

638.153  
M67

MANUAL PRACTICO DE PATOLOGIA APICOLA

POR : GILBERTO MORALES SOTO

Profesor Asociado-Departamento de Biología  
Universidad Nacional de Colombia  
Seccional Medellín. A.A. 3840

1992

MANUAL PRACTICO DE PATOLOGIA APICOLA

POR : GILBERTO MORALES SOTO

Profesor Asociado-Departamento de Biología  
Universidad Nacional de Colombia  
Seccional Medellín. A.A. 3840

UNIVERSIDAD NACIONAL  
BIBLIOTECA CENTRAL  
1992

UNAL-Medellín



6 4000 00081374 4

638.153  
M67

CONTENIDO

	Pag.
I. RECOLECCION DE MUESTRAS	1.
1. MUESTRAS DE CRIA	1.
1.1. Método 1	1.
1.2. Método 2	1.
1.3. Método 3	1.
1.4. Como coleccionar larvas y pupas en gran cantidad	2.
2. MUESTRAS DE ADULTOS	2.
2.1. Nosema	2.
2.2. Amibas	2.
2.3. Virus	3.
2.4. Acaro de las tráqueas	3.
2.5. Varroatosis	3.
2.5.1. Varroatosis Método 1	3.
2.5.2. Varroatosis Método 2	3.
2.5.3. Varroatosis Método 3	5.
II. PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE LAS MUESTRAS.	5.
1. PARA ENFERMEDADES BACTERIANAS	5.
1.1. Montaje de muestras	5.
1.2. Medios de cultivo	5.
1.2.1. Medio para cultivo de <u>B. larvae</u> (Loque Americana).	5.
1.2.2. Medio para cultivo de <u>Melissococcus pluton</u> (Loque Europea).	13.
1.2.3. Medio para detectar <u>Pseudomonas apiseptica</u> (Bacteria que produce Septicemia).	13.
1.3. Pruebas diagnósticas empleadas para detectar <u>B. larvae</u> o bacteria que produce Loque Americana.	13.
1.3.1. Prueba de la leche.	13.

UNIVERSIDAD NACIONAL  
BIBLIOTECA CENTRAL

Donacion Autor VI-4-92 \$1500

1.3.2.	Prueba de la reducción de nitratos	14.
1.3.3.	Producción de catalasa	14.
1.4.	Detección de <u>B. larvae</u> en productos de la colmena.	14.
1.4.1.	Detección de <u>B. larvae</u> en miel	14.
1.4.2.	Detección de <u>B. larvae</u> en polen	15.
1.4.3.	Detección de <u>B. larvae</u> en cera	15.
1.5.	Como determinar si un organismo es gram positivo o gram negativo.	15.
1.6.	Montajes temporales y permanentes de bacterias.	15.
2.	PARA ENFERMEDADES FUNGOSAS	16.
2.1.	Método del montaje húmedo.	16.
2.2.	Cultivo de <u>Ascosphaera apis</u> .	16.
2.2.2.	Cultivo de <u>Aspergillus flavus</u> .	19.
3.	PARA ENFERMEDADES CAUSADAS POR PROTOZOARIOS.	19.
3.1.	Preparación de muestras para detección de <u>Nosema apis</u> .	19.
3.1.1.	Método 1.	19.
3.1.2.	Método 2.	19.
3.2.	Como hacer conteo de esporas para determinar la intensidad de la infección.	22.
3.2.1.	Método 1.	22.
3.2.2.	Método 2.	22.
3.2.3.	Cálculo del número de esporas por abeja.	22.
3.2.4.	Como calcular la intensidad de la infección.	24.
3.3.	Detección de esporas de <u>Nosema apis</u> en heces de abejas enfermas.	24.
3.4.	Examen de reinas sospechosas de estar afectadas por <u>Nosema</u> .	24.
4.	PREPARACION DE MUESTRAS PARA ANALISIS DE AMIBAS.	24.
5.	PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA DETERMINAR VIROSIS.	25.
6.	PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA DETERMINAR ACAROS DE LAS TRAQUEAS.	25.
6.1.	Método 1	27.
6.2.	Método 2	27.

UNIVERSIDAD NACIONAL  
BIBLIOTECA CENTRAL

6.3.	Método de tinción simple para detección de Acarapis.	29.
7.	PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA DETECTAR VARROA Y OTROS ACAROS EXTERNOS.	31.
8.	Algunas técnicas de laboratorio útiles para la preparación de especímenes en cuanto se refiere a métodos de tinción, aclareo y preparación de colorantes.	31.
8.1.	ALGUNAS TECNICAS PARA PREPARAR COLORANTES.	31.
8.1.1.	Como preparar el colorante fucsina carbólica.	31.
8.1.2.	Fórmula de Hucker para cristal violeta( para teñir) bacterias.	33.
8.1.3.	Fórmula de Loeffler para azul metileno( para teñir bacterias).	33.
9.	ALGUNOS METODOS DE TINCION	33.
9.1.	Método de Hucker para tinción positiva.	33.
9.2.	Método de Ziehl-Nielsen para tinción negativa rápida.	34.
9.3.	Método de Giemsa para colorear rickettsias.	34.
10.	SOLUCIONES PARA RELAJAR, PRESERVAR, ACLARAR Y MONTAR ESPECIMENES.	35.
10.1.	Solución para RELAJAR especímenes o partes.	35.
10.2.	Soluciones para PRESERVAR insectos y otros artrópodos.	35.
10.3.	Método para CLARIFICAR.	35.
10.4.	Método para CLARIFICAR ácaros.	36.
11.	Medio permanente para MONTAJE de placas.	36.
	BIBLIOGRAFIA.	37.
	AGRADECIMIENTOS.	39.

LISTA DE FIGURAS.

	Pag.
FIGURA 1. Cría de Abeja melífera atacada por Varroa.	4.
FIGURA 2. Adultos de <u>Varroa</u> sobre el cuerpo de una abeja obrera.	4.
FIGURA 3. Empleo de Cartulina con un pegante para detección de <u>Varroa</u> .	6.
FIGURA 4. Método de agitación para detectar Varroa en muestras de adultos de <u>Apis mellifera</u> .	7.
FIGURA 5. Forma de preparar un montaje de Bacterias.	8.
FIGURA 6. Enfermedades Bacterianas de la cría y de los adultos de <u>Apis mellifera</u> .	9.
FIGURA 7. Loque Americana.	10.
FIGURA 8. Loque Europea.	11.
FIGURA 9. Montaje en húmedo para muestras de hongos.	17.
FIGURA 10. Enfermedad de Tiza o de Cal, producida por el hongo <u>Ascosphaera apis</u> .	18.
FIGURA 11. Cría de Piedra o Cría Petrea, causada por el hongo <u>Aspergillus flavus</u> .	20.
FIGURA 12. <u>Nosema apis</u> .	21.
FIGURA 13. Conteo de esporas de <u>N. apis</u> .	23.
FIGURA 14. Amibiasis.	26.
FIGURA 15. Acaro de las tráqueas.	28.
FIGURA 16. Acaro de las tráqueas, método de tinción simple.	30.
FIGURA 17. Detección de Varroa empleando tiras de Apistan	32.

MANUAL PRACTICO DE PATOLOGIA APICOLA

Recolección, procesamiento y análisis de muestras para el correcto diagnóstico de las principales enfermedades de la abeja melífera.

Por: GILBERTO MORALES SOTO.-Profesor Asociado-Departamento de Biología-Universidad Nacional de Colombia-Seccional Medellín. A.A. 3840.

I. RECOLECCION DE MUESTRAS

1. MUESTRAS DE CRIA

Existen varios métodos para recolectar muestras de abejas enfermas y enviarlas al laboratorio; algunos de ellos se describen a continuación.

1.1. Se corta un pedazo de panal de 4" x 4" con el material sospechoso y se envuelve en papel periódico, cartón o papel encerado, o se introduce en un frasco limpio y seco. Se debe evitar cortar pedazos de panal con miel, pues esta estropea la muestra.

Se rotula la muestra anotando datos suficientes que permitan conocer su procedencia y dar una orientación sobre el problema; para ello, anote datos sobre:

Fecha de recolección de la muestra: \_\_\_\_\_  
Nombre del apicultor y/o colector: \_\_\_\_\_

Nombre de la finca: \_\_\_\_\_  
Nombre de la vereda: \_\_\_\_\_  
Nombre del municipio: \_\_\_\_\_  
Nombre del apiario: \_\_\_\_\_

Observaciones\*: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\*En este punto de observaciones se debe anotar cualquier característica diagnóstica o elemento anormal observado por quien tomó la muestra (color de la cría, posición de esta, olor, aspecto de celdas, opérculos, etc.).

En caso de tomar muestras de diferentes colonias, sepárelas y rotule cada frasco o recipiente con un número, para poder identificar después su procedencia.

1.2. Se toma un palillo de dientes o material similar y se introduce en la celda con cría enferma, se restrega bien sobre la cría enferma y se coloca sobre papel encerado o papel parafinado. Se envuelve bien la muestra, incluyendo el palillo, se rotula como se anotó en el método anterior y se envía al laboratorio para su estudio.

1.3. Cría enferma que se encuentra sobre las piqueras o en el suelo cerca a las colmenas (por ej.: cría atacado por hongos), se guarda en papel encerado o en cajas de cartón pequeñas (ej.: cajas de fósforos vacías) y se envía inmediatamente al laboratorio. Se rotula la muestra como se indicó antes.

1.4. Para coleccionar larvas y pupas en gran cantidad se procede así:

- Se saca el panal con la cría sospechosa que se desea examinar.
- Se coloca este panal horizontalmente sobre una bandeja cubierta con una toalla y se coloca en una incubadora a 34°C.
- En pocas horas las larvas de 3-5 días se habrán arrastrado hasta la bandeja.
- Las pupas se obtienen coleccionando las larvas de 5 días y pasándolas a platos de petri hasta que ocurra el empupamiento.

Nota: En caso de que las muestras no puedan ser transportadas al laboratorio inmediatamente, deben ser refrigeradas, pero examinadas en el menor tiempo posible desde su recolección.

## 2. MUESTRAS DE ADULTOS

### 2.1. Nosema.

Debido a que esta enfermedad se manifiesta mayormente en abejas viejas, se deben coleccionar estas en las cámaras de miel o de los marcos 3 y 7 de la cámara de cría; también es posible hacerlo de las entretapas o de las piqueras.

Se toma una muestra de 25-35 abejas adultas, las que se introducen en un frasco con alcohol etílico al 70%; si la muestra no se va a procesar rápidamente, se le agregan al frasco con alcohol unas 2-3 gotas de glicerina. La muestra se debe rotular como se indicó en la sección 1. En caso de existir varias colonias sospechosas, se toma una muestra diferente para cada una de ellas.

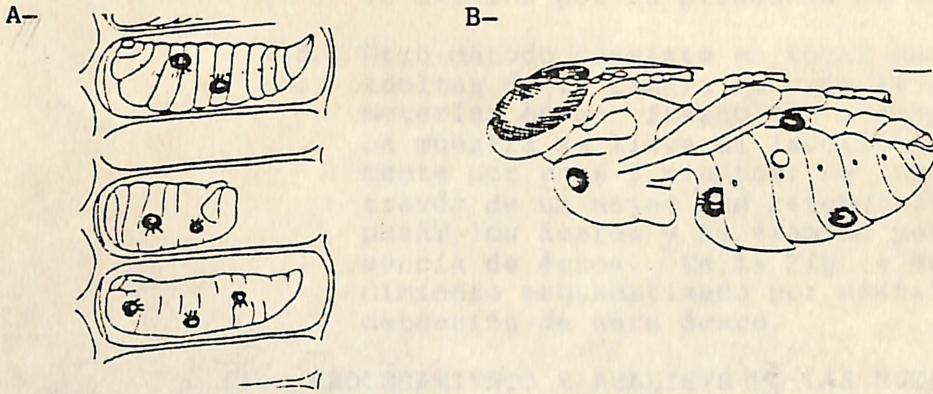
Los excrementos que se observan a veces, sobre paredes y pisos de las colmenas o sobre malezas cercanas a las colonias y que se sospecha pueden tener enfermedad, pueden ser raspados sobre un recipiente seco y limpio, o envueltos en papel, para ser llevadas lo más pronto posible al laboratorio para su análisis.

### 2.2. Amibas.

Esta es una enfermedad que está asociada generalmente con nosema, diarrea y otras. La misma muestra que se tome para nosema puede ser también utilizada para análisis de amibas; por lo que se procede en forma similar a como se mencionó en el caso anterior.



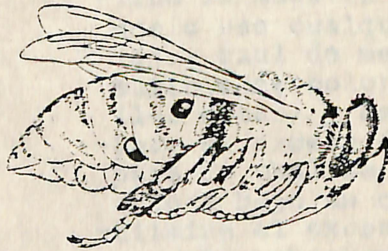
FIGURA 1. CRIA DE ABEJA MELIFERA ATACADA POR VARROA.



A: Larvas y prepupa con adultos del ácaro.

B: Pupa con adultos de Varroa sobre su cuerpo (Adaptado de Weiss, 1984).

FIGURA 2. ADULTOS DE VARROA SOBRE EL CUERPO DE UNA ABEJA OBRERA (TOMADO DE WEISS, 1984).



Se coloca un anejo sobre la cartulina con el pegante para evitar que las abejas se adhieran a él y se da una buena ahumada a la colmena, usando humo de tabaco de alto contenido de nicotina. Se tapa la piquera con pasto y se deja así entre 30 y 60 minutos, luego de lo cual se retira la cartulina y se examina por la presencia de ácaros (ver Fig.3).

2.5.3. Otro método consiste en tomar una muestra de abejas adultas de la cámara de cría (250-300 abejas) y meterlas en un frasco con alcohol etílico al 70%. La muestra se lleva al laboratorio y se agita fuertemente por unos 5 minutos; se vacía la muestra a través de un anejo que retenga las abejas y deje pasar los ácaros y se examina para detectar la presencia de éstos. En la Fig. 4 se resume el procedimiento esquematizado por mantilla (1991) para detección de este ácaro.

II. PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE LAS MUESTRAS

1. PARA ENFERMEDADES BACTERIANAS.

- 1.1.-Colocar sobre un porta-objetos una gota de agua destilada.
  - Con un palillo de dientes humedecido con el agua destilada o con un aza esterilizada si la muestra se va a tomar de un cultivo, haga un raspado de la muestra sospechosa y colóquelo sobre la gota de agua en el porta-objetos. La muestra debe quedar diluída y sólo estar ligeramente turbia.
  - Fije la muestra calentándola ligeramente con un mechero o con una lámpara caliente, cuidando que no hierva.
  - Tiña la muestra con carbol-fucsina por 10 segundos o use cualquier otro colorante de esporas (ej.: azul de metileno, safranina, etc.). Coloque suficiente colorante para cubrir toda la muestra (1-2 gotas) y deje actuar por 10-15 segundos.
  - Lave el exceso de colorante con agua corriente, para lo cual se invierte el porta-objetos y se coloca bajo un chorro suave de agua corriente.
  - Elimine el exceso de agua de la placa, coloque un cubre-objetos y agregue una capa fina de aceite de inmersión.
  - Observe con el objetivo de inmersión (la Fig. 5 esquematiza el procedimiento general).

Las distintas bacterias que atacan a la abeja melífera se observan como se muestra en las figuras anexas (Figs. 6, 7 y 8).

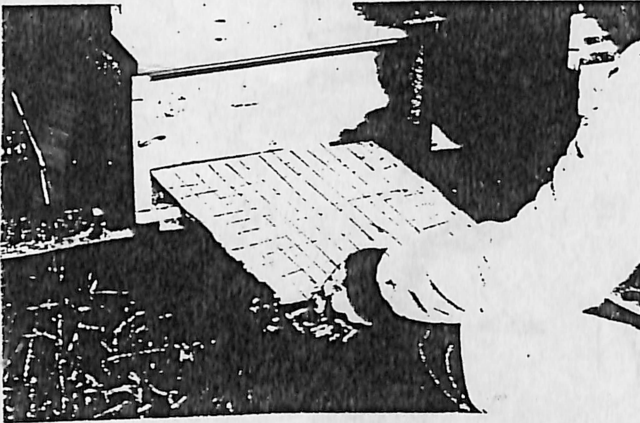
1.2. En caso que se requiera cultivar las bacterias se procede como sigue.

1.2.1. Medio para cultivo de B. larvae (Loque Americana).

a) Medio de Shimanuki y Knox/1991.

- Se prepara una suspensión de esporas, mezclando material muerto en 9 ml de agua esterilizada y colocándola en vials.

FIGURA 3. EMPLEO DE CARTULINA CON UN PEGANTE PARA DETECCION DE VARROA.



A: Cartulina con Tanglefoot y Anjeo.



B: Adulto de Varroa sobre los residuos colectados del fondo de la Colmena (Adaptado de Barbattini y Chiesa, 1987).

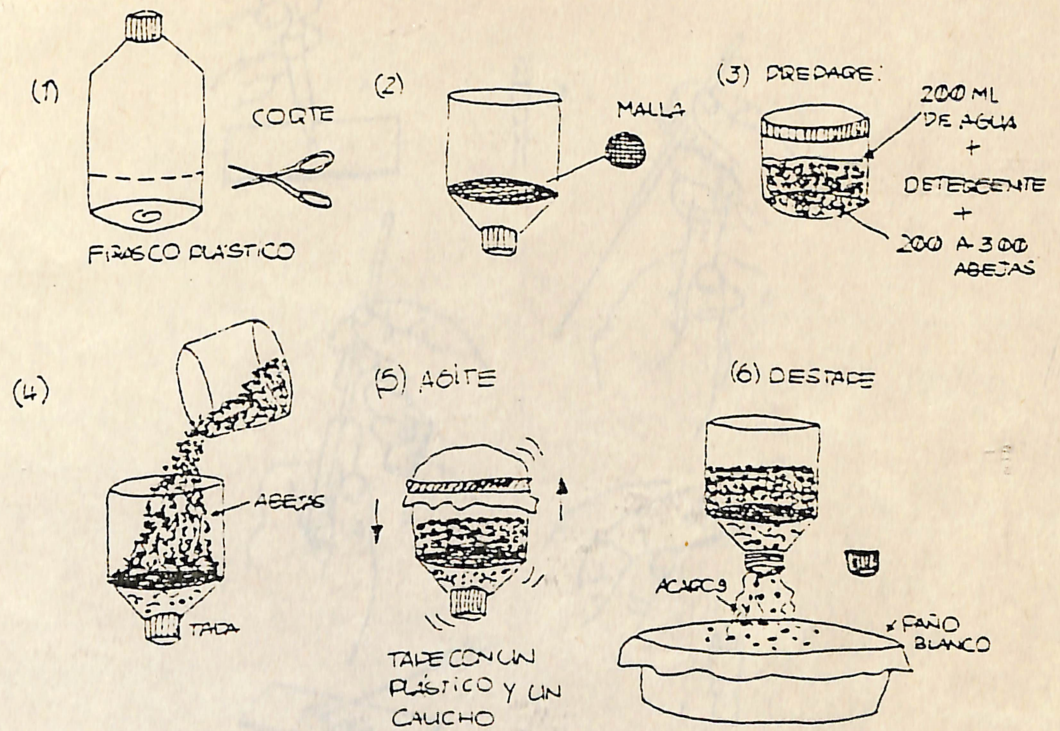
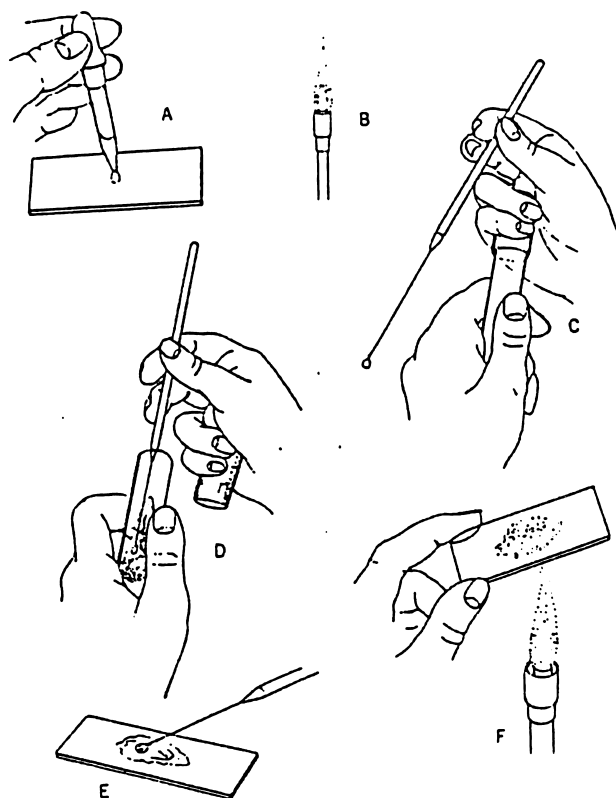


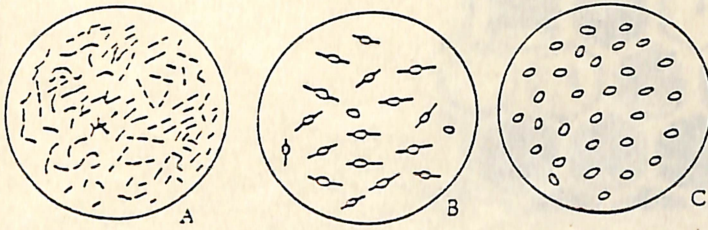
FIGURA 4. Metodo de Agitación para detectar VARROA en muestras de adultos de Apis mellifera (Tomado de Mantilla, 1991)



**FIGURA 5. FORMA DE PREPARAR UN MONTAJE DE BACTERIAS.**

- A :** Colocar una gota de agua destilada sobre el centro de un Porta-Objetos.  
**B :** Esterilizar el aza y dejar enfriar.  
**C y D :** Obtener una alicuota del medio de Cultivo.  
**E :** Frotar la muestra en la gota de agua destilada en círculos hasta abarcar una área de unos 2 cms de diámetro.  
**F :** Fijar la muestra calentandola lentamente bajo un mechero( tomado de Swatek, 1967).

Fig. 6A. Bacillus larvae.



- A.- Forma vegetativa.
- B.- Forma de esporas.
- C.- Esporas de B. larvae.

Fig. 6C. Pseudomonas apiseptica

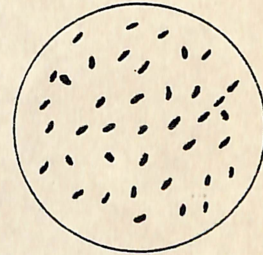
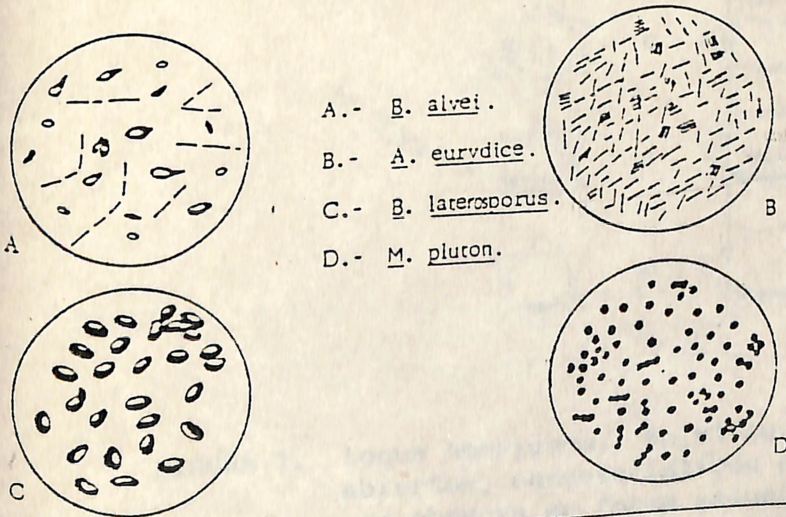


Fig. 6B. Loque Europea.



- A.- B. alvei.
- B.- A. eurvdice.
- C.- B. laterosporus.
- D.- M. pluton.

FIGURA 6 . ENFERMEDADES BACTERIANAS DE LA CRIA Y DE LOS ADULTOS DE APIS MELLIFERA

- 6 A: Esporas de Bacillus Larvae o loque Americana.
- 6 B: Bacterias causantes y asociadas con loque Europea.
- 6 C: Esporas de Pseudomonas apiseptica o bacteria que produce septicemia en abejas adultas ( tomado de Sozaya y otros, 1986.).

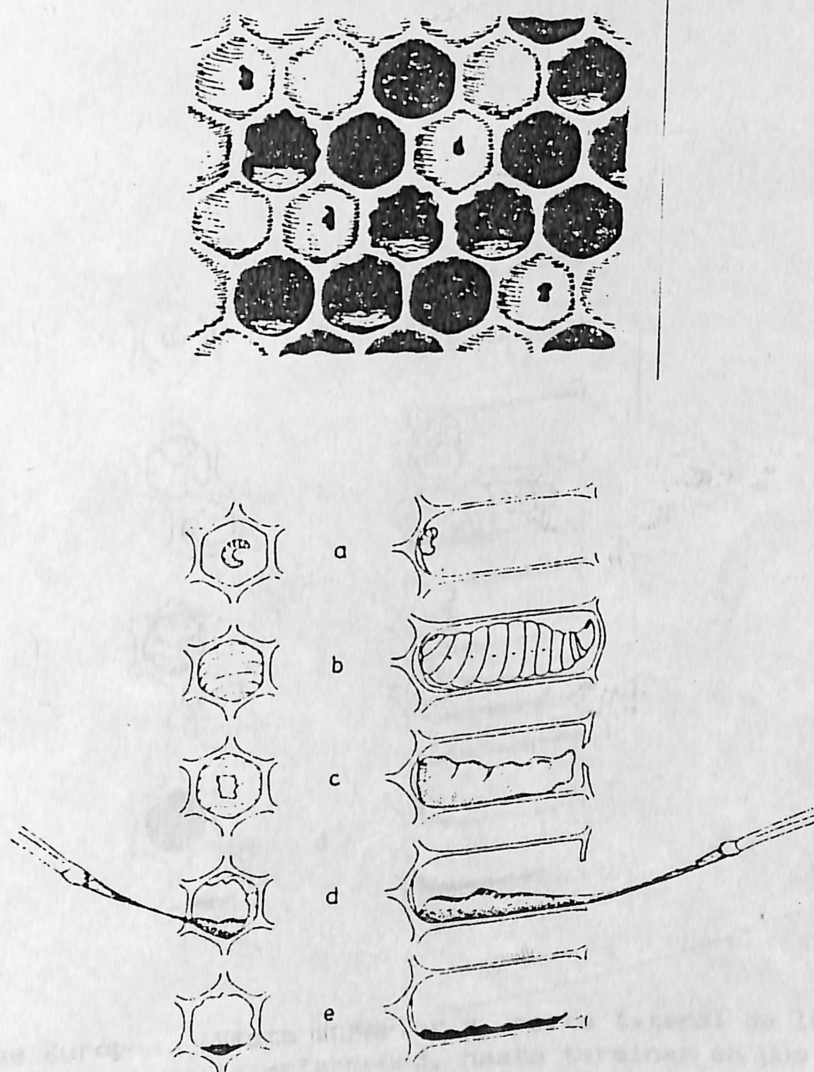


FIGURA 7. Loque Americana. En el cuadro superior se observan operculos semi-abiertos, característicos de esta enfermedad. En el cuadro inferior se observa en forma secuencial el avance de la enfermedad, en las distintas etapas de desarrollo de la larva, tal como se ve en vista superior y en corte lateral ( d: Corresponde a la prueba de elasticidad ) ( Tomado de Weiss, 1984).

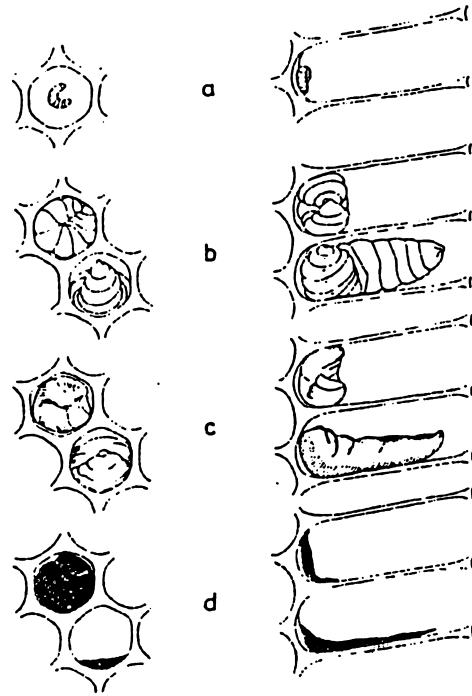


FIGURA 8. Loque Europea. Vista superior y corte lateral de la cría mostrando los síntomas de la enfermedad, hasta terminar en una costra en el fondo de la Celda. (Tomado de Weiss, 1984).



Para remover el material muerto se pueden usar copitos de algodón.

- Se calienta la suspensión a 80°C por 10 minutos (para matar las bacterias que no esporulan).
- Se revuelve la suspensión y se toma una porción de 1 o 2 ml, la que se coloca sobre el medio de crecimiento conocido como BHIT (Difco brain heart infusión, fortified with 0.1 mg. thiamine hydrochloride/ltr. de medio).
- Se incuba por 72 horas a 34°C.  
Las colonias resultantes se ven individuales (1-2mm.) y son opacas; sin embargo, si se inocularon en el medio muchas esporas, se verá una capa sólida de crecimiento que cubrirá el plato.

b) Medio de Bailey y Lee/1962.

- Se obtiene la muestra de los panales afectados.
- Se emplea como medio, extracto de levadura al 1% (P/V).
- El medio se prepara así:  
Medio base más 0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
Medio base más 0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1% glucosa (P/V).  
Medio base más 0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1% glucosa autoclavada separadamente.
- Medio base más 0.01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
Medio base más 0.01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1% glucosa (P/V)  
Medio base más 0.01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1% (P/V) glucosa autoclavada separadamente.
- Se ajusta el medio a pH 6.6 con KOH.
- Se esteriliza en autoclave en vials cerrados a 116°C por 20 minutos.
- El medio inoculado se incuba a 34°C.

c) Medio de Hornitzky y Karlovskis/1989.

- Se toma una muestra de 30 abejas del área de cría.
- Se homogeniza la muestra en 20 ml de solución salina estéril de fosfato (PBS) a pH de 7.2 por 30 segundos.
- Se filtra el homogenizado a través de tela de algodón y se centrifuga a 3.000 gn por 1 hora.
- Se vacía el sobrenadante y se vuelve a suspender el residuo en 2 ml de PBS.
- Se toma una alícuota de 0.5 ml de la muestra y se coloca en una botella de vidrio de 5 ml.
- Se calienta a 80°C por 15 minutos.
- Se vacía la muestra en agar de sangre de oveja, el que posee agar de sangre base No. 2 (Oxoid Ltd, England), suplementado con 7% de sangre citrada de ovino, agar bacteriológico No. 1 (Oxoid Ltd), hasta obtener una concentración final del 7%.
- Se incuban los platos a 35°C por 7 días en una atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub> en aire.  
Las colonias resultantes se ven grises y tienen + 3 mm de diámetro luego de 48 horas, son planas e irregulares en los bordes.

1.2.2. Medio para cultivo de Melissococcus pluton (Loque Europea).

-Se mezclan:

- 1 gramo de extracto de levadura (Difco).
- 1 gramo de glucosa
- 1.35 gramos de fosfato de potasio dehidrogenado (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).
- 1 gramo de almidón soluble.

2 gramos de agar

Agua destilada hasta completar 100 ml.

( Si se agrega 0.1 gr/100ml de cisteina es mejor)

- Se ajusta el pH de esta mezcla a 6.6 con KOH<sub>2</sub>
- Se lleva la mezcla al autoclave a 10 Lb/pulg<sup>2</sup> (116°C) por 20 minutos.

1.2.3. Medio para detectar Pseudomonas apiseptica (Bacteria que produce Septicemia):

-Remover un ala del tórax

-Colocar una gota de agua destilada sobre un porta-objetos.

-Restregar la base del ala en la gota y observar.

En caso que se requiera cultivar el microorganismo, se procede así:

-Se remueve un ala del tórax

-Se coloca la base del ala en un medio conocido como Pseudomonas agar F.

-Se cultiva a 37°C.

Las colonias resultantes producen pigmentos amarillo-verdosos que fluorescen bajo la luz ultravioleta.

Esta enfermedad puede además ser diagnosticada reproduciendo los síntomas en abejas sanas; para lograr esto se procede así:

-Se toman 20-30 abejas adultas sanas y se colocan en una jaula.

-Se prepara un extracto acuoso de la enfermedad, macerando el equivalente a una abeja sospechosa por cada ml de agua destilada.

-Se inoculan las abejas sanas a través del tórax (1ul/abeja) o se sumergen estas en el extracto.

Abejas con Septicemia mueren en 24 horas, huelen a podrido y se despedazan al manipularlas.

Nota: Al mismo tiempo que se realiza este procedimiento, se monta un control con extracto de abejas sanas.

1.3. Existen varias pruebas diagnósticas que pueden ser empleadas para detectar B. larvae o bacteria que produce Loque Americana. Estas se describen a continuación.

1.3.1. Prueba de la leche.

Esta prueba se basa en el hecho de que un nivel alto de enzimas proteolíticas es producido por B. larvae al esporular.

- Se coloca una muestra (ej.: escama, raspado etc.) del material sospechoso en un tubo que contiene 3-4 ml de leche descremada en polvo disuelta en agua.
- Se incuba esta mezcla a 37°C.
- Si la suspensión se aclara en 10-20 minutos, es debido a la presencia de B. Larvae.

Nota: Esta prueba no siempre da, por lo que es necesario ser cuidadosos en su uso.

#### 1.3.2. Prueba de la reducción de nitratos.

Se basa en el hecho de que B. larvae reduce el nitrato a nitrito; para ello se puede hacer la prueba en un medio que contenga nitrato (ej. el BHIT contiene nitrato de potasio), empleando 1-2 mg/ltr. del medio.

- Se coloca la muestra en el medio de crecimiento.
- Luego de que ocurra el crecimiento, se agrega una gota de ácido sulfanílico  $\alpha$ -naftol.
- Si se produce un color rojo, indica que el nitrato ha sido reducido a nitrito.

#### 1.3.3. Producción de catalasa.

- Se coloca una gota de peróxido de hidrógeno al 3% en un cultivo de la bacteria que este creciendo activamente sobre un medio sólido.
- La mayoría de las bacterias aeróbicas descomponen el peróxido en agua y oxígeno, produciendo una mezcla opaca y burbujeante. B. larvae es casi siempre negativa para esta reacción.

1.4. La bacteria que produce la Loque Americana puede también ser detectada en los productos de la colmena como miel, polen y cera. El procedimiento en cada caso es como sigue.

#### 1.4.1. Detección de B. larvae en miel.

##### a) Método de Sturtevant.

- Se diluye la muestra de miel en agua en proporción 1:9.
- Se centrifuga la mezcla hasta concentrar las esporas en el sedimento.
- Se examina el sedimento al microscopio.

##### b) Método de Shimanuki y Knox.

- Se calienta la muestra de miel a 45°C.
- Se colocan 25 ml de miel en un beaker de 50 ml y se diluye en 10 ml de agua esterilizada.
- La mezcla diluída se pasa a un tubo de diálisis de 44 mm.
- Se cierra el extremo abierto del tubo una vez este se llene.
- Se sumerge el tubo en agua corriente por 18 horas o en baño de agua, cambiando esta 3-4 veces en las 18 horas.

- Luego de la diálisis, se centrifuga a 2.000 g por 20 minutos.
- Se remueve cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta y se deja aproximadamente 1 ml de residuo.
- El residuo se suspende en 9 ml de agua en un vial tapado y se calienta a 80°C por 10 minutos.
- Se toman 0.5 ml de suspensión y se coloca sobre un plato de petri con agar BHIT.
- Se incuba a 37°C por 72 horas.
- Se examina por colonias de B. larvae.

#### 1.4.2. Detección de B. larvae en polen.

- Se toma una muestra de granos de polen colectados por las abejas.
- Se pasan estos granos a través de coladores de distinto tamaño.
- Si no se detectan escamas de B. larvae para ser examinadas, entonces se hace una suspensión acuosa de polen.
- Se pasa esta solución acuosa a través de papel filtro No. 2.
- Se centrifuga el filtrado.
- Se cultiva el residuo en igual forma a como se indicó en el método del numeral anterior.

#### 1.4.3. Detección de B. larvae en cera.

- Se derrite la muestra de cera al baño María, en agua.
- Se deja enfriar la cera sobrenadante y se retira cuidadosamente la torta formada.
- Se centrifuga el agua a 2.000 g por 20 minutos.
- Se examina el sedimento al microscopio.

#### 1.5. Si se desea determinar si un organismo es gram positivo o gram negativo, se procede así:

- Se colecta la muestra y se fija como se anotó en el procedimiento general para detección de bacterias, numeral 1.1.
- Se tiñe con cristal violeta.
- Se sumerge el montaje en solución de yodo, se decolora con alcohol etílico y se vuelve a teñir con safranina.
- Si el organismo tiñe azul es gram positivo.
- Si el organismo tiñe rojo es gram negativo.

#### 1.6. Montajes temporales y permanentes de bacterias se hacen como sigue.

##### a) Montajes temporales.

Las placas se procesan como se ha indicado en el procedimiento general (numeral 1.1.). Estas placas teñidas y montadas en agua se les coloca el cubre-objetos y se sellan los bordes de este con petrolatum o barniz de uñas transparente o esmerma. Las placas así montadas sirven por unos días.

b) Montajes permanentes.

Los porta-objetos con las muestras teñidas y secas se aclaran con xileno y luego se montan en una gota de bálsamo de Canadá. El exceso de bálsamo se retira o limpia con una toalla impregnada de xileno.

2. PARA ENFERMEDADES FUNGOSAS

2.1. Se emplea el montaje húmedo; para ello se procede así:

- Se macera parte de la muestra en agua.
- Se coloca parte de ese macerado en un porta-objetos.
- Se coloca un cubreobjetos evitando la formación de burbujas de aire.
- Normalmente no se requiere colorante.
- Se examina con los objetos secos del microscopio. (En la Fig. 9, se muestra el procedimiento general para este tipo de montaje).

Nota: Si se tiene un microscopio de contraste es mejor, sobre todo cuando se necesita usar el aceite de inmersión.

2.2. Cultivo de Ascosphaera apis.

a) Se pueden cultivar las esporas sobre el medio agar-dextrosa-papa, fortificado con 4 grs de extracto de levadura por cada litro de medio.

-Se incuba a 30°C.  
Los cultivos que se originan tienen olor a fruta o a durazno fermentado. Las esporas se ven como se muestra en la Fig. 10.

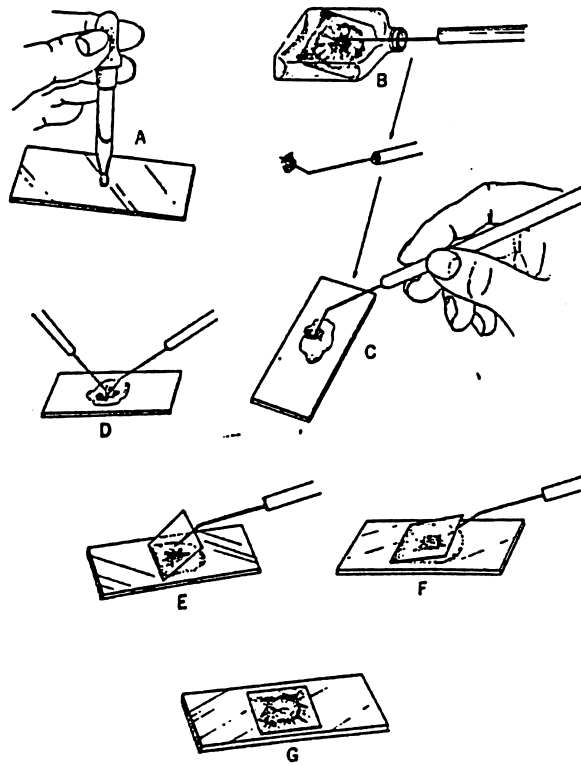
b) Otro medio para el cultivo de este hongo es el agar de malta.

- En este medio, no se producen hifas aéreas, con lo que se facilita la observación al microscopio.
- Muestras de A. apis pueden ser colocadas directamente en el medio de cultivo.
- Se incuba a 30°C.  
El micelio en crecimiento se observa en 24 horas.

c) Si las muestras son viejas se procede como sigue.

- Se colocan los aislados en agar acuoso (agar sin nutrientes).
- Se incuba a 30°C.
- El micelio resultante se transfiere a un medio nutritivo como los anotados antes (métodos a y b).
- Se incuba a 30°C.

Nota 1: Cuando se aísla sólo una raza, la positiva o la negativa, se produce una masa algodonosa que cubre el plato. Cuando se cultivan las razas positiva y negativa al mismo tiempo, se forman quistes en el cultivo.



**FIGURA 9. MONTAJE EN HUMEDO PARA MUESTRAS DE HONGOS.**

- A:** Se coloca una gota del medio en el centro de un porta-objetos.  
**B:** Se remueve una porción del cultivo del hongo con una aguja esterilizada.  
**C:** Se coloca la muestra del hongo sobre la gota del medio de cultivo.  
**D:** Con dos agujas se separan los micelios.  
**E:** Se coloca un cubre-objetos, dejándolo caer como se muestra en la figura.  
**F:** Se presiona suavemente en el centro del cubre-objetos hasta obtener una superficie plana.  
**G:** Se examina bajo microscopio. (Tomado de Swatek, 1967).

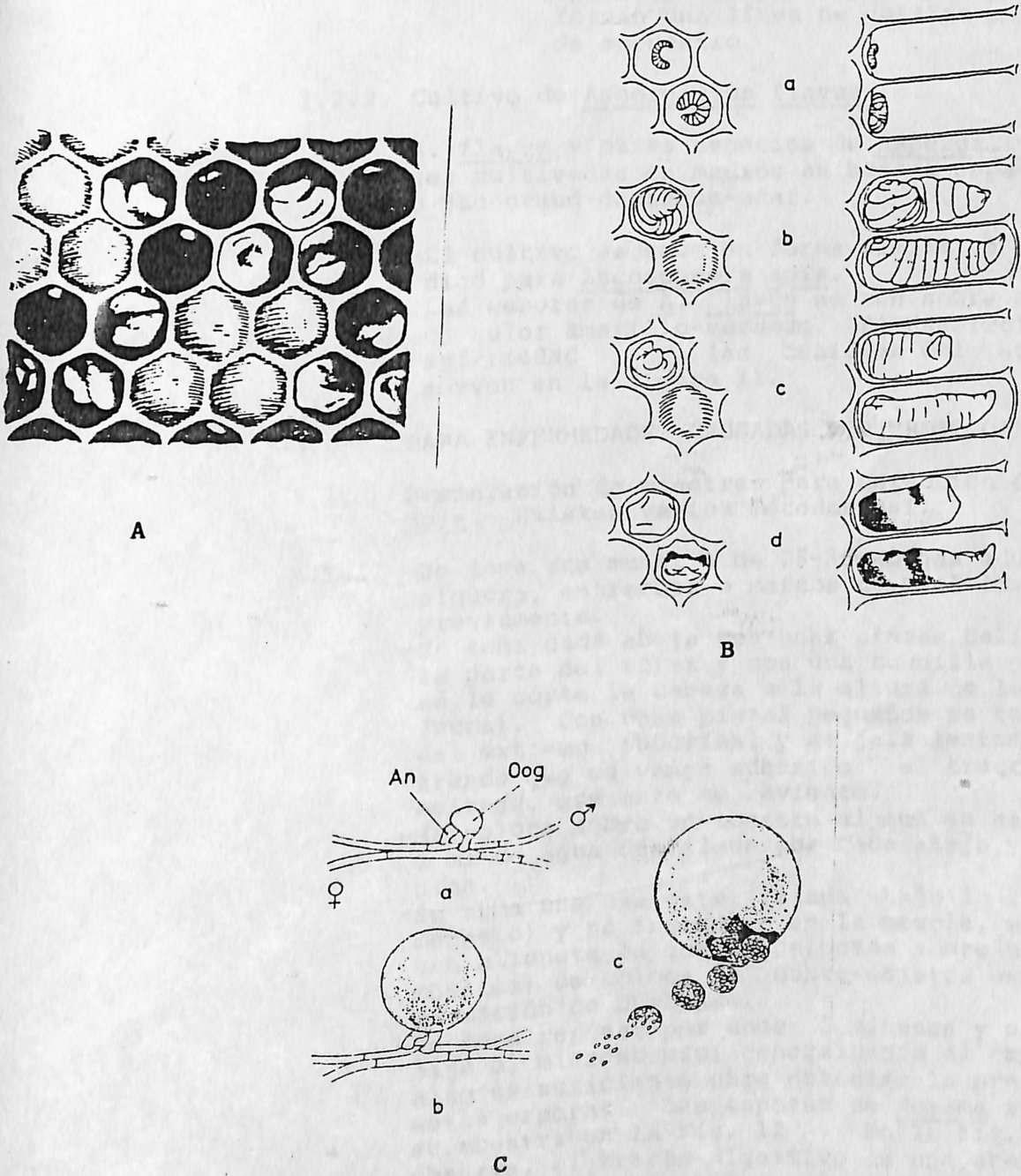


FIGURA 10. ENFERMEDAD DE TIZA O DE CAL, PRODUCIDA POR EL HONGO ASCOSPHERA APIS.

A: Momias en el fondo de las celdas.  
 B: Vistas superior y lateral de cría en estados consecutivos de desarrollo de la enfermedad.  
 C: Esporocitos del hongo, muy utiles para la correcta identificación de la enfermedad ( An= anteridio, Oog= Oogonio) ( Tomado de Weiss, 1984).

Nota 2: Para distinguir los talos positivo y negativo, se inoculan los aislados en lados opuestos del plato y estos talos diferentes forman una línea de quistes en los puntos de encuentro.

### 2.2.2. Cultivo de Aspergillus flavus

A. flavus y otras especies de Aspergillus pueden ser cultivadas en medios en base a papa-dextrosa o Sabouraud-dextrosa-agar.

-El cultivo se hace en forma similar a como se indicó para Ascosphaera apis.

Las esporas de A. flavus se ven sobre el medio de un color amarillo-verdoso. El desarrollo de esta enfermedad y las conidias del hongo se observan en la figura 11.

## 3. PARA ENFERMEDADES CAUSADAS POR PROTOZOARIOS.

### 3.1. Preparación de muestras para detección de Nosema apis. Existen varios métodos así.

- 3.1.1. -Se toma una muestra de 25-35 abejas adultas de la piquera, entretapa o marcos de miel como se anotó previamente.
- Se toma cada abeja con unas pinzas delicadas por la parte del tórax y con una cuchilla o bisturí se le corta la cabeza a la altura de la cervix (nuca). Con unas pinzas pequeñas se toma el aguijón del extremo abdominal y se jala lentamente, permitiendo que se venga adherido el tracto digestivo, evitando que este se reviente.
- Se coloca sobre un mortero al que se ha agregado 1 ml de agua destilada por cada abeja y se macera bien.
- Se toma una aza esterilizada (bajo la llama de un mechero) y se introduce en la mezcla, extrayendo una alicuota la que es colocada sobre un porta-objetos; se coloca un cubre-objetos evitando la formación de burbujas.
- Se deja reposar por unos 3 minutos y se examina bajo el microscopio; generalmente el objetivo seco alto es suficiente para detectar la presencia de estas esporas. Las esporas de Nosema se ven como se muestra en la Fig. 12 A. En la Fig. 12 B, se observa, el tracto digestivo de una abeja sana y de una enferma, que es un sintoma más que sirve para diagnosticar la enfermedad.
- 3.1.2. -Las abejas que se van a procesar (25-35), se toman y con unas microtijeras o cuchillas, se les retira la cabeza y el torax, dejando los abdomenes completos. Estos abdomenes se colocan en un recipiente limpio y seco.
- Los abdomenes se dejan en un refrigerador hasta que se sequen completamente (mientras más secos esten mejor; 2-3 días pueden ser suficientes).
- Se toman los abdomenes secos y se colocan en un mortero al que se le agrega 1 ml de agua destilada por cada abeja y se macera bien.



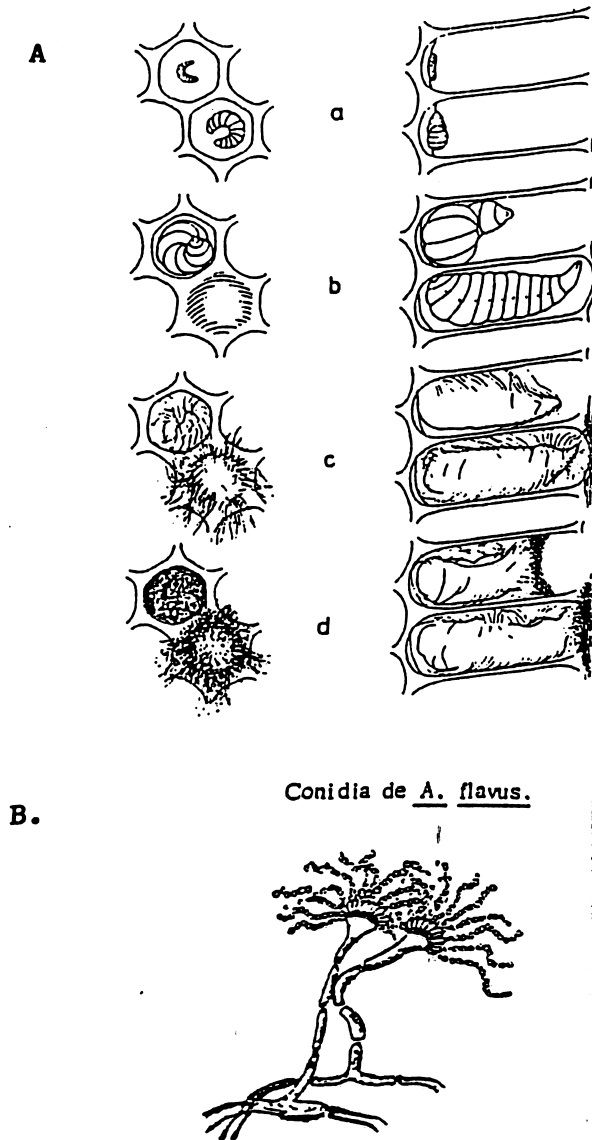


FIGURA 11. Cría de Piedra o Cría petrea, causada por el hongo Aspergillus Flavus.

A: Avance de la enfermedad como se aprecia en vista superior y lateral

B: Conidias del hongo. ( Tomado de Weis, 1984).

Figura A.

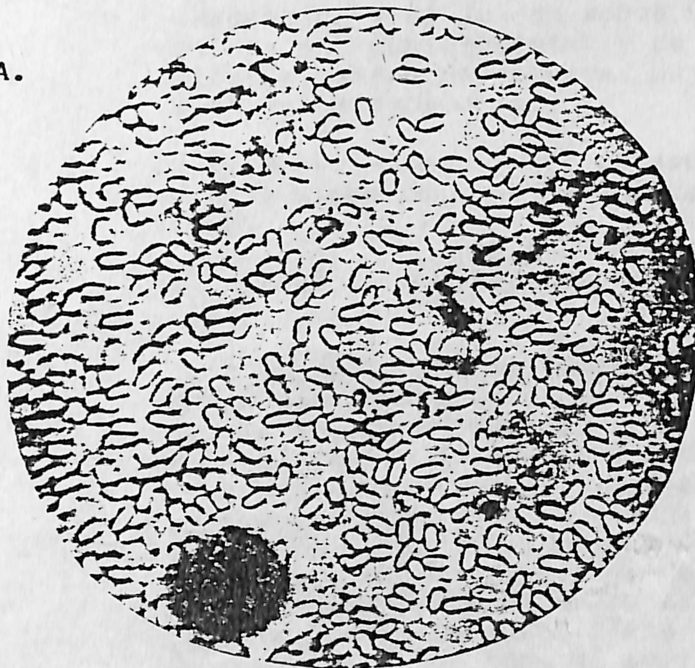
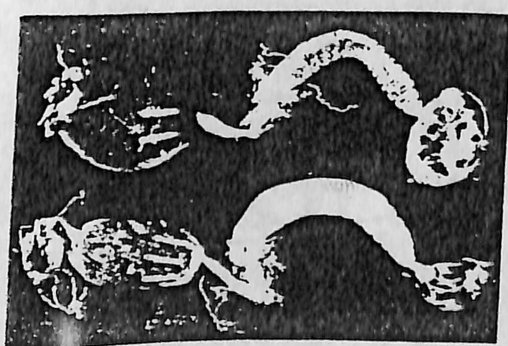


Figura B.

FIGURA 12. NOSEMA APIS.

A: Esporas de nosema como se ven en un aislado.

B: Sistema digestivo de obreras de A. Mellifera ( el intestino de la parte superior corresponde a una abeja sana y conserva las constricciones de los anillos; el intestino de la parte inferior ha perdido esas constricciones y se ve distendido y decolorado y corresponde a una abeja enferma ( Tomado de Shimanuki y Cantwell, 1978).

-Con una aza esterilizada se toma una muestra de la suspensión y se coloca sobre un porta-objetos; se coloca en cubre-objetos y se deja reposar por 3 minutos, antes de observar bajo el objetivo seco alto del microscopio.

3.2. Si se desea hacer conteo de esporas para determinar la intensidad de la infección, se puede proceder como sigue.

3.2.1. Se procesa la muestra como se indicó en los métodos anteriores.

-La submuestra que se toma con el aza se coloca sobre una cámara de conteo, siguiendo los pasos que se anotan enseguida.

-Tome la cámara de conteo (hemocitómetro) y lávela bien con agua jabonosa, remójela luego con agua corriente, sumérjala en etanol y séquela bien.

-Tome la muestra de la suspensión con una aza y colóquela bajo el cubre-objetos del hemocitómetro, evitando formación de burbujas, y cuidando que el área de la cámara quede llena de suspensión, para lo cual una o dos azas es suficiente; evite igualmente exceso de suspensión en la cámara (ver Fig. 13A).

-Deje reposar por 3 minutos antes de comenzar el conteo de esporas.

-Cuenta las esporas en 5 cuadros de la cámara, así: centro y extremos (ver Fig. 13B); cuenta las esporas que estén dentro de los cuadros y las que toquen los bordes izquierdo y superior, pero no cuente los que toquen los bordes derecho e inferior.

-Si la suspensión tiene una alta concentración de esporas y/o residuos que dificultan el conteo, se puede diluir la muestra, empleando agua destilada en proporción 1:2 o 1:10.

3.2.2. En caso de no poseer cámara de conteo, se puede estimar el grado de infestación, empleando un porta-objetos y cubre-objetos así:

-Procesar la muestra como se mencionó en un principio, hasta obtener una suspensión de 1 ml de agua destilada por c/abeja.

-Se coloca una aza de la suspensión sobre un porta-objetos, pero el volumen depositado debe ser conocido, para lo cual se emplea una aza que libere 0.01 ml de suspensión.

-Se coloca un cubre-objetos de área conocida, sobre la gota, evitando la formación de burbujas de aire.

-Se deja reposar por 3 minutos antes de iniciar el conteo.

-Se observa bajo el objetivo seco alto del microscopio.

Para el conteo se escogen 5 puntos diferentes al azar y se cuentan las esporas en cada punto. Se usa el promedio por punto para los cálculos.

3.2.3. El cálculo del número de esporas por abeja puede ser realizado como sigue:

Figura A.

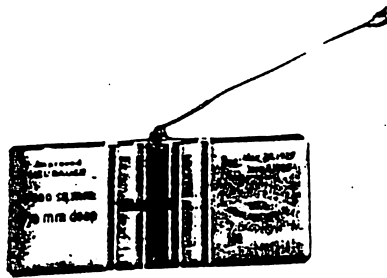


Figura B.

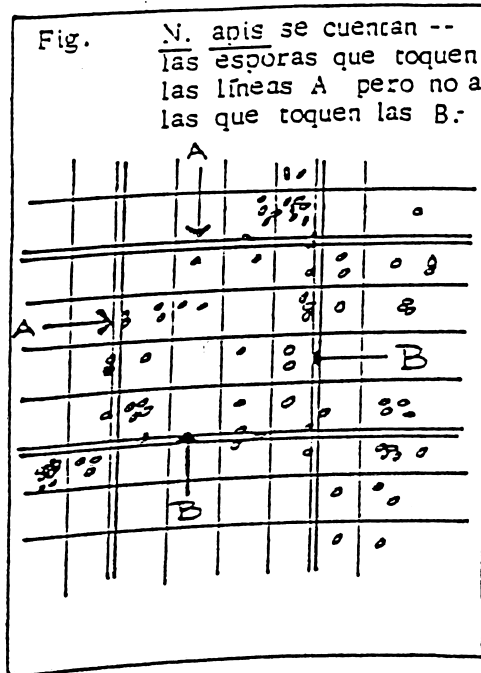


FIGURA 13. En la figura 13A se muestra la manera de colocar el aza contra la cámara de conteo, con la suspensión de esporas de nosema. La figura 13B, muestra como proceder con el conteo de las esporas ( tomados de Shimanuki y Cantwell, 1978; Sozaya y otros, 1988).

a) Si está usando una cámara de conteo (hemocitómetro):

Número total de esporas contadas

$$\frac{\quad}{80} \times 4 \times 10^6 = \text{Número de esporas/abeja}$$

b) Si emplea el método de porta y cubre-objetos, el cálculo es como sigue:

$$\frac{\text{Número promedio de esporas/campo}}{.1} \times \frac{\text{Area del cubre-objetos}}{\text{Area del campo}} \times \frac{100}{1} =$$

Número de esporas

ml

3.2.4. Para calcular la intensidad de la infección, se puede usar la escala de Jaycox así:

<u>Intensidad</u>	<u>No. de Esporas (millones/abeja)</u>
Nula	0
Muy ligera	0.01-1.0
Ligera	1.0 -5.0
Regular	5.0 -10.0
Semisevera	10.0 -20.0
Severa	más de20.0

3.3. Las esporas de Nosema apis también pueden ser detectadas examinando las heces de abejas enfermas, para lo cual se procede así:

- Haga un raspado de las heces que se encuentren en paredes y piqueras de las colmenas o sobre malezas cercanas a éstas.
- Este raspado se mezcla con agua destilada para formar una suspensión.
- De la suspensión resultante haga un montaje húmedo. Observe bajo el objetivo seco alto del microscopio.

3.4. Reinas sospechosas de estar afectadas por Nosema pueden ser examinadas procediendo como sigue:

- Se captura la reina y se coloca en un plato de petri seco y limpio; se deja caminar la reina allí libremente.
- Las reinas generalmente defecan a intervalos de una hora.
- Las heces se ven como pequeñas gotas de líquido incoloro.
- Se transfieren estas gotas con ayuda de una micropipeta o con un tubo capilar a un porta-objetos.
- Se coloca un cubre-objetos y se examina al microscopio.

4. PREPARACION DE MUESTRAS PARA ANALISIS DE AMIBAS.

El protozoo causante de esta enfermedad de las abejas (Malpigamoeba mellificae) se localiza en los tubos de malpigio. Para su detección se procede como sigue.

- Se toma una muestra de abejas adultas (25-30).
  - Se disectan estas abejas buscando su tracto digestivo. Se localizan los tubos de malpigio y se retiran éstos con la ayuda de unas pinzas de punta delicada.
  - Se coloca una gota de agua destilada sobre un porta-objetos.
  - Se colocan los tubos de malpigio sobre la gota de agua.
  - Se coloca un cubre-objetos sobre la muestra, haciendo una ligera presión sobre ésta, hasta obtener una superficie plana, uniforme.
  - Se buscan las esporas empleando el objetivo de aceite de inmersión.
- Las esporas se ven como pequeñas gotas de aceite flotando en agua (Fig. 14).

#### 5. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA DETERMINAR VIROSIS.

En el país no existen equipos que permitan identificar virus de abeja melífera, pero es posible reproducir la enfermedad con el procedimiento que se anota enseguida.

- Se hace una suspensión de abejas sospechosas empleando 1 ml de agua destilada por cada abeja.
  - Se centrifuga esta suspensión para eliminar desechos grandes y se filtran a través de un filtro de 0.45  $\mu$ m, para remover las bacterias. Se obtiene un extracto.
  - Este extracto se asperja o inyecta o se da en alimento a abejas sanas confinadas en jaulas (aproximadamente 20 abejas).
  - En caso de darse con el alimento, se mezclan 2 ml del extracto en igual volumen de jarabe de azúcar por cada 20 abejas.
  - Si se usa el método de inyección, cada abeja recibe 1 ml del extracto a través de las membranas intersegmentales del abdomen dorsal.
- Los síntomas se observan luego de 6 días.

Nota: Al mismo tiempo que se procede como se acaba de indicar, se debe hacer un tratamiento con abejas control, para lo cual se les suministra a éstas un extracto de abejas sanas.

#### 6. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA DETERMINAR ACARO DE LAS TRAQUEAS.

Existen varios métodos para procesar abejas sospechosas de estar atacadas por Acarapis woodi o ácaro de las tráqueas. Mencionamos los más comunes. El ácaro se localiza en el primer par de espiráculos torácicos de obreras, reinas y zánganos y la entrada del parásito ocurre normalmente durante los 5 primeros días de vida de la abeja como adulta.

Figura A.

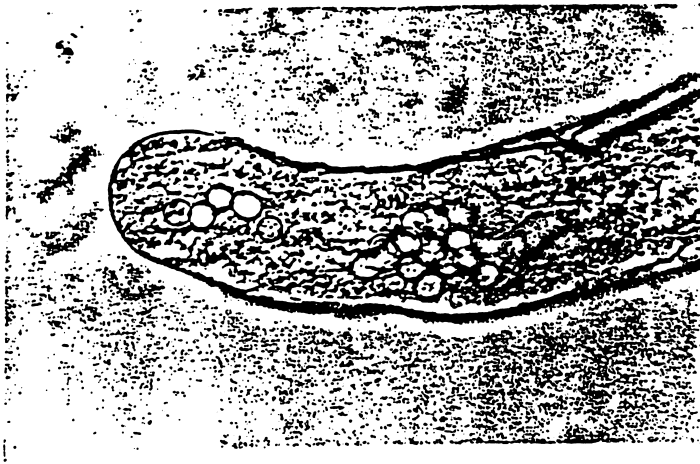


Figura B.

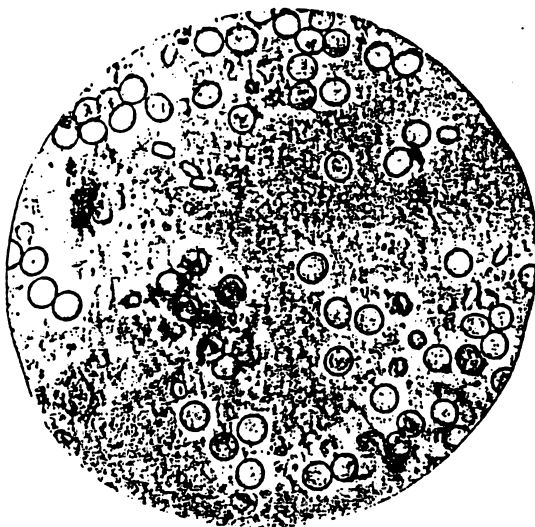


FIGURA 14. AMIBIASIS.

- A: Quistes de Malpighamoeba mellificae dentro de un tubo de malpigio.  
 B: Quistes del protozooario tal como se observan en un preparado ( se observan además algunas esporas de nosema, que son las mas pequeñas y de forma oval.) ( tomado de Ministry of Agr. Fish y Food, - 1980).

6.1. Un método sencillo consiste en :

- Colocar la abejas patas arriba sobre una tabla o corcho, sujetándola fuertemente con unas pinzas en la región del mesotórax lateral.
- Con una cuchilla de afeitar o con un bisturí, se retira la cabeza y patas anteriores de la abeja, mediante un corte en ángulo (Ver Fig. 15A) entre la unión de la coxas.
- Queda así un corte al que se le coloca una gota de ácido láctico y que puede ser entonces observado bajo el estereomicroscopio.
- En ausencia de ácido láctico (sirve para aclarar los tejidos), se puede lograr el mismo resultado, limpiando el área a observar con ayuda de unas pinzas de punta delicada, lo que permite retirar músculos y otros tejidos que impiden observar los tubos traqueales.
- Si la abeja esta libre de ácaros, los tubos traqueales se ven limpios en su interior y se ven de color perla; por el contrario, en caso de abejas enfermas, estos tubos se ven decolorados o manchados (Ver Fig. 15B); en la Fig. 15C, se observa un tubo traqueal con ácaros en su interior.

6.2. Otro método un poco mas laborioso, pero muy eficiente consiste en:

- Colocar la(s) abeja(s) sobre su dorso en una tabla de madera.
- Con unas pinzas se sostiene la abeja cogiéndola del tórax.
- Con una cuchilla se mueven las patas anteriores hacia adelante y se hace un corte transversal a través del área membranosa que se observa atrás de las patas anteriores; se remueven así la cabeza junto con el protórax al que van adheridas las patas anteriores.
- Se hace un segundo corte transversal y paralelo al anterior, al frente de las patas medias, a través de la base de las alas anteriores. Este corte nos da un anillo que debe contener las tráqueas protorácicas.
- Se colocan estos anillos en un plato de petri y se agrega hidróxido de potasio al 5% en cantidad suficiente que cubra los discos.
- Se coloca el plato de petri con los anillos y el KOH en una incubadora a 37°C por 24 horas. El KOH remueve el tejido muscular y permitirá que los tubos traqueales queden visibles para su observación bajo el estereomicroscopio.
- Luego de las 24 horas, se toman los anillos y se les lava el KOH con agua corriente (un chorro suave) y se agrega etanol al 70%.
- Se observa cada anillo bajo el estereomicroscopio a un aumento de 40X. Las traqueas sanas y enfermas se observan como se muestra en la Fig. 15B.

Nota: Si no puede observar los anillos inmediatamente luego de la incubación lávelos como se indicó y consérvelos en etanol en la nevera por varios días.



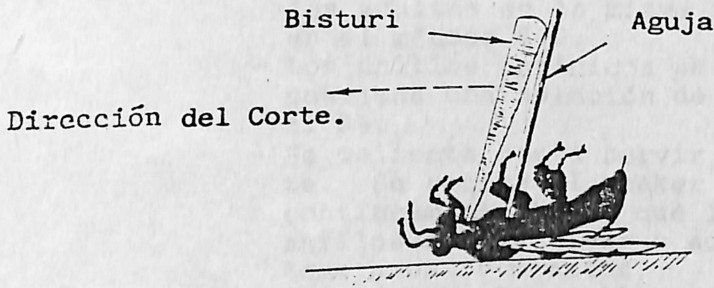


Figura A.



Figura B.

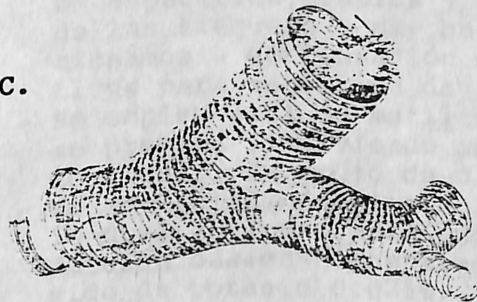


FIGURA 15. ACARO DE LAS TRAQUEAS.

- A: Posición de la abeja para el corte a través del tórax anterior y dirección del corte.
- B: Traquea mostrando ataque de ácaros (puntos negros) en el corte de la izquierda y traquea sana en el corte de la derecha.
- C: Dibujo de traquea con ácaros en su interior, tal como se aprecia en un montaje. ( tomado de Shimannki y Cantwell, 1978).

6.3. Existe un método de tinción simple para detección de Acarapis. Este es como sigue (método de Peng y Nasr/1985).

- Se obtienen anillos torácicos de 1-1.5 mm de abejas adultas en la misma forma como se menciona en el método 6.2.
- Los anillos torácicos se colocan en un beaker que contiene una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 8%.
- Se calienta hasta hervir, revolviendo continuamente. Se retira el beaker y se sigue revolviendo continuamente hasta que los tejidos dentro de los anillos se disuelvan y aclaren; todo este proceso toma unos 10 minutos.
- Se recobran los anillos de la solución, filtrándolos a través de una malla muy fina.
- Se lavan los anillos con corriente suave de agua para remover el hidróxido de potasio.
- Luego de que los anillos estén lavados son transferidos secuencialmente a la solución coloreadora, a la solución de diferenciación y a la solución de post-tinción.
- Se examinan los anillos bajo el microscopio de di sección bajo un aumento de 10-25X (En la Fig. 16 se resume el procedimiento general).  
Según los autores, la técnica de tinción catiónica es específica, rápida y útil para detectar ácaro de las traqueas a muy bajo aumento; por ello mencionamos a continuación como se preparan los reactivos para este tipo de tinción.
- Se emplea azul de metileno acuoso al 1%, el que se prepara disolviendo azul de metileno y agregando cloruro de sodio de 0.85%.
- Se emplea además tinción modificada de Shleifstein, lo cual se logra mezclando 7 gotas de solución de fucsina básica-gliceral-alcohol, con 1 ml de hidróxido de potasio 0.025%.
- Cristal violeta, que se prepara disolviendo 2 grs de cristal violeta en 20 ml de etanol 95%, al que se le agregan 80 ml de oxalato de amonio acuoso al 1%.
- Acido fórmico-cristal violeta- azul de toluideno. Los mordientes son Hematoxilina N°. 3 de Gill o Hematoxilina de Harvis.  
El proceso general se resume así:

Técnica de tinción	Tiempo de tinción (min.)	Diferenciación Solución - Tiempo (min.)	Posttinción Solución - Tiempo (min.)
Azul de metileno modificada al 1%	5	Agua destilada 2-5	1) Etanol 70%-Lavar 2) Etanol 95%-Almacenar.
Tinción modificada de Schleifstein	8	Etanol 90% 2-5	Etanol 95%
Mordiente: Hematoxilina de Gill	15	Etanol acídico 70% 6-10	1) Agua destilada 5-1 2) Etanol 70% (Almacenar)

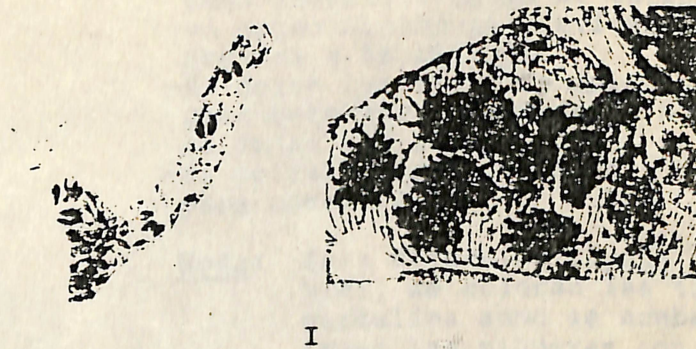
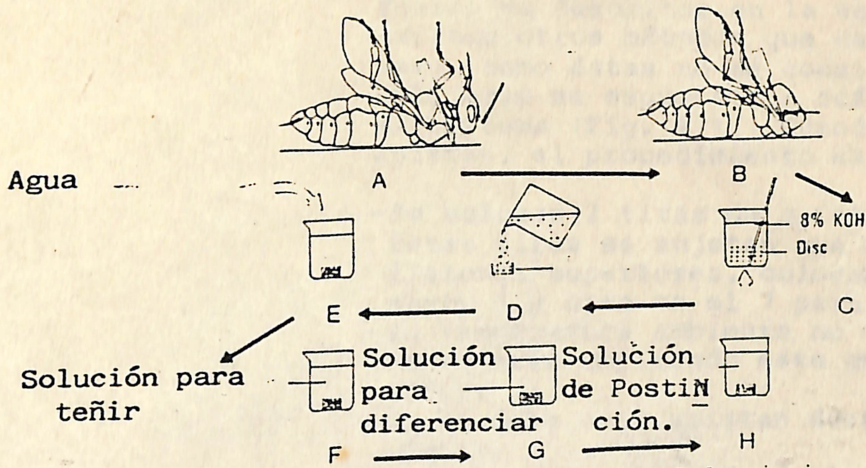


FIGURA 16. ACARO DE LAS TRAQUEAS, METODO DE TINCION SIMPLE.

- A: Procedimiento general para corte y obtención de los anillos torácicos y posterior tinción de estos, primer corte para remoción de cabeza y patas.  
 B: Segundo corte.  
 C: Maceración de los anillos en KOH hirviendo.  
 D: Filtrado de los anillos.  
 E: Lavado con agua corriente.  
 F: Tinción.  
 G: Diferenciación.  
 H: Posttinción.  
 I: Tráqueas con ácaros en su interior como se ven luego de la tinción (tomado de Peng y Nasr, 1985).

7. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA DETECTAR VARROA Y OTROS ACAROS EXTERNOS.

Los métodos más usados para lograr este objetivo fueron ya descritos en la sección 2-5. Existen otros métodos que emplean tiras de Apistan, pero como éstas no se consiguen en el mercado local, solo se esquematiza acá la forma como opera el sistema (Fig. 17). Cuando se emplean tiras de apistan, el procedimiento es como sigue:

- Se colocan 2 tiras de apistan por cámara de cría. Estas tiras se sujetan con estoperoles de los listones superiores, colocando una tira en el marco 3 y otra en el 7 para un mejor cubrimiento.
- La temperatura ambiente no debe ser muy alta cuando se este empleando este método (aproximadamente 15°C).
- No se debe usar apistan durante época de flujo de néctar.
- Se coloca en el fondo de la cámara de cría una cartulina impregnada de un pegante (ej.: tanglefoot, pega-insect, o grasa de carro). Esta debe llevar un anejo encima para evitar que las abejas queden pegadas a la cartulina.
- Se dejan las tiras de apistan por 2-3 días (si es para detectar la presencia del ácaro; para control se dejan por 1 mes).
- Se retiran las cartulinas y se llevan al laboratorio para observación.

Nota: Para detección rápida (aunque menos confiable), se colocan las tiras de apistan y la cartulina como se acaba de mencionar y se tapan las piqueras con pasto. Al cabo de 1 hora o 2 horas, algunos ácaros habrán caído sobre la cartulina con el pegante. En caso de infestación alta, aún en tiempo tan corto como 15 minutos o 30 minutos, ya se tendrán ácaros sobre la cartulina.

8. A continuación se mencionan algunas técnicas de laboratorio útiles para la preparación de especímenes en cuanto se refiere a métodos de tinción, aclareo y preparación de colorantes.

8.1. ALGUNAS TECNICAS PARA PREPARAR COLORANTES

8.1.1. Como preparar el colorante fucsina carbólica

-Preparar la solución A, así:

0.3 grs de fucsina básica del 90%  
10.0 ml de alcohol etílico al 95%

-Preparar la solución B, así:

5.0 grs de fenol  
95.0 ml de agua destilada

Mezclar soluciones A y B.

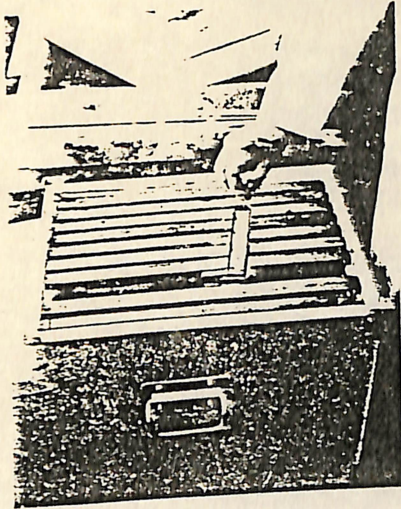


Figura A.

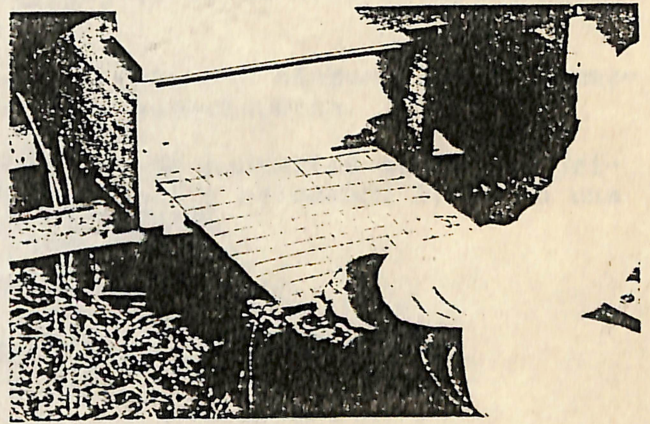


Figura B.



Figura C.

FIGURA 17. DETECCIÓN DE VARROA EMPLEANDO TIRAS DE APISTAN.

- A: Colocación de las tiras de Apistan en la cámara de cría.  
 B: Colocación de la cartulina con el adherente en el fondo de la colmena.  
 C: Retiro de la cartulina para su observación en el laboratorio.  
 ( Adaptado de Barbattini y Chiesa, 1987) .

8.1.2. Fórmula de Hucker para cristal violeta (para teñir) bacterias

- Cristal violeta : 2 gr.
- Etanol (95%) : 20 ml.
- Oxalato de amonio 1% (W/V) acuoso : 80 ml.
- Disolver el cristal violeta en el etanol. Añadir luego el oxolato de amonio y dejar reposar por 48 horas antes de usar.

8.1.3. Fórmula de Loeffler para metilen-blue (para teñir bacterias)

- Metilen blue chloride : 1.6 gr.
- Etanol 95% (Vol/Vol) : 100 ml.
- Hidróxido de potasio 0.01% (W/V) acuoso : 100 ml.
- Preparar una solución saturada de metilen blue alcohol. Se agrega 30 ml de ésta al hidróxido de potasio.

Si las células no tiñen con ninguna de estas mezclas, entonces usar carbofucsina.

Montajes permanentes de bacterias deben ser primero aclarado en Xyleno y colocados luego en una gota de bálsamo de Canadá.

9. ALGUNOS METODOS DE TINCION

9.1. Método de Hucker para tinción positiva

-Solución A:

- Cristal violeta (certificado 90% de contenido seco): 2.0 gr.
- Etanol 95% (Vol/Vol) : 20 ml.

-Solución B:

- Oxalato de amonio : 0.8 gr.
- Agua destilada : 80 ml.
- Mezclar soluciones A y B. Almacenar por 24 horas y filtrar a través de papel antes de usar.

-Mordientes:

- Yodo : 1.0 gr.
- Potasio de yodo : 2.0 gr.
- Agua destilada : 300 ml.
- Se colocan el yodo y yoduro de potasio en un mortero, se agrega el agua lentamente, revolviendo continuamente hasta que el yodo se disuelva. Se guarda en frascos ambar.

-Solvente para decolorar:

- Etanol 95% (Vol/Vol)

-Retinción (counterstain):

- Safranina 0 (2.5% W/Vl) en 95% (Vol/Vol) etanol: 10 ml.
- Agua destilada : 100 ml.

Procedimiento :

- Se sumerge el montaje seco por 1 min. en el cristal violeta.
- Se lava en agua corriente suave por 2 segundos.
- Se sumerge el montaje en el mordiente de yodo por 1 min.
- Se lava en agua corriente por 2 seg. y se seca con papel absorbente.
- Sumerge en etanol 95% por 30 segundos con agitación y se seca con papel absorbente.
- Se sumerge en el counterstain por 10 segundos.
- Se lava con agua corriente, suavemente hasta que desaparezca el color y se seca con papel absorbente.
- Bacterias gram negativas se ven azules o violeta.

9.2. Método de Ziehl-Nielsen para tinción negativa rápida

- Colorante fucsina :  
Fucsina básica 0.3 grs.  
Etanol 95% (Vol/Vol) : 10 ml.  
Cristales de fenol derretidos al calor : 5 ml.  
Agua destilada : 95 ml.

Se disuelve la fucsina básica en el etanol, se agrega el fenol disuelto en agua. Se mezcla y se deja reposar por varios días. Filtrar antes de usar.

- Solvente para decolorar :

Etanol 95% (Vol/Vol) : 97 ml.  
Acido hidroclicórico (concentrado) : 3 ml.

- Contratinción (counterstain) :

Metilénblue choride : 0.3 gr.  
Agua destilada : 100 ml.

Procedimiento :

Sumergir el montaje seco en la carbofucsina. Calentar cuidadosamente el montaje con mechero, hasta que esté caliente pero no hirviendo; dejar así por 5 min., calentando a medida que se vaya necesitando.

Lavar con corriente suave de agua corriente en forma indirecta, hasta que desaparezca el color.

Sumergir en el solvente decolorante, lavar inmediatamente con agua corriente. Repetir la decoloración y lavado hasta que el montaje se vea rosado.

Sumergir en el counterstain por 20-30 seg. Lavar con agua corriente, secar con papel absorbente.

Examinar.

Bacterias gram negativas se ven rojas.

9.3. Método de Giemsa para colorear rickettsias

- Solución : polvo de Giemsa = 0.5 grs + Clicerol = 33 ml + metanol absoluto = 33ml. Se disuelve el polvo de Giemsa en glicerol a 55-60°C por 1.5 - 2.0

horas. Se agrega el metanol, se mezcla bien y se deja reposar.  
Se almacena a temperatura ambiente.

Procedimiento :

Secar la placa al aire, fijar en metanol absoluto por 5 minutos y secar al aire. Cubrir el montaje con tinción de Giemsa recién preparada por 1 hora. Lavar con etanol 95%, secar al aire y examinar..

10. SOLUCIONES PARA RELAJAR, PRESERVAR, ACLARAR Y MONTAR ESPECIMENES.

10.1. Solución para RELAJAR especímenes o partes.

FLUIDO DE BARBER

- Alcohol etílico al 95%.....	95 cc
- Agua.....	50 cc
- Acetato de étilo.....	20 cc
- Benzeno.....	7 cc

10.2. Soluciones para PRESERVAR insectos y otros artrópodos.

A. SOLUCION DE HOOD

- 70-80% de alcohol etílico.....	95 cc
- Glicerina.....	5 cc

B. SOLUCION DE KAHLE

- Alcohol etílico al 95%.....	30 cc
- Formaldehído.....	12 cc
- Acido acetico glacial.....	4 cc
- Agua.....	60 cc

C. SOLUCION ALCOHOLICA DE BOUIN

- Alcohol etílico 80%.....	150 cc
- Formaldehído.....	60 cc
- Acido acético glacial.....	15 cc
- Acido pícrico.....	1 gr

10.3. Método para CLARIFICAR

Los especímenes oscuros pueden ser montados en placas después de clarificarlos, la sustancia más usada es hidróxido de potasio (KOH) y solución Nessbitt.

Cuando se use KOH se puede lavar el exceso con agua (preferiblemente con un poco de ácido acético).

Los especímenes aclarados en solución de Nessbitt pueden ser transferidos directamente al medio de montaje.

El KOH usado es de 10 a 15%.

SOLUCION DE NESBITT

- Hidrato de cloral.....	40 grs.
- Acido clorhídrico concentrado.....	2.5 cc
- Agua destilada.....	25 a 50 cc

La muestra se puede hervir en KOH acelerando el



aclaramiento, pero puede dañarse el espécimen, requiere de varias horas, días o más. La solución de Nesbitt es usada sin calentar y requiere de pocas horas o pocos días.

10.4. Método para CLARIFICAR ácaros.

A. SOLUCION DE LACTOFENOL

- 50 partes de ácido láctico
- 25 partes de fenol
- 25 partes de agua destilada

B. SOLUCION DE VITZTHUM

- 9 partes de fenol
- 10 partes de hidrato de cloral
- 1 parte de agua destilada

El proceso de aclaramiento de los ácaros puede durar de 2 a 3 días, o más según el grado de esclerotización de los especímenes.

11. Medio permanente para MONTAJE de placas.

HIDRATO DE CLORAL DE HOYER

- Agua..... 50 cc
- Goma arábica..... 30 gr
- Hidrato de cloral.....200 gr
- Glicerina..... 20 cc

Como sellante se puede usar esmalte de uñas o bálsamo amparol..

Hidrato de cloral de HOYER ( preparación )

La Goma arábica se diluye en agua destilada al calor ( sin llegar a la ebullición ), al calentar se puede agregar 10-15 cc de agua adicional; se filtra usando papel filtro u hojas de pañuelos de papel, la solución final debe ser de aproximadamente 30 cc y con un aspecto ligeramente turbio, sin presencia de cristales. La mezcla de hidrato de cloral y la glicerina con la goma se hace al enfriarse completamente ésta.

## BIBLIOGRAFIA.

- ADAS, NATIONAL BEEKEEPING UNIT. 1991. Common diseases of the adult honeybee. P 3015. 4pp.
- BARBATTINI, R y F. CHIESA. 1987. Lo stato della varroasi in Italia. La varroasi, OGGI, Convegno Internazionale di Apicoltura. Trento Italia.
- BAILEY, L. 1959. An improved method for the insolation of Streptococcus pluton, and observations on its distribution and Ecology. J. Ins Pathol 1, 80-85.
- BAILEY, L. 1981. Honey bee pathology. Academic Press. Inc. London. 124 pp.
- CANTWELL, G.E. 1970. Standard methods for counting nosema spores. Am. Bee Journal, 222-223.
- DOTTIN, B. 1988. La Nosemose. Sante de l'abeille. N° 104. Mars-Avril.
- EL-SHEMY, A.A.M. and R.S. PICKARD. 1989. Nosema apis zander infection levels in honeybees of known age. J. Apic. Res. 28(2): 101-106.
- FAUCON, J-P. 1989. Precis de pathologie L'Amibiase. La Sante de L'abeille N° 114, Nov-Dec.
- FAUCON, J.P. 1989. Precis de pathologie. L'Acariose. La Sante de L'abeille. N° 109, Jan-Fev.
- FLECHE, S.C and J.P. FAUCON. 1988. Varroatose Pathogenie, symptomes, epidemiologie, traitements et perspectives. Rev. Franc. d'Apiculture. N° 476, 339-344.
- FRIES, I. 1988. Infectivity and multiplication of Nosema apis Z. in the ventriculus of the honey bee. Apidologie 19(3): 319-328.
- GOCHNAUER, T.A. and J. CORNER. 1974. Detection and identification of Bacillus larvae in a commercial pollen sample. J. Apic. Res. 13, 264-267.
- GRIFFITH, D.A. and W. RITTER 1989. World overview on the impact and management of Varroa jacobsoni on beekeeping. Apiacta XXIV, 97-108.
- JAYCOX, E.R. 1988. Enfermedades y parásitos de las abejas. Sinópsis Curso Regional de Patología Apícola. Cuernavaca/Morelos, México. BID/OIRSA. 3pp
- KOCH, W. 1989. Viral infections of the melliferous honeybee, especially considering the association with varroa disease. Apiacta, XXIV, 109-116.

- L'ARRIVE, J.C.M. and R. HRYTSAK. 1964. Coprological examination for nosematosis in queen bees. J. Ins. Pathol. 6, 126..
- LORENZEN, K. and N. GARY. 1986. Modified dissection technique for diagnosis of tracheal mites in honey bees. J. Econ. Entomol. 79: 1401-03.
- MANTILLA, C.C. 1991. Principios de Apicultura Africanizada Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Medellín. 162 pp.
- MESSAGE, D. 1988. Principais doenças de abelhas A.mellifera. Curso Regional en Patología Apícola. Cuernavaca/Morelos, México. OIRSA/BID. 18pp.
- MICHAEL, A.S. 1957. Droplet method for observation of living Unstained bacteria. Journal of Bacteriology. 74,831.
- MINISTRY of AGRICULTURE, FISHERIES and FOOD. 1980. Diseases of bees. Bulletin 100. London. 34pp.
- MINISTRY of AGRICULTURE and FOOD, and CANADIAN ASSOCIATION of PROFESSIONAL APICULTURISTS. 1988. Honey bee diseases and pests. Publication 213. 17pp,
- MORALES, S.G. 1988. Enfermedades, plagas y predadores de la abeja melifera. 1er Seminario de Apicultura Africanizada. Oiba, Santander. 40 pp.
- NOWOTNICK, K. 1989. Effects and results of varroa treatment in the German Democratic Republic. Canadian Bee - Keeping. 15(2): 33-34.
- PENG, Y-S. and M.E.Nasr. 1985. Detection of honeybee tracheal mites (A.woodi) by simple staining techniques. J.Inv. Pathol. 46, 325-331.
- RUIJTER, A de and J.v.d. EIJNDE. 1984. Detection of varroa mite in the Netherlands using tobacco smoke. Bee World 65(4): 151-154.
- SHIMANUKI, H. and G.E. CANTWELL. 1978. Diagnosis of honey bee diseases, parasites and pests. U.S.D.A. ARS-NE-87. 18pp.
- SHIMANUKI, H and D.A.KNOX. 1991. Diagnosis of honey bee diseases. U.S.D.A. Handbook N°-690. 53pp.
- SOZAYA, A.R., E. GUZMAN y G.MENESES. 1988. Técnicas de diagnóstico de las enfermedades y parásitos de las abejas. Programa Regional para el manejo y control de la abeja africanizada. BID/OIRSA. 13pp.
- SWATEK, F.E. 1967. Textbook of Microbiology. The C.V.Mosby Co. Saint Louis, U.S.A. 721pp. **BIBLIOTECA CENTRAL**

- SZABO, T.I. 1989. The capping scratcher: a tool for detection and control of Varroa jacobsoni. Am. Bee Journal. 129, 402-403.
- UNIVERSITY of GUELPH. 1991. Diagnosis of Brood diseases. Laboratory in advanced Apiculture I. 34-660. 11pp.
- WEISS, K. 1984. Bienen-Pathologie. Ehrenwirth-Verlag. München. 252pp.

#### AGRADECIMIENTOS.

Este texto es el resultado de varios años de consulta y de una pasantía en Guelph, Canada, financiada por el Centro - Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, CIID. A las Directivas del CIID quiero expresar mis sinceros agradecimientos, así como al personal de Apicultura de la Universidad de Guelph, particularmente a los Drs, Gard W.Otis, Medhat E. Nasr y a la familia Perrin por su valiosa colaboración y enseñanzas.



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE COLOMBIA  
SEDE MEDELLÍN  
SECRETARÍA DE SEDE  
DEPARTAMENTO DE BIBLIOTECAS

Renovación en los teléfonos:

425 50 03, 430 97 85, 430 97 95 ó

en la página web: <http://www.unalmed.edu.co/biblioteca>

FECHA DE DEVOLUCIÓN

~~06 JUN. 2007~~ RECIBIDO 1 - JUN 2007

RECIBIDO 23 NOV 2017

RECIBIDO 10 MAR 2016

23 ABR 2016 *lomo*

RECIBIDO 02 MAY 2016

RECIBIDO 02 JUN 2017

~~08 MAR 2018~~

RECIBIDO 02 ABR 2018

DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y SERVICIOS DE INFORMACIÓN Y COMUNICACIÓN  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
SEDE MEDELLÍN

