media
Madriz	Somoto	Somoto	151	4	2.65	baja
Madriz	Somoto	Somoto	222	0	0.00	baja
					2.67	
Madriz	San jua Rio COCO	San jua Rio COCO	339	23	6.78	media
					6.78	
Managua	Mateare	Mateare	239	3	1.26	baja
Managua	Mateare	Mateare	283	2	0.71	baja
Managua	Mateare	Mateare	238	2	0.84	baja
Managua	Mateare	Mateare	224	5	2.23	baja
Managua	Mateare	Mateare	231	1	0.43	baja
Managua	Mateare	Mateare	312	8	2.56	baja
Managua	Mateare	Mateare	203	0	0.00	baja
Managua	Mateare	Mateare	225	20	8.89	media
					2.12	
Managua	Tiuanatepe	Tiuanatepe	207	3	1.45	baja
Managua	Ticuanatepe	Ticuanatepe	267	1	0.37	baja
					0.91	
Managua	Managua	Managua	272	2	0.74	baja
					0.74	
Managua	San Fco Libre	San Fco Libre	327	5	1.53	baja

Managua	San Fco Libre	San Fco Libre	249	4	1.61	baja
Managua	San Fco Libre	San Fco Libre	264	2	0.76	baja
					1.30	
Masaya	Nindiri	Niindiri	388	10	2.58	baja
					2.58	
Matagalpa	Muy Muy	Muy Muy	197	6	3.05	baja
Matagalpa	Muy Muy	Muy Muy	218	11	5.05	baja
Matagalpa	Muy Muy	Muy Muy	217	5	2.30	baja
					3.47	
Matagalpa	La Dalia	La Dalia	261	31	11.88	alta
					11.88	
Matagalpa	Matiguas	Matiguas	286	14	4.90	baja
Matagalpa	Matiguas	Matiguas	368	41	11.14	alta
Matagalpa	Matiguas	Matiguas	259	25	9.65	media
					8.56	
Nueva Segovia	Jalapa	Jalapa	308	22	7.14	media
Nueva Segovia	Jalapa	Jalapa	307	22	7.17	media
Nueva Segovia	Jalapa	Jalapa	230	26	11.30	alta
Nueva Segovia	Jalapa	Jalapa	382	31	8.12	media
					8.43	
RAACS	El Rama	El Rama	279	5	1.79	baja
					1.79	
RAACS	Nueva Guinea	Nueva guinea	215	12	5.58	media
RAACS	Nueva Guinea	Nueva guinea	300	10	3.33	baja
					4.46	
Rivas	Moyogalpa	Moyogalpa	292	1	0.34	baja
					0.34	
Rivas	Altagracia	Altagracia	207	6	2.90	baja
Rivas	Altagracia	Altagracia	210	11	5.24	media
					4.07	
Rivas	san juan del sur	san juan del sur	220	4	1.82	baja
Rivas	san juan del sur	san juan del sur	286	5	1.75	baja
					1.78	

Tabla. 9 Intensidad de Infestación por Departamentos

Departamento	Baja (%)	Media (%)	Alta (%)
Boaco	66	33	
Carazo	100		
Chinandega	100		
Estelí	75	25	
Granada	100		
León	87.5	12.5	
Madriz	50	50	
Managua	93	7	
Masaya	100		
Matagalpa	57	14	29
Nueva Segovia		75	25
RACCS	66	33	
Rivas	80	20	

Fotos del estudio