



ANALES

VOL. 25, DICIEMBRE 2012

**REAL ACADEMIA DE CIENCIAS VETERINARIAS
DE ANDALUCIA ORIENTAL**

© Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental

DIRECCIÓN DE LA REVISTA

RACVAO (Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental)
C/ Rector Marín Ocete, 10 • 18014 Granada
www.insacan.org/racvao.ahtml

MAQUETACIÓN:

Gráficas la Paz de Torredonjimeno, S.L.
www.graficaslapaz.net

DEPÓSITO LEGAL: J-648-2013

I.S.S.N.: 1130-2534

Imprime: Gráficas la Paz de Torredonjimeno, S.L.

VOLUMEN 25, DICIEMBRE DE 2012

ANALES

DE LA
REAL ACADEMIA DE CIENCIAS VETERINARIAS DE ANDALUCIA ORIENTAL

CONSEJO DE DIRECCIÓN DE LA REVISTA

PRESIDENTE DE HONOR:

Excmo. Sr. D. Julio Boza López

PRESIDENTE:

Excmo. Sr. D. Antonio Marín Garrido

VICEPRESIDENTE:

Ilmo. Sr. D. Alberto González Ramón
Sección de Almería

VICEPRESIDENTE

Ilmo. Sr. D. Eduardo Ruíz Villamor
Sección de Granada

VICEPRESIDENTE

Ilmo. Sr. D. José Luis Fernández Navarro
Sección de Málaga

SECRETARIO GENERAL:

Ilmo. Sr. D. Miguel Molina Galindo
Sección Granada

DIRECTORA DE PUBLICACIONES:

Ilma. Sra. D^a Catalina Gómez López
Sección Jaén

COMITÉ CIENTÍFICO

Dr. D. Aguilera Tejero, Escolastico

Dra. D^a. Arrazola Saniger, Marcelina

Dr. D. Carrasco Otero, Librado

Dr. D. Contreras Gila, Salvador

Dr.D. Galvez Del Postigo, Antonio

Dr. D. Hernandez Rodriguez, Santiago

Dr. D. Márquez Jiménez, Francisco J.

Dr. D. Moreno Fernández-Caparrós,
Luis A.

Dr. D.Palmquist Barrena, Paul

Dr. D. Ros Berruezo, Gaspar

Dr. D. Sánchez de Lollano Prieto,
Joaquín

La Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, no se responsabiliza de las opiniones expresadas por los diferentes autores.

PREVALENCIA DE LOS PRINCIPALES AGENTES PATÓGENOS DE *APIS MELLIFERA IBERIENSIS* EN LA CABAÑA APÍCOLA ESPAÑOLA

ENCARNA GARRIDO-BAILÓN^{1*}, CRISTINA BOTÍAS¹, RAQUEL MARTÍN-HERNÁNDEZ¹, AMPARO MARTÍNEZ-SALVADOR, ARÁNZAZU MEANA², MARIANO HIGES¹

RESUMEN

Las abejas melíferas son susceptibles a una amplia variedad de enfermedades y amenazas medioambientales. 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 en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello se realizó un estudio nacional durante los años 2006 y 2007. Los resultados obtenidos muestran una alta detección de *Varroa destructor* (haplotipo Coreano) y *Nosema ceranae*, una relevante prevalencia *Acarapis woodi* y una baja detección de *Nosema apis*, *Ascospaera apis*, *Paenibacillus larvae* y *Melissococcus plutonius*.

Palabras clave: abeja melífera, agente patógeno, pérdida de colonia.

ABSTRACT

Honey bees are subject to a wide variety of diseases and environmental threats. The main aim of this study was to detect those pathogens associated with honey bee losses in Spain, using the molecular techniques based on polymerase chain reaction (PCR). This national study was conducted during 2006 and 2007. The results show a high detection of *Varroa destructor* (Korean haplotype) and *Nosema ceranae*, a relevant prevalence of *Acarapis woodi* and low detection of *Nosema apis*, *Ascospaera apis*, *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius*.

Key words: honey bee, pathogen, honey bee losses.

¹Laboratorio de Patología Apícola, Centro Apícola Regional, 19180, Marchamalo, Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. E-mail: mencargaba@hotmail.com

²Departamento de Sanidad Animal, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid.

INTRODUCCIÓN

Las buenas condiciones climáticas y orográficas de España junto a una abundante y variada flora melífera han favorecido su desarrollo, ya que sin hacer grandes inversiones se obtiene un producto final de calidad. Por esa razón, la apicultura siempre ha sido considerada como una actividad complementaria que aumentaba la rentabilidad de las explotaciones agrarias. Sin embargo, la importancia de la apicultura moderna está en aumento y los nuevos apicultores adoptan las innovaciones tecnológicas que van apareciendo, transformando las explotaciones tradicionales de tipo artesanal en modernas explotaciones que industrializan la producción.

En España, el censo de colmenas ha sufrido un crecimiento del 220% en los últimos 25 años, al pasar de 1.102.000 colmenas en 1985 a 2.498.003 en 2011, lo que supone actualmente el 26% del censo reconocido de la Unión Europea (1).

Este considerable aumento de la cabaña apícola española ha sido más pronunciado a partir de la entrada en vigor del Reglamento CE 1221/97 (2) que establecía medidas destinadas a mejorar la producción y comercialización de la miel. La aplicación de este nuevo reglamento generó un incremento en la profesionalización del sector y hoy en día, el 22% de los apicultores españoles son profesionales, lo que significa que la apicultura representa para ellos la más importante o única fuente de ingresos.

En cuanto a las producciones que se obtienen de la colmena, España es el primer productor europeo de miel con más de 32.336 toneladas (1) y la producción de polen supera las 1.000 toneladas. Además ha aumentado la gama de productos obtenidos de la colmena y la jalea real, los propóleos e incluso los venenos de abeja (apitoxinas) tienen cada vez mayor demanda en el mercado.

Pese a todo, la contribución más importante que las abejas melíferas hacen a la agricultura es el servicio de polinización que proporcionan (3). Aunque no toda la polinización dependiente de animales es proporcionada por las abejas melíferas, estos insectos son los polinizadores más importantes para la mayoría de los monocultivos a nivel mundial (4).

No obstante, tanto las producciones apícolas como la polinización de cultivos pueden verse afectadas por un deficiente estado sanitario de las colonias. Por esta razón, se hace indispensable establecer un control sanitario sobre las mismas, para colocar y consolidar la apicultura dentro del sector productivo agrario que le corresponde.

Es importante recordar que las abejas melíferas son insectos sociales que no pueden vivir como individuos aislados o de forma independiente. Por esta razón,

en apicultura la unidad básica y funcional desde el punto de vista epidemiológico y productivo es la colmena, entendida como la colonia de abejas y el recipiente que las contiene (5), y los conceptos de salud y de enfermedad, como en cualquier otro animal de renta, están referidos a ella. La alteración de la salud repercute directamente en las producciones, disminuyendo su rentabilidad y en muchos casos convirtiendo a las colonias afectadas en un riesgo sanitario para otras colmenas.

La colonia de abejas melíferas es susceptible a la acción de diversos agentes nosógenos, entendidos éstos como aquellos capaces de producir daño o perjuicio en el organismo de la abeja al no reconocerlos como propios, causándole deterioro de la salud y consecuentemente, una disminución de la producción. Sin embargo para que cualquier agente llegue a desarrollar un proceso patológico, es necesario que concurren una serie de factores que predispongan o condicionen a las colonias. Asimismo no se puede hablar de enfermedad ante la sola detección de un agente nosógeno, sino que debe haber además una alteración estructural o funcional que afecte de un modo negativo al estado de bienestar.

La continua modificación del medio ambiente por acción humana ha incrementando la aparición de agentes nosógenos nuevos y el resurgimiento de otros ya existentes que repercuten negativamente en la salud de la colonia, llegando a ocasionar muchas veces una grave amenaza para la supervivencia de la misma. Además, las técnicas tradicionales de diagnóstico y control, basadas en la identificación de síntomas y alteraciones patológicas reconocibles, no permiten deducir la verdadera repercusión de algunas enfermedades.

Los principales agentes nosógenos que afectan a las abejas melíferas y que recientemente se han relacionado con el Síndrome de despoblamiento de las colmenas o *Colony Collapse Disorder* (CCD) se pueden clasificar en agentes nosógenos abióticos o patógenos de origen parasitario e infeccioso. Dentro del primer grupo destacan los ácaros *Varroa destructor* y *Acarapis woodi*; y dentro de los de origen infeccioso, los microsporidios Género *Nosema*, el hongo *Ascosphaera apis*, y las bacterias *Paenibacillus larvae* y *Melissococcus plutonius*. Aunque en los últimos años los residuos de pesticidas (agentes nosógenos abióticos) también se han relacionado con la pérdida de colonias (6), principalmente la imidacloprida (Gaucho®) y el fipronil (Regent®), un estudio reciente (7) descarta esta relación en nuestro país, al observar una baja prevalencia de fipronil e incluso ausencia de imidacloprida durante los años 2006 y 2007.

En la actualidad, los centros especializados en el estudio de las patologías apícolas son insuficientes. Por ello, no se dispone de datos oficiales sobre prevalencias

que permitan evaluar sus repercusiones reales ni el impacto sobre sus producciones (miel, polen, cera, jalea real, etc.), en gran medida debido a la falta de sensibilidad y reproducibilidad de las tradicionales técnicas diagnósticas propuestas por la Oficina Internacional de Epizootias (8).

En este contexto nos planteamos la realización de un estudio epidemiológico que permitiese determinar la prevalencia real de los agentes patógenos involucrados en el fenómeno.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio transversal: Prevalencia y distribución de los agentes patógenos en España

Se preparó un estudio transversal y se programó una toma de muestras durante las estaciones de primavera y otoño de los años 2006 y 2007, dado que en estos periodos se produce la mayor prevalencia de los principales agentes patógenos que afectan a las colonias de abejas melíferas en España.

El número de muestras que se debían obtener para que los resultados fueran significativos, se calculó en base a la información general del servicio de diagnóstico del Centro Agrario de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (CA), teniendo en cuenta una prevalencia estimada de la pérdida de colonias del 40%, un error aceptado del 10%, un nivel de confianza del 95%, el censo de apicultores y su distribución por comunidad autónoma (1). Asimismo, la elección de la colmena centinela (unidad epidemiológica) fue de forma aleatoria y las muestras recogidas por colmena, por los propios apicultores y/o veterinarios fueron: abejas adultas, cría, miel, polen y cera.

1.1. *Varroa destructor*

La detección de este ácaro se hizo por inspección visual de muestras abejas adultas y de cría.

Determinación haplotipo *V. destructor*: Hasta el momento, sólo dos de los seis haplotipos de *V. destructor* han conseguido infestar y reproducirse en *A. mellifera* (9): el coreano (K) y japonés/thailandés (J), siendo el haplotipo K el más prevalente (10). Para determinar el haplotipo, se seleccionaron aleatoriamente un total de 570 hembras de *Varroa*, se extrajeron los ácidos nucleicos de los ácaros mediante un método con Chelex (11) modificado, y se realizó el método de PCR-RFLP descrito por Anderson y

Fuchs (9). Brevemente consiste en amplificar un fragmento del gen COI de *V. destructor* y someterlo a una digestión con las enzimas de restricción *XhoI* y *SacI*.

1.2. *Acarapis woodi*

Acarapis woodi es un ácaro del aparato respiratorio de las abejas adultas y la técnica seleccionada para su detección en este estudio fue la propuesta por Garrido-Bailón y col., (12) que consiste en una amplificación de un fragmento del gen COI de *A. woodi* mediante la técnica PCR y una posterior secuenciación de los productos amplificados.

1.3. Género *Nosema*

Para la determinación de los dos microsporidios que afectan a *A. mellifera*, *Nosema apis* y *Nosema ceranae*, se empleó una PCR múltiple que consigue detectar los dos agentes patógenos en una sola reacción (13).

1.4. *Ascospaera apis*, *Paenibacillus larvae* y *Melissococcus plutonius*

El hongo *A. apis* y las bacterias *P. larvae* y *M. plutonius* son los principales agentes infecciosos que afectan al aparato digestivo de la cría de abeja melífera y para su detección se empleó una PCR múltiple (pendiente de publicación) que permite detectar los tres agentes en una única reacción. Los cebadores específicos para *A. apis* y *M. plutonius* desarrollados por nuestro equipo junto con los diseñados por Govan y col. (14), amplifican con éxito fragmentos de diferente tamaño fácilmente discriminables en un gel de agarosa.

1.5. Clasificación bioclimática de España

Para el estudio de la posible relación entre la presencia de agentes patógenos y las características bioclimáticas de España, se utilizó la clasificación de los pisos bioclimáticos descritos por Rivas-Martínez (15) disponibles en la página web del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. En la clasificación y mapas elaborados por dicho autor (disponibles en <http://www.magrama.gob.es/es/>) se consideran pisos bioclimáticos cada uno de los tipos o grupos de medios que se suceden en una zonación altitudinal y que en la práctica se delimitan en función de las biocenosis y factores climáticos cambiantes.

1.6. Análisis estadístico de los datos

Cada colmena muestreada se localizó geográficamente (coordenadas X e Y declaradas bien directamente por el apicultor o bien buscando en el SIGPAQ (<http://sigpac.mapa.es/feqa/visor/>) el municipio en el que se declaraba que se encontraba el colmenar. La distribución de los patógenos se relacionó con la ubicación del colmenar y la información de los pisos climáticos arriba mencionados y se procesó con el programa *Geographical Information Systems*, v. 9.0. La distribución en los agentes patógenos identificados y sus prevalencias se compararon mediante una prueba de Chi² de Pearson (χ^2).

RESULTADOS

Estudio transversal: Prevalencia y distribución de los patógenos en España

2.1. *Varroa destructor*

Después de analizar 570 hembras de *Varroa* del año 2006, se comprobó que todas ellas pertenecían al haplotipo K, incluyendo muestras de las Islas Baleares y Canarias.

Prevalencia nacional: Se analizaron un total de 1954 abejas adultas y 1859 de cría. La muestra se consideró positiva siempre que las abejas adultas y/o la cría presentaron ácaros de *Varroa*.

La prevalencia obtenida para *V. destructor* en el año 2007 fue significativamente superior a la del año anterior ($\chi^2=7,98$; $p<0.05$, Tabla 1). Asimismo, teniendo en cuenta la prevalencia estacional, se observa que la presencia de dicho ácaro fue significativamente superior en otoño de los dos años de estudio (prim/ot '06 $\chi^2=72,8$; $p<0.05$; prim/ot '07 $\chi^2=59,2$; $p<0.05$).

Tabla 1. Prevalencia de *V. destructor* en los años 2006 y 2007

Año	n	Prevalencia Anual (%)	IC _{95%}		Prevalencia Estacional (%)	IC _{95%}		
			Inf	Sup		Inf	Sup	
2006	1094	43,7	40,7	46,7	Primavera	32,8	29,1	36,5
					Otoño	58,7	54,1	63,3
2007	860	50,1	46,7	53,5	Primavera	40,3	36,1	44,6
					Otoño	65,5	60,2	70,7

V. destructor se detectó al menos una vez en todas las regiones incluidas en el estudio, siendo la prevalencia significativamente superior en los pisos montano y supramediterráneo (Tabla 2), que corresponden a las regiones más frías de España, donde los períodos de heladas son más largos (10 meses al año). Sin embargo, *V. destructor*, también se detectó en un alto porcentaje en áreas más calientes del país, donde el clima tiende a ser más seco que en las zonas septentrionales.

Tabla 2. Distribución de *V. destructor* en los pisos climáticos clasificados por Rivas Martínez (15)

Piso climático	n	positivos	Prevalencia (%)	χ^2	<i>p</i>	χ^2	<i>p</i>
Mesomediterráneo (H)	338	115	34,0	-	-	-	-
Termomediterráneo (I)	173	60	34,7	0,0	0,9009*	0,02	0,9009
Colino (D)	169	70	41,4	2,6	0,1080*	1,65	0,1993**
Supramediterráneo(G)	263	121	46,0	8,7	0,0031*	0,88	0,3487***
Montano (C)	228	137	60,1	37,8	0,0000*	10,1	0,0015****

* Prevalencia de *V. destructor* en cada piso climático comparado con el nivel más bajo (Mesomediterráneo, H).

** Prevalencia de *V. destructor* en el piso climático Colino (D) comparado con el Termomediterráneo (I).

*** Prevalencia de *V. destructor* en el piso climático Supramediterráneo (G) comparado con Colino (D).

**** Prevalencia de *V. destructor* en el piso climático Montano (C) comparado con Supramediterráneo (G). Los datos en negrita representan diferencias significativas

2.2 *Acarapis woodi*

La presencia de *A. woodi* se detectó en 274 muestras de un total de 1943 colmenas muestreadas durante los años 2006 (13%) y 2007 (15,5%), no encontrándose diferencias significativas entre los dos años de muestreo ($\chi^2=2,31$; $p > 0.05$). Al evaluar la prevalencia estacional, se detectó que la prevalencia de otoño de cada año (Tabla 3) fue significativamente más alta en comparación la primavera del año correspondiente (prim/ot '06 $\chi^2=5,86$; $p < 0.05$; prim/ot '07 $\chi^2=7,57$; $p < 0.05$).

Tabla 3. Prevalencia de *A. woodi* en los años 2006 y 2007

Año	n	Prevalencia Anual (%)	IC _{95%}		Prevalencia Estacional (%)	IC _{95%}		
			Inf	Sup		Inf	Sup	
2006	1089	13,0	10,9	15,1	Primavera	11,0	8,4	13,5
					Otoño	15,9	12,5	19,4
2007	854	15,5	12,9	17,9	Primavera	12,7	9,8	15,7
					Otoño	19,8	15,3	24,2

Al igual que sucedió con *V. destructor*, *A. woodi* se detectó al menos una vez en todas las regiones incluidas en el estudio, siendo la prevalencia significativamente superior en las regiones más frías de España (pisos montano y supramediterráneo) (Tabla 4), aunque también se detectó en zonas más calientes del país.

Tabla 4. Distribución de *A. woodi* en los pisos climáticos clasificados por Rivas Martínez (15)

Piso climático	n	positivos	Prevalencia (%)	χ^2	p	χ^2	p
Mesomediterráneo (H)	338	27	8,0	-	-		
Termomediterráneo (I)	173	21	12,1	2,4	0,1253*	-	-
Colino (D)	169	22	13,0	3,3	0,0689*	0,06	0,8054**
Montano (C)	228	35	15,4	7,5	0,0062*	-	-
Supramediterráneo(G)	263	47	17,9	13,4	0,0003*	0,58	0,4454***

* Prevalencia de *A. woodi* en cada piso climático comparado con el nivel más bajo (piso climático H)

** Prevalencia de *A. woodi* en el piso climático D comparado con el piso climático I

*** Prevalencia de *A. woodi* en el piso climático G comparado con el piso climático C.

Los datos en negrita representan diferencias significativas

2.3. Género *Nosema*

La especie de microsporidios que más frecuentemente infectó a las abejas melíferas en España durante 2006-2007 fue *N. ceranae* (Tabla 5). Esta especie se encuentra en más del 40% de las colonias muestreadas en los dos años estudiados, tanto en primavera como en otoño, y sin diferencias entre cualquiera de los periodos estudiados (χ^2 , $p > 0,05$).

Tabla 5. Prevalencia de *N. ceranae* en los años 2006 y 2007

Año	n	Prevalencia Anual (%)	IC _{95%}		Prevalencia Estacional (%)	IC _{95%}		
			Inf	Sup		Inf	Sup	
2006	1084	44,9	41,9	47,9	Primavera	46,4	42,4	50,4
					Otoño	42,5	37,9	47,2
2007	854	45,8	42,3	49,2	Primavera	47,3	43	51,7
					Otoño	43,5	38,0	49,0

Por el contrario, *N. apis* fue menos frecuente y nunca se encontró con una prevalencia superior al 15% (Tabla 6). Por otra parte, la prevalencia de esta especie en la primavera de 2006 fue significativamente mayor que en la primavera de 2007 (χ^2 , $p < 0,05$), aunque fue similar en otoño de ambos años (χ^2 , $p > 0,05$). La co-infección de los microsporidios se observó también, pero siempre por debajo del 7% y con una prevalencia similar en todas las estaciones de muestreo (χ^2 , $p > 0,05$).

Tabla 6. Prevalencia de *N. apis* en los años 2006 y 2007

Año	n	Prevalencia Anual (%)	IC _{95%}		Prevalencia Estacional (%)	IC _{95%}		
			Inf	Sup		Inf	Sup	
2006	1084	12,8	10,8	14,8	Primavera	14,6	11,8	17,5
					Otoño	10,4	7,4	13,3
2007	849	9,4	7,4	11,4	Primavera	8,2	5,7	10,6
					Otoño	11,2	7,7	14,8

En relación a la distribución de *Nosema* spp. en España (Tabla 7), *N. ceranae* fue significativamente más alta (χ^2 , $p < 0,05$) en áreas más calientes de España (en los pisos mesomediterráneo y termomediterráneo) que los cálidos o más fríos.

Tabla 7. Distribución de *N. ceranae* en los pisos climáticos clasificados por Rivas Martínez (15)

Piso climático	n	positivos	Prvalencia (%)	χ^2	P	χ^2	P
Montano (C)	301	105	39,4	-	-		
Supramediterráneo(G)	454	171	37,7	0,60	0,4371*	-	-
Colino (D)	191	80	41,9	2,44	0,1181*	1,01	0,3156**
Mesomediterráneo (H)	492	274	55,7	32,40	0,0000*	-	-
Termomediterráneo (I)	256	145	56,6	139,81	0,0000*	0,06	0,839***

* Prevalencia de *N. ceranae* en cada piso climático comparado con el nivel más bajo (piso Montano, C)

** Prevalencia de *N. ceranae* en el piso climático D comparado con el piso climático G

*** Prevalencia de *N. ceranae* en el piso climático I comparado con piso climático H

Los datos en negrita representan diferencias significativas

Por el contrario, *N. apis* parece seguir un gradiente decreciente de prevalencia y la menor prevalencia se encontró en los pisos bioclimáticos colino y termomediterráneo que se corresponden con zonas con menor número de meses con heladas (alrededor de 3 meses por año) (Tabla 8).

Tabla 8. Distribución de *N. apis* en los pisos climáticos clasificados por Rivas Martínez (15)

Piso climático	n	positivos	Prevalencia (%)	χ^2	p	χ^2	p
Colino (D)	191	6	3,14	-	-		
Termomediterráneo (I)	256	16	6,25	2,26	0,1328*	-	-
Mesomediterráneo (H)	492	48	9,76	8,27	0,0040*		
Montano (C)	301	47	15,61	18,91	0,0001*	-	-
Supramediterráneo(G)	454	79	17,40	23,89	0,0000*	0,42	0,5192**

* Prevalencia de *N. apis* en cada piso climático comparado con el nivel más bajo (piso climático D)

** Prevalencia de *N. apis* en el piso climático G comparado con el piso climático C

Los datos en negrita representan diferencias significativas

2.4. *Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae* y *Melissococcus plutonius*

La prevalencia de los agentes infecciosos de la cría en las abejas melíferas se detectó en un bajo porcentaje durante los años del estudio.

Tabla 9. Prevalencia de *A. apis* en los años 2006 y 2007

Año	n	Prevalencia Anual (%)	IC _{95%}		Prevalencia Estacional (%)	IC _{95%}		
			Inf	Sup		Inf	Sup	
2006	918	4,4	2,9	5,7	Primavera	4,8	3,0	6,6
					Otoño	3,7	1,5	5,8
2007	761	2,0	0,9	3,0	Primavera	1,8	0,5	3,1
					Otoño	2,3	0,3	4,3

La prevalencia de *A. apis* en el año 2007 se redujo significativamente al compararla con la del año anterior ($\chi^2=7,48$; $p < 0.05$) ya que los dos muestreos del 2006 resultaron de mayor prevalencia que los del año 2007 (prim'06/prim'07 $\chi^2=7,3$; $p < 0.05$; ot'06/ot'07 $\chi^2=0,9$; $p \geq 0.05$). Sin embargo, en ninguno de los dos años se encuentra diferencia entre los muestreos de primavera y otoño (prim/ot '06 $\chi^2=0,6$; $p \geq 0.05$; prim/ot '07 $\chi^2=0,2$; $p \geq 0.05$) (Tabla 9).

Asimismo, la presencia de *A. apis* fue más frecuente en las áreas más calientes (pisos meso- y termomediterráneo) tal como se observa en la Tabla 10.

Tabla 10. Distribución de *A. apis* en los pisos climáticos clasificados por Rivas Martínez (15)

Piso climático	n	positivos	Prevalencia (%)	χ^2	<i>p</i>	χ^2	<i>p</i>
Supramediterráneo (G)	263	3	1,1	-	-		
Montano (C)	228	5	2,2	0,7	0,4129*		
Colino (D)	169	6	3,6	1,2	0,2804*		
Mesomediterráneo (H)	338	17	5,0	4,2	0,0228*	-	-
Termomediterráneo (I)	173	12	6,9	7,0	0,0081*	0,69	0,6042**

* Prevalencia de *A. apis* en cada piso climático comparado con el nivel más bajo (piso climático G)

** Prevalencia de *A. apis* en el piso climático I comparado con el piso climático H

Los datos en negrita representan diferencias significativas

Por otro lado, la prevalencia de *P. larvae* en el año 2007 fue estadísticamente superior a la de 2006 ($\chi^2=7,92$; $p < 0.05$) (Tabla 11). El muestreo de primavera de ese año resultó de mayor prevalencia que el del 2006 (prim'06/prim'07 $\chi^2=6,3$; $p < 0.05$) mientras que los dos muestreos de otoño resultaron similares (ot'06/ot'07 $\chi^2=1,7$; $p \geq 0.05$). Y al igual que sucedía con *A. apis*, en ninguno de los dos años se encuentra diferencia entre los muestreos de primavera y otoño (prim/ot 2006 $\chi^2=0,00$; $p \geq 0.05$; prim/ot 2007 $\chi^2=0,4$; $p \geq 0.05$).

Tabla 11. Prevalencia de *P. larvae* en los años 2006 y 2007

Año	n	Prevalencia Anual (%)	IC _{95%}		Prevalencia Estacional (%)	IC _{95%}		
			Inf	Sup		Inf	Sup	
2006	918	1,5	0,7	2,3	Primavera	1,6	0,5	2,6
					Otoño	1,5	0,5	3,6
2007	761	3,7	2,3	5,1	Primavera	4,2	2,3	6,0
					Otoño	3,2	0,8	5,5

A pesar de que el porcentaje de *P. larvae* detectado en nuestro país fue bajo, es estadísticamente más prevalente en el piso climático colino (Tabla 12).

Tabla 12. Distribución de *P. larvae* en los pisos climáticos clasificados por Rivas Martínez (15)

Piso climático	n	positivos	Prevalencia (%)	χ^2	<i>p</i>	²	<i>p</i>
Supramediterráneo (G)	263	3	1,1				
Mesomediterráneo (H)	338	4	1,2	0,0	0,8419*		
Montano (C)	228	3	1,3	0,1	0,7473*		
Termomediterráneo (I)	173	5	2,9	0,5	0,4619*		
Colino (D)	169	11	6,5	5,9	0,0152*		

* Prevalencia de *P. larvae* en cada piso climático comparado con el nivel más bajo (piso climático G). Los datos en negrita representan diferencias significativas.

En relación a la prevalencia de *M. plutonius*, se situó en todos los muestreos por debajo del 1%, siendo similares en los dos muestreos del año 2006 (prim/ot '06 $\chi^2=0,2$; $p \geq 0.05$) y en los del año 2007 (prim/ot '07 $\chi^2=0,5$; $p \geq 0.05$). Lo mismo sucede al comparar las prevalencias de las primaveras y los otoños de ambos (prim'06/prim'07 $\chi^2=0,7$; $p \geq 0.05$; ot'06/ot'07 $\chi^2=0,8$; $p \geq 0.05$). Y en cuanto a su distribución en función de las zonas climáticas en las que está dividida España, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

DISCUSIÓN

La sanidad de las abejas melíferas se ha convertido en un tema de actualidad apareciendo en los medios de comunicación desde los primeros años del siglo XXI y atrayendo mucha atención tanto desde comunidades científicas como del público en general, debido a las importantes pérdidas de colonias de abejas denunciadas en la práctica totalidad del planeta. El interés despertado por estos peculiares insectos se debe al importante papel que juegan tanto en la polinización y equilibrio de los ecosistemas, como en la producción de productos únicos como la miel o la jalea real. Aunque hay quien ha sugerido que la humanidad no sobreviviría durante mucho tiempo una vez que las abejas desaparecieran, ese extremo no tiene una base científica sólida ya que la producción de alimentos no es totalmente dependiente de la polinización apícola (insectos, pájaros, murciélagos) (16).

No obstante, las abejas son susceptibles a una amplia variedad de enfermedades y amenazas medioambientales, algunas de las cuales han aumentado significativamente en los últimos 5 a 10 años (16), y por ello se planteó un estudio epidemiológico

cuyo objetivo principal era identificar aquellos agentes patógenos relacionados con las pérdidas de colonias de abejas melíferas en España.

Tradicionalmente el diagnóstico de los agentes patógenos de las abejas melíferas recomendados por la OIE (8) se ha limitado al examen macroscópico (*V. destructor*), a la disección de la abeja (*A. woodi*), a la observación microscópica de esporas (*N. apis* y *N. ceranae*) o al cultivo microbiológico del agente infeccioso (*A. apis*, *P. larvae* y *M. plutonius*). Estas tareas, además de tediosas, consumen mucho tiempo ya que exigen el examen individual de un gran número de abejas y/o larvas y su resultado depende en gran medida de la habilidad y formación del operador. Con las técnicas moleculares utilizadas en este trabajo, se pueden detectar los agentes patógenos aún cuando la enfermedad no se ha manifestado. Esto las convierte en una poderosa herramienta a la hora de adoptar medidas profilácticas ya que estas enfermedades son a menudo perjudiciales no sólo para aquellas colonias que las padecen sino también para las colonias vecinas que se pueden infectar rápidamente.

Éste es el primer estudio que se realiza en España con un número tan elevado de muestras, con el fin de evaluar la presencia de los principales agentes patógenos que afectan a la cabaña apícola y aporta los primeros datos fiables sobre la prevalencia real de los mismos. Con este objetivo se realizó un estudio a nivel nacional durante los años 2006 y 2007 en el que se muestreó un número significativo de explotaciones apícolas de nuestro país.

En cuanto a los agentes patógenos analizados, cabe destacar la alta detección de *V. destructor* en colonias de abejas melíferas en todas las zonas geográficas españolas durante los años de muestreo. La importancia de este parásito radica en que afecta a todas las fases de desarrollo de las abejas siendo actualmente la varroosis una enfermedad de comunicación semestral a la UE (17).

La escasez de estudios a nivel nacional en igualdad de condiciones a las nuestras (número de muestras, métodos de detección, condiciones climatológicas, etc.), no permite hacer comparaciones en términos absolutos de nuestros datos con los de otros países, sin embargo algunas investigaciones realizadas en diferentes partes del mundo (18,19), coinciden con el alto grado de parasitación de las abejas melíferas por *V. destructor*. Las altas prevalencias detectadas en Jordania (100%, 19) y Turquía (90%, 18), responden más a que la varroosis es una enfermedad endémica en esas zonas, que a la epidemia de un parásito altamente contagioso como se sugirió anteriormente (20).

Asimismo, el análisis de los datos obtenidos sugiere un incremento a corto plazo en la prevalencia de *V. destructor* en España durante el periodo en estudio, siendo más

alta durante las estaciones de otoño (> 58%). Este hecho posiblemente sea debido a que en otoño los apicultores realizan los tratamientos acaricidas contra este parásito, lo que puede indicar que o bien la muestra fue tomada antes del tratamiento o bien hubo fallos en el control del ácaro lo que implicaría la necesidad de realizar otro tratamiento la primavera siguiente.

Por otro lado, éste también es el primer trabajo fuera de Asia (21, en China; 10 en Java e Indonesia), en el que se hace un estudio del haplotipo de *Varroa* con un número significativo de muestras. Se comprobó que todas las muestras de *Varroa* analizadas, pertenecieron al haplotipo K (más patógeno y virulento) incluyendo muestras de las Islas Baleares y Canarias, lo que confirma la expansión mundial del haplotipo coreano sugerida anteriormente (10).

Varroa destructor parece ser un factor crucial de las pérdidas periódicas de colonias de abejas e incluso, algunos autores lo han relacionado con los recientes problemas de despoblamiento de colmenas a través de los EE. UU. y varios países europeos (3, 22). Nguyen y col. (23) apoyan esta conexión ya que después de estudiar casos recientes de pérdidas de colonias y encontrar acaricidas prohibidos o inefectivos contra *V. destructor*, concluyeron que los tratamientos usados comúnmente por los apicultores a menudo son inadecuados para el control del ácaro.

Otro de los patógenos detectados que se ha asociado a altos niveles de mortalidad de abejas y consiguientes pérdidas económicas es *Acarapis woodi*. Desde su detección en 1919 en la Isla de Wight (Gran Bretaña) y posterior difusión a Europa, ha alcanzado una distribución mundial (24), causando otra de las enfermedades reguladas por la UE, la acarapisosis (17). Durante la última década, los problemas ocasionados por *A. woodi* han sido prácticamente inexistentes, o al menos no se han declarado o se han subestimado a pesar de la escasez de estudios sobre su incidencia real en la apicultura europea.

Nuestros resultados muestran una prevalencia relevante de *A. woodi* en colonias de abejas melíferas en todas las áreas geográficas españolas, incluyendo aquellas regiones con unas condiciones climatológica y teóricamente no tan óptimas para el desarrollo de *A. woodi*. Estos datos son muy diferentes a los obtenidos en estudios anteriores donde la falta de detección de *A. woodi* (18) y la baja prevalencia observada (2,7%, 19), son probablemente debidos a la utilización de una metodología (observación directa del parásito bajo microscopio) con menor fiabilidad que la técnica molecular empleada en este trabajo. Por otro lado, Bacandritsos y Saitanis (25) sugieren una disminución a largo plazo en la incidencia de *A. woodi* en Grecia durante el periodo de 1986 a 1995 con una prevalencia más alta durante el otoño y menor durante los períodos secos y

calurosos (verano), descrita previamente (26), y sugiere además, que la acarapisosis se autocuró en condiciones experimentales. En nuestro estudio, más restrictivo en duración (2 años *vs* 9 años), no se aprecian estas claras diferencias estacionales pese a que *A. woodi* fue ligeramente más prevalente durante el otoño debido quizás, a la coincidencia con la época reproductiva del ácaro (27).

A pesar de que los brotes clínicos de acarapisosis no son frecuentes en ninguna de las áreas de nuestro país según los datos obtenidos en nuestro estudio, la detección de ácaros es una prueba de que están todavía presentes pero aparentemente no se detectan por los métodos de diagnóstico clásicos. En este sentido, la financiación del Programa Nacional Apícola, entre cuyos objetivos está el control de la varroosis, puede haber favorecido indirectamente el control de la acarapisosis, debido a la aplicación regular de acaricidas de las colonias de abejas.

Si se compara el papel de *Acarapis* con los efectos bien conocidos de otros factores como *Varroa* o *Nosema*, es obvio que actualmente se ha descuidado el estudio de *Acarapis* y aunque los resultados obtenidos en este trabajo aumentan el conocimiento de este parásito y puede ayudar a un mejor entendimiento de la interacción entre patógenos, se requieren más estudios para aclarar el papel real de *A. woodi* en la pérdida de colmenas.

Debido a las repercusiones sanitarias y económicas que las nosemosis tienen en la cabaña apícola, se hace imprescindible un diagnóstico diferencial entre los agentes patógenos, *N. apis* y *N. ceranae*, responsables de nosemosis tipo A y tipo C respectivamente (28).

Cuando se estudió la infección por *Nosema* spp. a escala nacional, la prevalencia media obtenida para *N. ceranae* en primavera y otoño en el período de dos años que duró el muestreo estuvo alrededor del 45% (solo o en co-infección), mostrando una amplia dispersión y mayor proporción que *N. apis*. Esta alta prevalencia de *N. ceranae* es un hecho frecuente en todo el mundo (3, 29, 30). Por el contrario, la detección de *N. apis* fue menor, presentándose alrededor del 15% de todas las muestras analizadas tal como se había descrito anteriormente (31, 32). Estos datos podrían apoyar la hipótesis de que la colonización de *A. mellifera* debido a la distribución de *N. ceranae* puede ser responsable de un aumento en la detección de las nosemosis en nuestro país (33), aunque esta situación no es universal y estudios realizados en Alemania (34) indican que *N. apis* es más prevalente que *N. ceranae*.

La diferencia en las prevalencias declaradas para ambos microsporidios en los distintos países es relevante. Mientras que en algunos la prevalencia de *N. ceranae* es

considerada muy alta (3, 29, 30, 35, 36), siendo en ocasiones identificada como la única o mayoritaria infección de *A. mellifera*; en otros países, la presencia de este microsporidio parece ser mucho más baja (34, 37, 38). Esto podría ser debido a la reciente introducción de *N. ceranae* en el país en algún caso (36), a las diferentes condiciones climáticas (34, 37) o al manejo de las abejas, así como a las diferencias en la patogenicidad del haplotipo (39), el tipo de abejas muestreadas o a otros factores todavía desconocidos.

Asimismo, las significativas diferencias encontradas en este estudio en la distribución para ambas especies de *Nosema*, muestran que tienen preferencias distintas por las condiciones climáticas. En este sentido, *N. ceranae* parece tener predilección por áreas más calientes y *N. apis* parece preferir zonas con temperaturas más suaves o frías. Los factores que podrían explicar estas diferencias pueden estar relacionadas no sólo con la climatología (temperatura y humedad) de los años 2006 y 2007, (extremadamente calurosos y secos, <http://www.aemet.es>) o altitud, que tiene un efecto directo en la flora de cada región, si no también con las prácticas apícolas (como la trashumancia o los diferentes tipos de colmena usados en España: Layens o Perfección), linajes de *A. mellifera* en la Península Ibérica (*N. apis* fue más prevalente en el linaje M que en el linaje A en 2006, no encontrándose estas diferencias en la prevalencia de *N. ceranae*, 40) o incluso una mezcla de todos estos factores.

Esta diferencia en la prevalencia de ambos microsporidios ha llevado a pensar que *N. ceranae* está desplazando a *N. apis* (30, 37, 41, 42, 43). Sin embargo, nuestros datos sugieren que la situación de *N. apis* en España es endémica con una prevalencia esperable (31, 32) dadas las condiciones climatológicas y ambientales de nuestro país, mientras que *N. ceranae* responde más a una situación epidémica cuya prevalencia ha incrementado rápidamente en un breve período de tiempo (seis años) por la patogenicidad y alta capacidad de difusión del parásito. Esto es probablemente debido al salto a un nuevo hospedador, *A. mellifera*, desde su hospedador inicial *A. cerana*, en el que la prevalencia no es superior al 5% (44). Un precedente en el mundo de la apicultura fue el caso de *V. destructor*, originalmente asociado con *A. cerana* que consiguió parasitar una nueva especie, *A. mellifera* y distribuirse mundialmente para llegar a ser una de las mayores amenazas para la apicultura (45). No obstante, deben realizarse otros estudios que incluyan regiones más amplias del mundo que confirmen este patrón diferente de la distribución de *Nosema* spp.

Los resultados obtenidos en el estudio nacional para la detección de los principales agentes patógenos de origen infeccioso de la cría de abeja: *P. larvae*, *M. plutonius* y *A. apis*, indican una baja prevalencia para los agentes patógenos de origen infeccioso que afectan a la cría de las abejas. En el caso de *A. apis* no superó en ningún muestreo

el 5%, en el de *P. larvae* se mantuvo siempre por debajo del 3% y en el caso de *M. plutonius*, la prevalencia no alcanzó en ningún momento el 1%.

La baja prevalencia de *A. apis* a lo largo de los dos años del estudio, significativamente menor en 2007 (2%) que en 2006 (4,4%), contrasta con la detectada en otros países como Japón (24,1%, 38), en el verano de 2009. Asimismo, es sorprendente el hecho de que se haya detectado una mayor prevalencia en las zonas más calidas de España (pisos climáticos meso- y termomediterráneos) cuyas características climáticas no beneficiaría en principio el crecimiento del hongo. El desarrollo de *A. apis* se ve favorecido por la alta humedad combinada con temperaturas ligeramente frías (46, 47) e incluso se ha demostrado que el calentamiento artificial de la colmena en primavera, disminuía la incidencia de la enfermedad (48).

Además de las condiciones medioambientales, otros factores como diferencias en las cepas fúngicas y los factores genéticos de las abejas pueden afectar la incidencia y severidad de la enfermedad (49) y justificar la baja prevalencia encontrada en nuestro país.

Por otro lado, *P. larvae* es considerada una gran amenaza para las abejas melíferas por el significativo descenso que ocasiona en el número de colonias afectadas (16). A pesar de que la patología provocada por esta bacteria avanza de forma progresiva en las colmenas afectadas, pudiendo aparecer en cualquier época del año y llegando a destruir las colonias de abejas infectadas en pocos meses o años (16, 50), los resultados obtenidos en este estudio indican un bajo porcentaje de *P. larvae* en España durante los años de estudio siendo estadísticamente superior en el piso climático Colino caracterizado por temperaturas suaves en invierno.

La detección de *M. plutonius* se limita a casos puntuales. Diversos estudios realizados en otros países europeos como Suiza (51, 52) y Gran Bretaña (53, 54) en los que se utilizaron técnicas de diagnóstico molecular, confirman que la loque europea es endémica en estas regiones, situación que dista bastante de la detectada en España durante 2006 y 2007.

No obstante, el global de los datos obtenidos en relación a los patógenos de origen infeccioso de la cría responde más bien a la aparición de estas patologías como algo puntual y secundario a patógenos más prevalentes. La existencia de muestras que presentan diferentes patógenos a la vez (*V. destructor* y *N. ceranae*) apoyarían esta hipótesis, situando a estos agentes como causantes de la debilidad e inmunosupresión de la colonia (55) que podría ser aprovechada por este tipo de agentes infecciosos.

El fenómeno mundial de la pérdida de colonias de abejas está probablemente provocado por diferentes causas que producen síntomas similares a través de acciones sinérgicas entre diferentes agentes. Y si bien una de las causas sugeridas y que se ha estudiado en profundidad es la posible acción de ciertos pesticidas para las abejas, especialmente la imidacloprida o el fipronil, los cuales son frecuentemente usados para tratar semillas de maíz y girasol (23, 56), el estudio llevado a cabo en España por Bernal y col. (7) en los mismos años que el que aquí se presenta indica que los acaricidas aplicados en los tratamientos para varroosis son los compuestos más frecuentemente detectados, destacando entre ellos el fluvalinato (principio activo del Apistan®) y el clorfenvinfós (principio activo del Supona®), y observando una baja prevalencia de fipronil e incluso ausencia de imidacloprida.

Como se ha comentado anteriormente, *V. destructor* es uno de los patógenos más importantes de las abejas (10) y la supervivencia de las colmenas infestadas por este ácaro depende de la intervención de los apicultores, porque una colonia en la que no se controla esta parasitosis, puede sucumbir a la acción del ácaro después de sostener la infestación durante varios años (57). Así, la varroosis es sistemáticamente tratada en todo el mundo con acaricidas sintéticos, tales como el fluvalinato (Apistan®), flumetrina (Bayvarol®) amitraz (Apivar®), cumafós (Perizin®, Checkmite+®), acrinatrina y clorfenvinfós (Supona®).

A la vista de los resultados, es imposible identificar un único factor que por sí solo de cuenta de las pérdidas de colonias en todas las regiones del mundo durante un período de tiempo determinado. Está claro que varios factores biológicos y medioambientales actúan solos o en combinación dando el potencial para causar mortalidad prematura de colonias al afectar adversamente a la salud de las abejas y a su vida media. Las razones dadas para explicar este fenómeno, incluyen el uso de pesticidas (6), nuevas enfermedades (3, 16, 58, 59), estrés, manejo apícola y una combinación de todos esos factores. Asimismo el cambio climático también repercute en la muerte de las colonias ya que contribuye al desequilibrio entre las abejas, la flora circundante y los patógenos (60). Las causas que provocan el fenómeno mundial de las pérdidas de colonias producen en muchas ocasiones signos clínicos similares. Los rasgos típicos de debilidad, despoblación o muerte son los mismos entre diferentes agentes patógenos y las técnicas clásicas de diagnóstico no permiten obtener datos concluyentes.

Actualmente se considera a *N. ceranae* un importante patógeno debido a su alta prevalencia en la última década (33, 42) además de ser el agente etiológico de la enfermedad emergente de *A. mellifera*, Nosemosis tipo C (28, 61). Los datos obtenidos en este estudio permiten afirmar que *N. ceranae* es un patógeno que actúa a corto

plazo en los individuos de la colonia (41, 43, 62) y a largo plazo para el conjunto de la colonia (58, 63). La alta prevalencia detectada lo sitúa en un primer plano dentro de las posibles causas de pérdidas de colonias de las abejas. Asimismo, *V. destructor*, causante de una de las plagas mejor conocidas de *A. mellifera*, puede causar pérdidas similares y actuar como un agente re-emergente si no se controla adecuadamente. Una combinación de ambos agentes patógenos, asociados a otros de menor importancia como *N. apis* y *A. woodi*, podrían aprovechar la deficiencia inmunitaria provocada por los primeros (55) e incrementar la probabilidad de muerte de colonias infectadas sin que los pesticidas ejerzan un efecto significativo ya que los bajos niveles de residuos detectados en polen (7), sugiere que aquellos productos u otros agrotóxicos comúnmente usados en España no están directamente relacionados con el problema generalizado de las pérdidas de colonias de abejas.

En definitiva, ya que los humanos somos los responsables de las continuas modificaciones ambientales a las que se ven sometidas las abejas, también nosotros tenemos la obligación moral de tomar medidas de conservación para proteger y prevenir las pérdidas de estos insectos tan especiales. Para entender los factores que contribuyen a la desaparición de las abejas, será necesario realizar más investigaciones orientadas al estudio de las causas de mortalidad así como establecer nuevos programas regionales y nacionales que limiten la difusión de las enfermedades apícolas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Registro General de Explotaciones Ganaderas (REGA). 01/05/2011. http://www.marm.es/app/vocwai/documentos/Adjuntos_AreaPublica/INDICADORES%20ECON%C3%93MICOS%20SECTOR%20DE%20LA%20MIEL%202010.pdf
- Reglamento (CE) N° 1221/1997 del Consejo de 25 de junio de 1997 por el que se establecen las normas generales de aplicación de las medidas destinadas a mejorar la producción y comercialización de la miel. Diario Oficial de la Unión Europea L173, 1 de julio de 1997.
- VanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood R, Tarpy DR, Pettis JS. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One*. 2009; 4: 6481-6497.
- Delaplane KS, Mayer DF. *Crop pollination by bees*. CABI Publishing, New York. 2000.
- Real Decreto 209/2002, de 22 de febrero, por el que se establecen normas de ordenación de las explotaciones apícolas. Boletín Oficial del Estado 62, 13 de marzo de 2002.
- Suchail S, Guez DL, Belzunces PL. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environ. Toxicol. Chem.* 2000; 19: 1901-1905.
- Bernal J, Garrido-Bailón E, Del Nozal MJ, González-Porto AV, Martín-Hernández R, Diego, JC, Jiménez JJ, Bernal JL, Higes M. Overview of pesticide residues in store pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. *J. Econ. Entomol.* 2010; 103: 1964-1971.
- Office International des Epizooties (OIE). 2012. Manual of standards for diagnostic test and vaccines. <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>

- Anderson DL, Fuchs S. Two genetically distinct populations of *Varroa jacobsoni* with contrasting reproductive abilities on *Apis mellifera*. J. Apicult. Res. 1998; 37: 69-78.
- Anderson DL, Trueman JWH. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. Exp. Appl. Acarol. 2000; 24: 165-189.
- Walsh SP, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques. 1991; 10: 506-513.
- Garrido-Bailón E, Bartolomé C, Prieto L, Botías C, Martínez-Salvador A, Meana A, Martín-Hernández R, Higes M. The prevalence of *Acarapis woodi* in Spanish honey bee (*Apis mellifera*) colonies. Exp. Parasitol. 2012; 132, 530-536.
- Martín-Hernández R, Botías C, Garrido-Bailón E, Martínez-Salvador A, Prieto L, Meana A, Higes M. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *N. ceranae* replacing *N. apis*. Environ. Microb. 2012; 14, 2127-2138.
- Govan VA, Allsopp MH, Davison S. A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. Appl. Environ. Microb. 1999; 65: 2243-2245.
- Rivas-Martínez, S. Memoria del mapa de series de Vegetación de España. Serie Técnica. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación I.C.O.N.A., Madrid. 1987. http://www.marm.es/es/biodiversidad/servicios/banco-de-datos-biodiversidad/informacion-disponible/index_vegetacion_pot.aspx.
- Genersch E. American foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. J. Invertebr. Pathol. 2010; 103: 10-19.
- Office International des Epizooties (OIE), 2013. Lista de enfermedades 2012. <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2013/>
- Çakmak I, Aydin L, Gulegen E, Well H. Varroa (*Varroa destructor*) and tracheal mite (*Acarapis woodi*) incidence in the Republic of Turkey. J. Apicult Res. 2003;42: 57-60.
- Al-Ghzawi AAM, Zaitoun ST, Shannag HK. Incidence and geographical distribution of honeybee (*Apis mellifera* L.) pests in Jordan. Ann. Soc. Entomol. France. 2009; 45 (3): 305-308.
- Finley J, Camazine S, Frazier M. The epidemic of honey bee colony losses during the 1995-1996 season. Am. Bee J. 1996; 136 (11): 805-808.
- Zhou T, Anderson D, Huang ZSH, Yao J, Tan K, Zhang Q. Identification of *Varroa* mites (Acari: Varroidae) infesting *Apis cerana* and *Apis mellifera* in China. Apidologie. 2004; 35: 645-654.
- Faucon JP, Chauzat MP. Varroasis and others honey bee diseases: major causes for colony mortality in France. Bull. Ac. Vet. France. 2008; 161 (3); 257-264
- Nguyen BK, Saegerman C, Pirad C, Mignon J, Widart J, Thirionet B, Verheggen FJ, Berkvens D, Pauw E, Haubruge E. Does imidacloprid seed-treated maize have an impact on honey bee mortality? J. Econ. Entomol. 2009; 102: 616-623.
- Sammataro D, Gerson U, Needham G. Parasitic mites of honey bees: life history, implications and impact. Annu. Rev. Entomol. 2000; 45: 519-548.
- Bacandritsos NK, Saitanis CJ. A field study on the long-term incidence of *Acarapis woodi* in Greece. J. Apicult. Res. 2004; 43: 21-26.
- Ruijter AD, Eijnde J. Van den: Veldproef in Nederland met *Acarapis woodi* in bijenvolken (1982-1985). Bijenteelt. 1987; 89: 80-83.
- Pettis JS, Wilson WT. Life story of the honey bee tracheal mite (Acari: Tarsonemidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 1996; 89: 368-374.
- COLOSS workshop. Conclusions. Proc. Workshop "Nosema disease: lack of knowledge and work standardization" (COST Action FA0803). Guadalajara. 2009. <http://www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online> (acceso 20 Nov. 2009).
- Chauzat MP, Higes M, Martín-Hernández R, Meana A, Cougole N, Faucon JP. Presence of *Nosema ceranae* in French honey bee colonies. J. Apicult. Res. 2007; 46: 127-128.

- Traver BE, Fell RD. Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia. *J. Invertebr. Pathol.* 2011; 107: 43-49.
- Pajuelo AG, Fernández Arroyo MP. Enfermedades de las abejas en España. XXVII Congreso Internacional de Apicultura. Atenas. Ed. Apimondia. 1979: 357-361.
- Orantes FJ, García P. *Nosema* disease in honey bee (*Apis mellifera* L.) infested with Varroa mites in southern Spain. *Apidologie.* 1997; 28: 105-112.
- Martín-Hernández R, Meana A, Prieto L, Martínez-Salvador A, Garrido-Bailón E, Higes M. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73: 6331-6338.
- Gisder S, Hedtke K, Möckel N, Frielitz MC, Linde A, Genersch E. Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Appl. Environ. Microbiol.* 2010; 76: 3032-3038.
- Bacandritsos NK, Granato A, Budge G, Papanastasiou I, Roinioti E, Caldon M, Falcaro C, Gallina A, Mutinelli F. Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies. *J. Invertebr. Pathol.* 2010; 105: 335-340.
- Chen YP, Huang ZY. *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia. *Apidologie.* 2010; 41: 364-374.
- Giersch T, Berg T, Galea F, Hornitzky M. *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie.* 2009; 40: 117-123.
- Yoshiyama M, Kimura K. Distribution of *Nosema ceranae* in the European honeybee, *Apis mellifera* in Japan. *J. Invertebr. Pathol.* 2011; 106: 263-267.
- Williams GR, Shutler D, Little CM, Burgher-MacLellan KL, Rogers REL. The Microsporidian honey bee, the antibiotic Fumagillin-B, and western honey bee (*Apis mellifera*) colony strength. *Apidologie.* 2010. doi: 10.1051/apido/2010030.
- Jara L, Cepero A, Garrido-Bailón E, Martín-Hernández R, Higes M, De la Rúa P. Linking evolutionary lineage with the parasite prevalence in the Iberian honey bee. *J. Invertebr. Pathol.* 2012; 110: 8-13.
- Paxton R, Klee J, Korpela S, Fries I. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie.* 2007; 38: 558-565.
- Klee J, Besana AM, Genersch E, Gisder S, Nanetti A, Tam DQ, Chinh TX, Puerta F, Ruz JM, Kryger P, Message D, Hatjina F, Korpela S, Fries I, Paxton RJ. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* 2007; 96: 1-10.
- Chen YP, Evans JD, Murphy C, Gutell R, Zuker M, Gundensen-Rindal D, Pettis JS. Morphological, molecular and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a Microsporidian parasite isolated from the European honey bee *Apis mellifera*. *J. Euk. Microbiol.* 2009; 56: 142-147.
- Fries I, Feng F, Da Silva A, Slemenda SB, Pieniasek J. *Nosema ceranae* n. sp. (Microsporida, Nosematidae). Morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *Eur. J. Protistol.* 1996; 32: 356-365.
- Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B. Biology and control of *Varroa destructor*. *J. Invertebr. Pathol.* 2010; 103: S96-S119.
- Flores JM, Ruiz JA, Ruz JM, Puerta F, Bustos M, Padilla F, Campano F. Effect of temperature and humidity of sealed brood on chalkbrood development under controlled conditions. *Apidologie.* 1996; 27: 185-192.
- Borum AE, Ulgen M. Chalkbrood (*Ascospaera apis*) infection and fungal agents of honey bees in north-west Turkey. *Journal of Apicultural Research.* 2008; 47: 170-171.
- Pederson K. Chalkbrood: possible methods of control, and the effect of additional heat. *Birkteren.* 1976; 92: 18-22.
- Arostein DA, Murray KD. Chalkbrood disease in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.*; 103: 20-29.

- Hansen H, Brødsgaard CJ. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World*. 1999; 80: 5-23.
- Forsgren E, Lundhagen AC, Imdorf A, Fries I. Distribution of *Melissococcus plutonius* in honeybee colonies with and without symptoms of European foulbrood. *Microb. Ecol.* 2005; 50: 369-374.
- Roetschi A, Berthoud H, Kuhn R, Imdorf A. Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation. *Apidologie*. 2008; 39: 362-371.
- Thompson HM, Brown MA. Is contact colony treatment with antibiotics an effective control for European foulbrood? *Bee World*. 2001; 82: 130-138.
- Budge GE, Barrett B, Jones B, Pietravalle S, Marris G, Chantawannakul P, Thwaites R, Hall J, Cuthbertson AGS, Brown MA. The occurrence of *Melissococcus plutonius* in healthy colonies of *Apis mellifera* and the efficacy of European foulbrood control measures. *J. Invertebr. Pathol.* 2010; 105: 164-170.
- Antúnez K, Martín-Hernández R, Prieto L, Meana A, Zunino P, Higes M. Immune-suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ. Microb.* 2009; 11: 2284-2290.
- Chauzat MP, Faucon JP, Martel AC, Lachaieze J, Cougoule N, Aubert M. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *J. Econ. Entomol.* 2006; 99: 253-262.
- Boecking O, Genersch E. Varroosis- the ongoing crisis in bee keeping. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*. 2008; 3: 221-228.
- Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, Garrido-Bailón E., González-Porto AV, Barrios L, Del Nozal M, Bernal JL, Jiménez JJ, García-Palencia P, Meana A. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microb.* 2008; 10: 2659-2669.
- VanEngelsdorp D, Meixner MD. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Apicult. Res.* 2010; 103: 80-95.
- Le Conte Y, Navajas M. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*. 2008; 27 (2): 499-510.
- Higes M, Martín-Hernández R, Meana A. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie*. 2010; 41: 375-392.
- Higes M, García-Palencia P, Martín-Hernández R, Meana A. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with the Microsporidia *Nosema ceranae*. *J. Invertebr. Pathol.* 2007; 94, 211-217.
- Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, García-Palencia P, Meana A, Del Nozal MJ, Mayo R, Bernal JL. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ. Microb. Rep.* 2009; 1: 110-113.