

Año: 2022

Título Tesis Doctoral: Patogenicidad y virulencia de *Crithidia mellificae* y *Lotmaria passim* y nueva descripción del morfotipo haptomona en *Apis mellifera iberiensis*.

Doctoranda: María Buendía Abad

Organismo financiador del contrato pre-doctoral: Ayudas para contratos predoctorales para la formación de personal investigador en agoralimentación en centros INIA-CCAA (FPI-INIA).

Convocatoria y nº expediente: Curso académico 2021/2022, número de expediente: V1088/10

Duración contrato: 01/12/2017 a 30/04/2022

Directores de la tesis: Mariano Higes Pascual, Raquel Martín Hernández y Aránzazu Meana Mañes.

Universidad, fecha de lectura y calificación: Universidad Complutense de Madrid, 26/05/2022, Sobresaliente "Cum Laude".

RESUMEN:

Los tripanosomátidos son un grupo muy extenso de protozoos parásitos de gran relevancia pública y veterinaria. Dos grupos, *Leishmania* y *Trypanosoma*, son los agentes causales de enfermedades muy graves para el ser humano y otras especies de animales, como la leishmaniosis, la enfermedad de Chagas o la enfermedad del sueño. Se trata, por tanto, de unos organismos ampliamente estudiados. Sin embargo, la mayor parte de las especies de la familia Trypanosomatidae se han descrito colonizando el tracto digestivo de insectos, y aunque la mayor parte de ellas están considerados como no patógenos para su hospedador, los tripanosomátidos que infectan abejas y abejorros parecen ser una excepción.

En esta tesis se han estudiado aspectos básicos de la patogenicidad y virulencia de estos organismos, con el fin de conocer su verdadero impacto en la salud de las abejas, tanto a nivel de colonia como individual.

Por primera vez, se ha obtenido la prevalencia de estos organismos en las colonias de abejas de Castilla-La Mancha en dos periodos de tiempo (años 2013-2014, y 2019, 2020 y 2021), en lo que constituye el estudio más extenso hasta la fecha en España. Para ello, se ha desarrollado una nueva técnica de RT-qPCR que ha permitido no sólo la identificación efectiva de tres especies de tripanosomátidos en las colonias de abejas, sino también la cuantificación de la carga parasitaria de éstas, incluso en bajos niveles de parasitación, constituyendo una herramienta eficaz y fiable para el análisis de muestras de campo. Utilizando técnicas de identificación molecular se han detectado tripanosomátidos en las colonias de todas las provincias de la región, siendo *L. passim* la especie más prevalente, *C. mellificae* se detectó en algunas ocasiones y *C. bombi* en ninguna.

El uso de técnicas de microbiología clásicas ha permitido optimizar las condiciones de cultivo in vitro de *C. mellificae* y *L. passim*, demostrando la existencia de diferencias en su tasa y velocidad de crecimiento en función del medio de cultivo utilizado, lo que sugiere que entre ambas existen diferencias fisiológicas. Estas técnicas también han permitido la obtención de morfotipos

flagelados de estas especies capaces de colonizar el tracto digestivo posterior de abejas infectadas experimentalmente, lo que produjo la aparición del morfotipo haptomona, en lo que constituye la primera descripción de este estadio para estas especies de tripanosomátidos en *A. mellifera*. Este morfotipo lleva implícita una remodelación del flagelo que le permite adherirse a la pared intestinal de la abeja. Sin embargo, la colonización del tracto digestivo posterior no provocó lesiones en las células intestinales. Ambas especies indujeron mayor mortalidad en las abejas infectadas que en las no infectadas, pero ésta fue mayor y más temprana al aumentar la dosis de infección, siendo *L. passim* la especie más virulenta. También se encontraron diferencias en la virulencia en función de la fase de crecimiento de los cultivos, registrándose mayor mortalidad en abejas infectadas con morfotipos obtenidos de cultivos de fase estacionaria temprana.

Se ha aislado una nueva cepa de *L. passim* (C1) que causa mayor mortalidad en las abejas infectadas que la cepa de referencia de esta especie (ATCC PRA-403). La diferencia en el número de pases de cultivo celular (CCPs) realizados en el laboratorio entre ambas cepas, necesarios para su mantenimiento in vitro, contribuiría a esta pérdida de virulencia.

La infección experimental de zánganos con *C. mellificae* reveló que esta especie es capaz de infectar a los individuos machos de la colonia, siendo estos más susceptibles a la infección que las hembras. Esta infección también se ha detectado en condiciones naturales, aunque los niveles de infección eran más bajos. De esta forma, los zánganos podrían actuar como eficaces transmisores de estos patógenos no sólo en la colonia, sino también entre distintas colonias.

INFORMACIÓN CIENTÍFICA Y TÉCNICA PROPORCIONADA POR LA TESIS

Como resultado de la presente Tesis Doctoral, se han publicado los siguientes artículos científicos:

Buendía, M., Martín-Hernández, R., Ornos, C., Barrios, L., Bartolomé, C., & Higes, M. (2018). Epidemiological study of honey bee pathogens in Europe: The results of Castilla-La Mancha (Spain). *Spanish Journal of Agricultural Research*, 16(2), 0502. Q2, Agriculture, multidisciplinary, 1.035; 28/157.

- Gómez-Moracho, T., **Buendía-Abad, M.,** Benito, M., García-Palencia, P., Barrios, L., Bartolomé, C., Maside, X., Meana, A., Jiménez-Antón, M.D., Olías-Molero, A.I., Alunda, J., Martín-Hernández, R. & Higes, M. (2020). Experimental evidence of harmful effects of *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim* on honey bees. *International Journal for Parasitology*, 50(13), 1117-1124. Q1, Parasitology; 3.981; 7/38.

- **Buendía-Abad, M.,** Higes, M., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Meana, A., Fernández, A. F., ... & De Pablos, L. M. (2021). Workflow of *Lotmaria passim* isolation: Experimental infection with a low-passage strain causes higher honeybee mortality rates than the PRA-403 reference strain. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 14, 68-74. Q2, Ecology; 2.674; 83/178.

- **Buendía-Abad, M.,** García-Palencia, P., de Pablos, L. M., Alunda, J. M., Osuna, A., Martín-Hernández, R., Higes, M. (2022). First description of *Lotmaria passim* and *Crithidia mellificae* haptomonad stages in the honeybee hindgut. *International Journal for Parasitology*, 52, 65-75. Q1, Parasitology; 3.981; 4/42.

Como resultado de los experimentos realizados, quedan pendientes de publicación otros 5 trabajos.

Asimismo, la doctoranda ha participado también en la publicación de otros 4 artículos en colaboración con otros grupos de investigación:

- Bartolomé, C., **Buendía-Abad, M.**, Ornosa, C., De la Rúa, P., Martín-Hernández, R., Higes, M., & Maside, X. (2021). Bee Trypanosomatids: First Steps in the Analysis of the Genetic Variation and Population Structure of *Lotmaria passim*, *Crithidia bombi* and *Crithidia mellifica*. *Microbial Ecology*, 1-12. Q1, Ecology; 4.552; 27/178.

- Bartolomé, C., **Buendía, M.**, Benito, M., De la Rúa, P., Ornosa, C., Martín-Hernández, R., Higes, M & Maside, X. (2018). A new multiplex PCR protocol to detect mixed trypanosomatid infections in species of *Apis* and *Bombus*. *Journal of invertebrate pathology*, 154, 37-41. Q1, Zoology; 2.101; 25/170.

- Bartolomé, C., **Buendía-Abad, M.**, Benito, M., Sobrino, B., Amigo, J., Carracedo, A., ... & Maside, X. (2020). Longitudinal analysis on parasite diversity in honeybee colonies: new taxa, high frequency of mixed infections and seasonal patterns of variation. *Scientific reports*, 10(1), 1-9. Q1, Multidisciplinary sciences; 4.380; 19/128.

- Bartolomé, C., Jabal-Uriel, C., **Buendía-Abad, M.**, Benito, M., Ornosa, C., De la Rúa, P., ... & Maside, X. (2021). Wide diversity of parasites in *Bombus terrestris* (Linnaeus, 1758) revealed by a high-throughput sequencing approach. *Environmental Microbiology*, 23(1), 478-483. Q1, Microbiology; 5.491; 27/151.

ASISTENCIA A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES DE RECONOCIDO PRESTIGIO:

XX Congreso Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA) – San Cristóbal de la Laguna, España, 2017

Póster – “Pan-European epidemiological study of honey bee pathogens. The results of Castilla-La Mancha (Spain)”. Autores: **María Buendía**, Raquel Martín-Hernández, Concepción Ornosa, Laura Barrios, Carolina Bartolomé, Aránzazu Meana, Mariano Higes.

Póster – “Detection of trypanosomatids in *Apis* and *Bombus* species: A new multiplex protocol”. Autores: Carolina Bartolomé, **María Buendía**, Pilar de la Rúa, Raquel Martín-Hernández, Mariano Higes, Xulio Maside.

V Congreso Ibérico de Apicultura – Coimbra, Portugal, 2018

Comunicación oral – “Determinación de la acción patógena y prevalencia de tripanosomátidos emergentes en himenópteros: un nuevo proyecto de investigación en España”. Autores: **María Buendía**, Raquel Martín-Hernández, María Benito, Carolina Bartolomé, Xulio Maside, Tamara Gómez-Moracho, Mariano Higes.

XXXVII Feria Apícola Internacional de Pastrana – Pastrana, España, 2018

Comunicación oral – “Determinación de la acción patógena y prevalencia de tripanosomátidos emergentes en himenópteros: un nuevo proyecto de investigación en España”. Autores: **María**

Buendía, Raquel Martín-Hernández, María Benito, Carolina Bartolomé, Xulio Maside, Tamara Gómez-Moracho, Mariano Higes.

8th EurBee Congress of Apidology – Gante, Bélgica, 2018

Póster – “Comparative analysis of PCR protocols to detect bee trypanosomatids”. Autores: **María Buendía-Abad**, Raquel Martín-Hernández, María Benito, Carolina Bartolomé, Xulio Maside, Mariano Higes.

Póster – “A new multiplex PCR protocol to detect mixed trypanosomatid infections in species of *Apis* and *Bombus*”. Autores: Carolina Bartolomé, **María Buendía**, María Benito, Pilar de la Rúa, Concepción Ornos, Raquel Martín-Hernández, Mariano Higes, Xulio Maside.

Póster – “Trypanosomatids: a new threat for honey bee colonies?”. Autores: Mariano Higes, **María Buendía**, María Benito, Pilar García-Palencia, Laura Barrios, María Dolores Jiménez-Antón, Ana Isabel Olías-Molero, Raquel Martín-Hernández, José María Alunda, Tamara Gómez-Moracho.

XXI Congreso Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA) – Pontevedra, España, 2019

Póster – “Infección experimental de *Apis mellifera iberiensis* con tripanosomátidos: estudio anatomopatológico”. Autores: **María Buendía-Abad**, Pilar García-Palencia, María Benito, Clara Jabal-Uriel, Aránzazu Meana, José María Alunda, Cristina Botías, Raquel Martín-Hernández, Mariano Higes.

Póster – “Detección mediante RFLP-PCR de varroas resistentes a piretroides en España”. Autores: María Benito-Murcia, **María Buendía-Abad**, Cristina Botías, Aránzazu Meana, Joel González-Cabrera, Anabel Millán-Leiva, Elena Alonso-Prados, Clara Jabal-Uriel, Raquel Martín-Hernández, Mariano Higes.

Póster – “Influencia de la nutrición de las abejas en la parasitación por *Nosema ceranae* (Microsporidia)”. Autores: Clara Jabal-Uriel, María Benito, **María Buendía-Abad**, Amelia González-Porto, Cristina Botías, Mariano Higes, Raquel Martín-Hernández.

Póster – “Presencia de varroas resistentes al cumafós en diferentes zonas apícolas de la Península Ibérica”. Autores: Mariano Higes Pascual, María Benito, **María Buendía**, Clara Jabal-Uriel, Cristina Botías, Raquel Martín-Hernández, Sara Hernández-Rodríguez, Anabel Millán-Leiva, Joel González-Cabrera.

Póster – “Beeheal: monitoring microsporidia and viruses in Honeybee colonies in Spain”. Autores: Clara Jabal-Uriel, Gonzalo Moraga, Concepción Ornos, **María Buendía-Abad**, María Benito, Cristina Botías, Mariano Higes, Raquel Martín-Hernández,

Comunicación oral – “Development of fluorescent kinetoplastid cell lines and 3D X-ray microtomography for investigating spatiotemporal infection dynamics in honeybees”. Autores: Luis Miguel de Pablos, **María Buendía**, Katherine Lozano Ontiveros, Marina Salas Meliá, Antonio Osuna, Mariano Higes.

XVIII Congreso Ibérico de Entomología – Madrid, España, 2019

Póster - “Variación temporal de la prevalencia de *Nosema ceranae* y *Lotmaria passim*, dos patógenos relacionados con la pérdida de colonias de abejas”. Autores: **María Buendía-Abad**,

María Benito, Cristina Botías, Clara Jabal-Uriel, Concepción Ornos, Raquel Martín-Hernández, Mariano Higes.

Póster - "Influencia de la nutrición de las abejas en la parasitación por *Nosema ceranae* (Microsporidia) y en su producción". Autores: Clara Jabal-Uriel, **María Buendía-Abad**, María Benito, Cristina Botías, Amelia González-Porto, Aránzazu Meana, Mariano Higes, Raquel Martín-Hernández,

Comunicación oral – "Impact to neonicotinoid exposure on the ability of bumblebee queens to initiate a colony and its subsequent development". Autores: Cristina Botías, María Benito, Clara Jabal-Uriel, **María Buendía**, Raquel Martín-Hernández, Mariano Higes, Dave Goulson.

Comunicación oral – "Principales patógenos en abejorros (*Bombus* Latreille, 1802) de la península Ibérica". Autores: María Benito, Concepción Ornos, Pilar de la Rúa, Cristina Botías, Clara Jabal-Uriel, **María Buendía-Abad**, Raquel Martín-Hernández, Mariano Higes.

The British Society for Parasitology (BSP) Trypanosomiasis & Leishmaniasis Seminar – Granada, España, 2020

Póster – "Flagellar remodelling mediates attachment of kinetoplastid parasites to honeybee hindgut via hemidesmosome-like junction complexes". Autores: **María Buendía-Abad**, Luis Miguel De Pablos Torró, Pilar García-Palencia, Raquel Martín-Hernández, Antonio Osuna, Mariano Higes.

10 Congreso Nacional de Apicultura – Online, 2022

Comunicación oral – "Tripanosomátidos en *Apis mellifera*: nuevos datos de su impacto en la apicultura". Autores: **María Buendía Abad**, Raquel Martín-Hernández, Pilar García-Palencia, Tamara Gómez-Moracho, Luis Miguel de Pablos, Aránzazu Meana, Mariano Higes Pascual.

XLI Feria Apícola Internacional de Pastrana – Pastrana, España, 2022

Comunicación oral – "Tripanosomátidos en *Apis mellifera*: nuevos datos de su impacto en la apicultura". Autores: **María Buendía Abad**.

ASISTENCIA A JORNADAS Y SIMPOSIOS:

Apimondia: Honey Bee Health Symposium. New Approaches to Honey bee Health — Roma, Italia, 2019

Póster – "Trypanosomatids affect the survival of bees in experimental infections". Autores: **María Buendía-Abad**, Tamara Gómez-Moracho, Pilar García-Palencia, María Benito, María Dolores Jiménez-Antón, Ana Isabel Olías-Molero, José María Alunda, Aránzazu Meana, Raquel Martín-Hernández, Mariano Higes.

Jornada de Patología Apícola – Marchamalo, España, 2019

Comunicación oral – "Tripanosomátidos en *Apis mellifera*". Autores: **María Buendía-Abad**.

Semana de la Ciencia de Guadalajara – ¿Por qué son importantes las abejas? 18/11/2019. CEEI Guadalajara, España. Taller para niños

Seminarios de Doctorado, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. 30/05/2018. Comunicación Oral.