

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



**REPERCUSIÓN POTENCIAL EN LA CABAÑA APÍCOLA
ESPAÑOLA DE AGENTES NOSÓGENOS DETECTADOS EN
COLONIAS DE *APIS MELLIFERA IBERIENSIS***

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

María Encarnación Garrido Bailón

Bajo la dirección de los doctores

Aránzazu Meana Mañes
Mariano Higes Pascual
Raquel Martín-Hernández

Madrid, 2013



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Veterinaria

Departamento de Sanidad Animal

Tesis Doctoral

**REPERCUSIÓN POTENCIAL
EN LA CABAÑA APICOLA
ESPAÑOLA DE AGENTES
NOSÓGENOS DETECTADOS
EN COLONIAS DE *Apis
mellifera iberiensis***

M^a Encarnación Garrido Bailón

Madrid 2012

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID**

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



**REPERCUSIÓN POTENCIAL EN LA CABAÑA APÍCOLA
ESPAÑOLA DE AGENTES NOSÓGENOS DETECTADOS
EN COLONIAS DE *Apis mellifera iberiensis***

TESIS DOCTORAL

María Encarnación Garrido Bailón

Madrid 2012

El trabajo presentado en esta tesis se ha realizado en el Centro Agrario de la Junta de Comunidades de Castilla La Mancha (CA) y la Universidad Complutense de Madrid (UCM), bajo la dirección de los Doctores Mariano Higes Pascual, Raquel Martín-Hernández y Aránzazu Meana Mañes, como parte de los proyectos RTA2005-00152-00-00, API 06-009 y API 06-001. Asimismo, la autora ha disfrutado de una beca predoctoral del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria otorgada por el Ministerio de Ciencia e Innovación (BOE del 8 de Junio de 2005). Durante el desarrollo de la misma se han realizado estancias en la Universidad de Murcia y en la Universidad de Minnesota.

ARÁNZAZU MEANA MAÑES, MARIANO HIGES PASCUAL y RAQUEL MARTÍN-HERNÁNDEZ, doctores en Veterinaria,

Informan:

Que M^ª Encarnación Garrido Bailón, licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado “REPERCUSIÓN POTENCIAL EN LA CABAÑA APÍCOLA ESPAÑOLA DE AGENTES NOSÓGENOS DETECTADOS EN COLONIAS DE *Apis mellifera iberiensis*”, que consideramos reúne las condiciones de calidad científica necesarias para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense.

Que, como resultado de este trabajo se han publicado hasta el momento, cuatro artículos en cuatro revistas del *Science Citation Index: Journal of Apicultural Research and Bee World, Journal of Economic Entomology, Spanish Journal of Agricultural Research* y *Environmental Microbiology*.

Que, durante la realización de este trabajo, se han presentado 15 comunicaciones a congresos nacionales e internacionales.

De lo que informamos en Madrid, a 11 de Abril de 2012.

Fdo. Aránzazu Meana Mañes
Profesora Titular de la UCM

Fdo. Mariano Higes Pascual
Asesor Investigación del CA

Raquel Martín-Hernández
Investigadora del CA

*“Hagas lo que hagas, ámalo.
Como hiciste con la cabina del Cine Paradiso”*

*Alfredo a Totó,
Nuovo Cinema Paradiso (1988)*

A Matusiños
A San Xoan de Río
A Tixós

AGRADECIMIENTOS

Miguel Delibes decía que “*vale la pena estar un rato en la vida y ver cómo es*”. Yo añadiría que ese *rato* merece la pena si lo pasas en buena compañía. A todos los que habéis compartido un *rato* de vuestra vida y muchos *ratos* a lo largo de la mía, va mi gratitud, mi cariño y mi amistad. Personas que han colaborado en esta tesis de una u otra manera, pero sobre todo que han contribuido de una forma fundamental en mi desarrollo profesional y personal. Para cada uno de vosotros, mi agradecimiento más sincero.

En primer lugar a mis directores, Dr. Mariano Higes, Dra. Raquel Martín y Dra. Aránzazu Meana, por haberme dado la oportunidad de introducirme en dos mundos totalmente desconocidos para mí hasta 2005: la apicultura y la investigación. Por haberme enseñado a hacer las preguntas adecuadas y por concederme la libertad para buscar las respuestas acertadas. Mariano, creo haberlo entendido, siempre que haya una casilla vacía en la cuadrícula, habrá algo que investigar. Gracias por alentarme a continuar cuando no veía más que oscuridad. Raquel, me has permitido ser tu sombra dentro y fuera del laboratorio, contigo nunca me ha faltado la comprensión ni alguien con quien hablar. Arantxa, pese a mi testarudez, vehemencia e inmadurez, nunca has dejado de confiar en mí, gracias.

A los Doctores José Luis Bernal, Amparo Martínez y Amelia González porque sin su trabajo en las áreas de Química Analítica, Epidemiología y Palinología, esta tesis no hubiese sido posible. Trabajar con gente profesional y cualificada es un reto que a veces impone, pero sin duda un privilegio porque te da la oportunidad de crecer y avanzar. Muchas gracias por vuestra ayuda.

A la Dra. Lourdes Prieto, Lourditas... Es tanto lo que me has aportado a nivel profesional que un simple gracias me sabe a poco, sin embargo lo que más valoro de ti es lo que eres después de la Biología Molecular.

A la Dra. Pilar de la Rúa y a Irene Muñoz por haberme acogido en Murcia a pesar del inmenso trabajo que me llevé en forma de *Varroa*. Es un placer trabajar con vosotras y confío que la vida nos vuelva a poner en el mismo punto de este largo camino.

To Prof. Marla Spivak and her research group because they showed me an unknown apicultural field. Thanks for taking care of me and for giving me a bed the first night in Minnesota. Marla, recuerda que en Galicia siempre tendrás una silla en la que descansar.

To Drs. Kate Perkins, Giles Budge and Neil Boonham because they are the responsible for virus analysis.

A todas las asociaciones apícolas, veterinarios y administraciones públicas participantes en este inmenso proyecto, mi más sincero agradecimiento por la total colaboración. Espero haber cumplido mi objetivo como veterinaria y ayudar de alguna manera al sector apícola.

Al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y a la Consejería de Agricultura de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral.

A Julián Barrera por su eficiente labor a cargo de los becarios del INIA. La profesionalidad y eficiencia son virtudes que siempre nos has demostrado.

A todos mis compañeros del Centro Agrario de Marchamalo, desde su director Ángel Sanz, que amablemente me ha facilitado cada paso en el camino, a todos y cada uno de los que integran o han integrado la plantilla a lo largo de estos años. Una especial mención se merece el equipo con el que he trabajado día a día: Alberto, José M., Pilar, Virginia, Teresa, Javi, M^a Carmen, José Antonio y Carmen. Vuestra amistad y compañerismo hacen que el trabajo diario sea mucho más llevadero.

A Susana y a Cristina, mis pilares fundamentales en Guadalajara. Gracias por la enorme paciencia con la que os enfrentasteis a mi cuadrículada organización, por la ayuda absolutamente desinteresada, pero sobre todo por ese abrazo que siempre me esperaba cuando regresaba de Galicia y que siempre tendréis cuando vengáis a verme. Los buenos y malos *ratos* a vuestro lado, se viven mucho mejor.

A mis amigos de Orense: M^a José, Eva, Almu, Marta y Paco; a los de Lugo: Espe, María SdC., Hari, Isa, Amalia, Sandra, Ione, Leny y Lula; a los de Córdoba: Ainhoa, Juanti y Adri; a los de Madrid: Bea, Sabrina y Alberto; y a mis "hijas" canarias: Ale e Ire. Vuestra amistad es el mejor de los regalos. Muchísimas gracias por respetar mis largos silencios cuando no podía hablar y por escucharme cuando necesitaba hacerlo.

A Rosa Montes, porque incluso en el agujero más oscuro del universo, a veces te encuentras la luz que ilumina la mañana, y tú has iluminado muchas.

A Dña. Araceli, por confiar en mí desde los 8 años, y a Delia por ayudarme a mantener el equilibrio cuando me vi desbordada. A mis tías: Reme, Mercedes y Peri. Vosotras me habéis educado y mimado durante más de 30 años. Os animo a que sigáis haciéndolo, desde luego yo no me cansaré de recibir vuestro cariño. A mi abuelo Jesús, por enseñarme que en medio de un largo silencio puede aparecer una palabra que te devuelva la esperanza.

A mis padres y hermanos, vosotros sois la fuerza que hace que me levante cada día y los responsables de la mayor parte de lo que soy. *Papá*, eres el espejo en el que deseo reflejarme, todavía tengo tiempo, quizá algún día lo consiga. *Mamá*, no hace

falta salir de casa para encontrarse el mejor ejemplo de fuerza de voluntad, esfuerzo, superación y por supuesto, amor. *Manu, Suso*, vuestra presencia me reconforta de tal manera que convierte un viaje a casa en el aire fresco que necesito cuando me cuesta respirar.

A Lois. Gracias por tu amor y apoyo incondicional, por haberme empujado a seguir adelante cada vez que el desaliento llamaba a mi puerta. Gracias por tu inagotable paciencia, por recoger mis lágrimas y dibujar en tu cara mis sonrisas, pero sobre todo, por tu incalculable generosidad al haberme regalado el *rato* más largo de tu vida.

Y para finalizar, me gustaría agradecer a todo aquel lector que guiado por su curiosidad haya decidido detenerse un *rato* y echar un vistazo a las páginas de este trabajo. Si algo de lo que aquí hay escrito, sirve en tu aprendizaje, mi labor como investigadora cobrará mayor sentido. *MUCHAS GRACIAS*.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1. Apicultura: Cabaña apícola española	7
1.1. Historia de la apicultura	7
1.2. Sistemas de explotación.....	8
1.3. Importancia económica.....	9
1.4. Normativa. Legislación	11
2. <i>Apis mellifera iberiensis</i>	13
2.1. Origen.....	13
2.2. Ciclo biológico e individuos de la colonia.....	15
2.3. Anatomía y fisiología.....	18
2.4. Biología de la colonia.....	21
3. Agentes nosógenos de <i>Apis mellifera iberienseis</i>	23
3.1. Agentes nosógenos bióticos.....	24
3.1.1. <i>Varroa destructor</i>	25
3.1.2. <i>Acarapis woodi</i>	40
3.1.3. Género <i>Nosema</i>	46
3.1.4. <i>Ascosphaera apis</i>	58
3.1.5. <i>Paenibacillus larvae</i>	65
3.1.6. <i>Melissococcus plutonius</i>	72
3.1.7. Virus.....	79
3.2. Agentes nosógenos abióticos: Pesticidas.....	82
MATERIAL Y MÉTODOS	85
4. Diseño del estudio nacional.....	87
4.1. Cálculo muestral.....	87
4.2. Tipo de muestra y obtención de los datos	88
4.3. Toma de muestra	89
4.4. Recepción y organización de las muestras.....	89
4.5. Clasificación climática de España	91
5. Diseño del estudio regional	92
6. Encuesta epidemiológica.....	93
7. Detección de patógenos.....	94
7.1. Patógenos de las abejas adultas	94
7.1.1. <i>Varroa destructor</i>	94
7.1.2. <i>Acarapis woodi</i>	95
7.1.3. Género <i>Nosema</i>	97
7.1.4. <i>Braula coeca</i>	100
7.1.5. Virus.....	100
7.2. Patógenos de la cría	101

7.2.1. <i>Varroa destructor</i>	101
7.2.2. <i>Ascosphaera apis</i>	102
7.2.3. <i>Melissococcus plutonius</i>	104
7.2.4. <i>Paenibacillus larvae</i>	105
7.2.5. PCR múltiple de los patógenos infecciosos de la cría	106
7.2.6. Virus	107
8. Adaptaciones para un elevado tamaño muestral	107
9. Detección de pesticidas en polen	108
10. Determinaciones palinológicas	108
11. Análisis estadístico de los datos	108
RESULTADOS	111
12. Estudio nacional	113
13. Estudio regional	113
14. Encuesta epidemiológica	114
15. Detección de agentes nosógenos	123
15.1. <i>Varroa destructor</i>	123
15.2. <i>Acarapis woodi</i>	126
15.3. Género <i>Nosema</i>	131
15.4. <i>Braula coeca</i>	136
15.5. <i>Ascosphaera apis</i>	136
15.6. <i>Melissococcus plutonius</i>	137
15.7. <i>Paenibacillus larvae</i>	137
15.8. PCR múltiple de los patógenos infecciosos de la cría	138
15.9. Virus	143
15.10. Pesticidas	144
15.11. Determinaciones palinológicas	148
15.12. Asociaciones entre patógenos	149
15.13. Análisis de regresión del estudio regional	151
DISCUSIÓN	155
16. Estudio nacional	157
17. Estudio regional	173
CONCLUSIONES	177
RESUMEN	181
SUMMARY	185
BIBLIOGRAFÍA	189

GLOSARIO	229
ANEXO I: ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA	235
ANEXO II: ARTÍCULOS CIENTÍFICOS	239

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La importancia de la apicultura dentro de la estructura agraria de nuestro país queda demostrada ya que España es el primer productor Europeo de los principales productos apícolas (miel, polen y cera) y el quinto mundial. Por otra parte, cuenta con el mayor censo apícola de la Unión Europea, alrededor de 2,5 millones de colmenas, según se recoge en el Reglamento (UE) Nº726/2010 de la Comisión. Esto supone que nuestro país tiene 19% del total del censo apícola registrado en la Unión Europea de los 27 países.

Además del valor de sus producciones (miel, polen, jalea real, cera, etc.), las colonias de abejas tienen un importante papel como polinizadores, tanto de plantas cultivadas como de especies silvestres, siendo vitales para el equilibrio de muchos ecosistemas. Este papel adquiere una mayor importancia si tenemos presente que en muchas zonas son los únicos insectos que realizan esta función. Es importante constatar el hecho de que también posibilitan el aprovechamiento de zonas agrarias marginales, que no son susceptibles de otro tipo de usos.

Para poder desarrollar todo su potencial productivo, es necesario que las colonias de abejas presenten un buen estado sanitario, el cual además asegure su viabilidad como especie productora. Entre las patologías que afectan a las abejas melíferas, la varroosis y la nosemosis ocupan un lugar preponderante. En la actualidad, en nuestro país los laboratorios especializados en el estudio de este tipo de patologías apícolas son insuficientes. Por ello, no se dispone de datos oficiales nacionales que permitan evaluar sus repercusiones reales; tampoco se conoce su impacto real sobre sus producciones (miel, polen, cera, jalea real, etc.).

Ante la ausencia de datos oficiales y a partir de los datos internos del Laboratorio de Patología Apícola del Centro Agrario de la Junta de Comunidades de Castilla La-Mancha (CA), se confirma que los patógenos más frecuentemente detectados en nuestro país son *Varroa*, *Nosema* o ambos.

A partir del año 2000, el CA comenzó a recibir denuncias de mortalidad de colonias de abejas con una sintomatología no observada hasta ese momento, pero fue en otoño de 2004 cuando se generalizó este fenómeno; los apicultores denunciaban que las colmenas se quedaban prácticamente vacías, con poca población de abejas adultas y sin detectar ningún otro signo clínico aparente en las semanas previas.

Durante este periodo, los datos del CA demostraron que mientras la prevalencia de varroa se mantenía estable, alrededor del 35-40%, la detección de nosema aumentó notablemente, incluso en épocas del año (verano) en las que no era habitual. Llamó la atención también que la nosemosis no presentaba el cuadro clínico clásico característico (manchas fecales en las diferentes estructuras de la colmena, abejas reptantes y con el abdomen dilatado, reposición frecuente de reinas, etc.) y los apicultores solo observaban una disminución evidente en la cantidad de abejas e incluso de la muerte de la colonia. Durante todo este tiempo, en el CA se constató

además la necesidad de mejorar las técnicas diagnósticas con el fin de aumentar su sensibilidad y reproducibilidad, optimizando además el tiempo necesario para su análisis.

Por otro lado, los estudios que se estaban realizando en otros países sobre este proceso sugerían su relación con la exposición de las abejas a determinados pesticidas de uso agrícola (pesticidas nicotinoides, fenilpirazoles, etc.) o la influencia de determinados fenómenos como el cambio climático, la pérdida de ecosistemas o incluso las ondas electromagnéticas.

Durante la realización de este estudio, este fenómeno adquiere una nueva dimensión tras la denuncia en Estados Unidos de un cuadro similar, que se denominó Colony Collapse Disorder (CCD), de etiología desconocida.

En esta situación nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas de mayor sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, optimizando el tiempo necesario para la realización de los análisis.
2. Realización de un estudio epidemiológico que permitiese determinar la prevalencia real de los agentes nosógenos involucrados en el fenómeno.
3. Valoración de las relaciones existentes entre los agentes nosógenos detectados y los factores que pudieran favorecer su acción.
4. Establecimiento de la relación causal entre los agentes detectados y el proceso de despoblamiento detectado en las colmenas de *Apis mellifera*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1 Apicultura: Cabaña apícola española

1.1 Historia de la apicultura

El significado etimológico de la palabra latina apicultura es *Apis* (abeja) y *Cultura* (cultivo). La Real Academia de la Lengua Española define la Apicultura como el arte de criar abejas para aprovechar sus productos. P. Jean-Prost (1989) amplía esta definición y la describe como “la ciencia de la cría y mantenimiento de las abejas con vistas a obtener de su trabajo dirigido, miel, cera, polen y jalea real como principales productos del colmenar”. Además de estos beneficios directos, las colonias de abejas juegan un importante papel como polinizadoras de las plantas tanto cultivadas como silvestres.

El origen de la apicultura se remonta a más de 7.000 años atrás tal como reflejan las pinturas rupestres de la Cueva de la Araña en Bicorp (Valencia), en las que el hombre prehistórico recolectaba miel de colmenas silvestres que utilizaba como alimento. La abundancia de este producto y sus excelentes cualidades hicieron de él, una importante fuente de recursos alimenticios en el mundo mediterráneo.

Posteriormente, los egipcios empezaron a fabricar colmenas de arcilla de forma tubular que apilaban paralelamente para explotar los enjambres de un modo artificial. Las figuras y gráficos encontrados en varias tumbas de los primeros faraones revelan asimismo, el uso del humo y la práctica de la extracción de la miel y de la cera sin recurrir al apicidio o matanza de la colonia de abejas. En este período el valor de la miel se amplía ya que también se usa con fines medicinales (Benedetti y Pieralli, 1988).

En la Grecia Antigua, Aristóteles trata en el libro V de su obra *Historia Animalium* la libación del néctar, la disposición de los nidos de las abejas y su organización social, y describe además el uso de algo similar a un panal móvil obtenido con listones para guiar las construcciones de cera.

En el Período Romano, el consumo de miel llegó a ser extraordinario y autores como Virgilio, Plinio y Varrón legaron interesantes documentos sobre la cría de las abejas, como por ejemplo, la obra *De re rustica* del español Columela que establece conceptos y procedimientos todavía vigentes. Desde entonces ha habido un gran interés en conseguir una buena cosecha de miel, ya que se encontraron nuevas aplicaciones como la conservación de frutas, la elaboración de bebidas alcohólicas (hidromiel y/o mellitites), la preparación de aceites aromáticos y el tratamiento de heridas o envenenamientos.

Sin embargo, a partir de la decadencia del Imperio Romano, y pese a que el rey Alfonso X el Sabio dictó en el siglo XIII las *Ordenanzas de Colmeneros* con objeto de regular las prácticas de dicho gremio (Sepúlveda Gil, 1980), la apicultura sufre un abandono que se agrava en el siglo XVI con la aparición del azúcar de caña primero y el de remolacha después (Voorhies y col., 1933). A pesar de la competencia que esto supone como edulcorante y del descuido que sufrió la apicultura por parte de los campesinos, ésta siguió desarrollándose en

algunos conventos por la importancia de la miel en aplicaciones farmacéuticas, cosméticas, además de culinarias y alimenticias.

Después de esta etapa de oscuridad, comienza una época de esplendor encabezada por las observaciones en 1586 de Luís Méndez de Torres, quien describe por primera vez a la abeja reina como hembra productora de huevos. A ello se suman, ya en el siglo XVII, los descubrimientos de Jan Swammerdam (Cobb, 2000, 2002) sobre la anatomía y el desarrollo de las larvas y las ninfas, la alimentación con la jalea real a las larvas de la reina, así como la anatomía y proceso de la muda en larvas y la estructura de la colonia. Todo ello supuso un extraordinario avance en el conocimiento biológico de los insectos individuales y del conjunto de la colonia y determinó, en los siglos sucesivos, avances técnicos como la invención del panal móvil por Lorenzo Langstroth en 1851, los moldes para láminas de cera por Johannes Mehring en 1857, un extractor de miel rudimentario por Von Hruschha en 1865, el primer ahumador por Moses Quimby en 1870 y la colmena Layens por George Layens en 1874.

Todos estos progresos contribuyen a que se produzca el paso definitivo hacia una apicultura más técnica hasta convertirse en la actualidad en una actividad agropecuaria.

1.2 Sistemas de explotación

La evolución de la apicultura a lo largo de la historia hace que actualmente sea considerada una actividad zotécnica.

Los apicultores dejan de ser unos sencillos cazadores de nidos de abejas para transformarse en auténticos ganaderos que, a través del conocimiento de la colonia y del desarrollo de sistemas de explotación, optimizan la sanidad y las aptitudes de la colonia.

La colmena es el medio de explotación de la apicultura moderna y se define como *el conjunto formado por una colonia de abejas o enjambre, el recipiente que las contiene y los elementos propios necesarios para su supervivencia* (RD 209/2002).

Las colmenas rústicas estaban fabricadas de materiales como barro cocido, corteza de alcornoque y mimbre, a las que se les colocaban tejas, tablas o ladrillos, en la parte superior para protegerlas de las inclemencias meteorológicas. El inconveniente fundamental de este tipo de colmenas era la necesidad de realizar el apicidio a la hora de extraer la miel lo que implica el sacrificio de colonias con reinas, mientras que cuando se recuperaba el enjambre, siempre llevaba consigo la reina vieja menos ponedora.

En la actualidad, las colmenas utilizadas se clasifican (RD 209/2002) en fijistas, aquellas en las que las abejas construyen panales fijos pegados al techo y a las paredes del recipiente que las contiene (troncos huecos de árboles, cestos de paja tejida y mimbre, etc.) y del que además no se pueden separar; y movilistas, provistas de panales móviles o cuadros, que se pueden separar tanto para la recolección de la miel como para la limpieza o

tratamientos. Asimismo, en función de la forma de crecimiento de la colonia y el posterior desarrollo de la colmena, se dividen en verticales y horizontales.

El modelo original de la colmena horizontal es la Layens que recibe su nombre en reconocimiento a su inventor, George de Layens. La principal característica de este tipo de colmena es su limitada capacidad y posibilidad de clausurarla. Según el punto de vista desde el que se mire, puede suponer una ventaja ya que al desempeñar labores de cámara de cría y de alza melaria, la provee de facilidad de manejo en trashumancia, o una desventaja al no permitir el crecimiento de la colonia.

La colmena de tipo vertical fue patentada por Lorenzo Langstroth. La peculiaridad de este modelo es que no tiene un volumen definido. Puede aumentar verticalmente añadiendo tantas alzas melarias a la cámara de cría como permitan la potencia de la colonia y los recursos melíferos de la zona. Se han realizado adaptaciones posteriores a este tipo de colmena como la colmena Perfección para regiones con abundante floración y, por tanto, ricas en néctar.

Ya sean de uno u otro tipo, las colmenas se agrupan en un mismo asentamiento formando un colmenar. Si las colmenas permanecen todo el año en un mismo emplazamiento y precisan de un aporte de alimento artificial en ciertas ocasiones, se denominan colmenares estantes; y si por el contrario son desplazadas a otro u otros asentamientos a lo largo del año con el fin de obtener un máximo de producción, se hablaría de colmenares trashumantes. A su vez, los apicultores tienden a reunir las colmenas en uno o varios colmenares con independencia de su finalidad constituyendo explotaciones apícolas que pueden ser profesionales (>149 colmenas), no profesionales (16- 149 colmenas) o de autoconsumo (0-15) (RD 209/2002).

1.3 Importancia económica

Tal como se ha descrito hasta el momento, la apicultura es una de las actividades agropecuarias con más tradición en nuestro país. 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 2007, el número total de colonias de abejas manejadas mundialmente fue de 72,6 millones (FAO, 2009), lo que supone un incremento del 64% en el número total de colonias manejadas desde 1961. Sin embargo, este aumento no fue homogéneo en todas las regiones. En el período entre 1961 y 2007, las colonias manejadas disminuyeron tanto en

Europa (-26,5%) como en Norteamérica (-49,5%), mientras que aumentaron en Asia (426%), África (130%), Sudamérica (86%) y Oceanía (39%) (FAO, 2009).

Según los datos de la FAO (2009), en Europa se constata también una reducción evidente entre 1970 y 2007 donde el número de colonias disminuyó desde 21 millones a 15,5 millones. Pero incluso dentro de las regiones hay una variabilidad considerable en la tendencia de la población de las colonias de las abejas melíferas. Esto se puede apreciar en el caso de España, donde el censo 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. Este número de colmenas supone actualmente el 26% del censo reconocido de la Unión Europea (REGA 01/05/2011).

Este considerable aumento de la cabaña apícola española ha sido más pronunciado a raíz de la entrada en vigor en 1998 del Reglamento CE 1221/97 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 72,6% de los apicultores que poseen las 24.251 explotaciones registradas en el Registro de Explotaciones Ganaderas (REGA) y que oficialmente desarrollan la actividad apícola en España, lo hace de un modo profesional, lo que significa que la apicultura representa para ellos la más importante o única fuente de ingresos.

El modelo de apicultura seguido en nuestro país viene determinado por la diferencia climática entre Norte y Sur. En las comunidades autónomas del norte de España como Castilla y León, País Vasco y Galicia el tipo de colmena que se utiliza mayoritariamente es movilista tipo Langstron, Dadant y/o Perfección ubicadas en colmenares estantes y pertenecientes fundamentalmente a apicultores no profesionales. En otras regiones como Andalucía, Extremadura y/o Comunidad Valenciana, los apicultores son profesionales y manejan un mayor número de colmenas, tipo Layens en esencia, que les permiten realizar movimientos trashumantes (REGA 01/05/2011).

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 lo que supone más del 26% de la producción europea y alrededor del 3% de la producción mundial, convirtiéndola así en el octavo país productor del mundo (REGA 01/05/2011). La producción de polen supera las 1.000 toneladas, no pudiendo ser comparada con la producción de otros países por carecer de datos fiables. 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 (vanEngelsdorp y Meixner, 2010). Según Klein y col. (2007), 52 de las 115 principales materias primas de alimentos dependen en mayor o menor medida de la polinización de las abejas melíferas. Para estos autores, la desaparición de las colonias de estos insectos llevaría asociada una disminución de las

cosechas tanto en calidad como en cantidad. Para Aizen y col. (2008), el 22,6% de la producción agrícola en el mundo desarrollado depende directamente de la polinización animal y el 35% de la dieta humana se beneficia de una forma indirecta (Klein y col., 2007). En términos económicos, el valor de la polinización de los insectos se ha estimado en 153 billones de euros, lo que puede representar el 9,5% del valor total de la producción agrícola (vanEngelsdorp y Meixner, 2010).

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 (McGregor, 1976; Delaplane y Mayer, 2000). El manejo de las abejas melíferas es adecuado para la polinización de grandes plantaciones por varias razones. Primero, el gran número de individuos por colmena (10.000-40.000 individuos, aproximadamente un tercio de los cuales son pecoreadoras) implicados en este trabajo a lo largo de todo el año. Segundo, el apicultor siempre puede estimular el crecimiento de las poblaciones orientadas a la polinización en el momento más oportuno a través de alimentación artificial. Y finalmente, su propia biología les permite visitar un amplio rango de tipos de flores (Seeley, 1985).

No obstante, tanto las producciones apícolas como la polinización de cultivos se pueden ver 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.

1.4 Normativa. Legislación

La apicultura se encuentra regulada legalmente en España por el RD 209/2002 (y su posterior modificación RD 448/2005) que establece los conceptos básicos además de las normas de ordenación que deben seguir las explotaciones apícolas. Entre las reglas que deben cumplir, destacan aquellas referidas a la identificación de las colmenas mediante un código alfanumérico; la ubicación y señalización del colmenar; y el registro de cada explotación en su respectiva comunidad autónoma que a su vez deben constar en REGA (RD 479/2004). Una de los elementos más importantes es el libro de registro de cada explotación, que debe recoger como mínimo: el código de la explotación, los datos identificativos del titular de la misma, el número de colmenas que la constituyen, la información de cualquier tipo de traslado que sufran las colmenas, los datos sanitarios de la explotación y los análisis de laboratorio realizados.

En 1998, mediante el Reglamento (CE) 1221/97, se puso en marcha en nuestro país el primer Programa Nacional de medidas de Ayuda a la Apicultura (OM de 5-5-98) financiado en un 50% por la Unión Europea a través del Fondo Europeo de Orientación y Garantía Agrícola (FEOGA). La aportación del otro 50% sería nacional, asumido a partes iguales por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), y las comunidades autónomas (CC. AA.). Las disposiciones de aplicación de este reglamento quedan

establecidas en el Reglamento (CE) 2300/97 de la Comisión. Posteriormente ambas disposiciones fueron derogadas y sustituidas por los Reglamentos (CE) 797/2004 del Consejo y 917/2004 de la Comisión (modificado por los Reglamentos (CE) 811/2007 y 726/2010 de la Comisión) respectivamente, pasando los Programas Nacionales Apícolas a ser de periodicidad trianual e incluyendo a los productos de la apicultura (no solo la miel). La Decisión de la Comisión de 10 de agosto de 2007 aprueba asimismo, la participación comunitaria en la financiación del programa de mejora de la producción y comercialización de los productos de la apicultura para España, en los ejercicios 2008, 2009 y 2010.

En la actualidad, las medidas de apoyo a este sector se establecen mediante el Reglamento (CE) 1234/2007 del Consejo que, desde el 1 de enero de 2008, deroga el Reglamento (CE) 797/2004 y establece las normas generales de aplicación de las medidas destinadas a mejorar tanto la producción como la comercialización de la miel. La ejecución de este Reglamento contempla la posibilidad de establecer programas dirigidos a:

- La asistencia técnica de los apicultores y de las agrupaciones de apicultores.
- La lucha contra la varroosis.
- La racionalización de la trashumancia.
- El establecimiento de medidas de apoyo a los laboratorios de análisis de las características fisicoquímicas de la miel.
- La adopción de medidas de apoyo a la repoblación de la cabaña apícola comunitaria.
- La colaboración con organismos especializados en la realización de programas de investigación aplicada en este sector y de los productos procedentes de la apicultura, cuya ejecución y desarrollo corresponde a los servicios competentes de las distintas CC. AA.

La apicultura recibe además una serie de ayudas para su promoción. Por una parte, la subvención para la mejora de la biodiversidad en zonas frágiles (RD 708/2002); por otra la ayuda para el fomento de la apicultura ecológica en el marco de métodos de producción compatibles con la protección del medio ambiente (RD 4/2001), y finalmente, la concesión de primas para la polinización en disposiciones vigentes en determinadas regiones.

A su vez, los intercambios intracomunitarios de abejas vivas y los modelos de certificación sanitaria están regulados por la Decisión 2007/265/CE que amplía la Directiva 90/425/CEE relativa a los controles veterinarios y zootécnicos aplicables en los intercambios intracomunitarios de determinados animales vivos y productos con vistas a la realización del mercado interior. Por otro lado, las importaciones de abejas tanto *Apis mellifera* como *Bombus* spp. procedentes de determinados países terceros deben estar controladas por la policía sanitaria (Decisión 2003/881/CE; Decisión 2005/60/CE).

El control de las enfermedades que afectan a las abejas melíferas está regulado por el RD 617/2007 que establece varias listas de enfermedades de declaración obligatoria y regula

su notificación. Así, se incluye dentro de la lista A (enfermedades de declaración obligatoria en la Unión Europea) patologías como aethinosis y tropilaelapsosis; en la lista B (otras enfermedades de declaración obligatoria en España): loque americana; y finalmente, en la lista C (Otras enfermedades objetos de comunicación semestral): acarapisosis, loque europea, nosemosis y varroosis.

El RD 608/2006 complementa en el área de la sanidad apícola al RD 617/2007 (modificado por la Orden APA/735/2008) ya que establece y regula un Programa Nacional de lucha y control de las enfermedades de las abejas de la miel.

Los productos apícolas (Reglamento (CE) 1774/2002) también son objeto de control y están sujetos a la fijación de los límites máximos de residuos (LMR) de las sustancias farmacológicamente activas utilizadas como tratamiento de las colonias de abejas (Reglamento (CE) 178/2006, Reglamento (CE) 839/2008, Reglamento (CE) 256/2009, Reglamento (CE) 459/2010), así como de los plaguicidas usados en la flora circundante al colmenar (Reglamento (CE) 396/2005 y sus posteriores modificaciones Reglamento (CE) 37/2010). Además la Directiva 2007/52/CE que modifica a la Directiva 91/414/CEE ha incluido las sustancias activas etoprofos, pirimifos-metilo y fipronil dentro del anexo I de dicha Directiva donde se especifica cómo, cuándo y en qué casos se pueden utilizar aquellos productos que contengan dichas sustancias activas para garantizar que puedan autorizarse en todos los Estados miembros.

2 *Apis mellifera iberiensis*

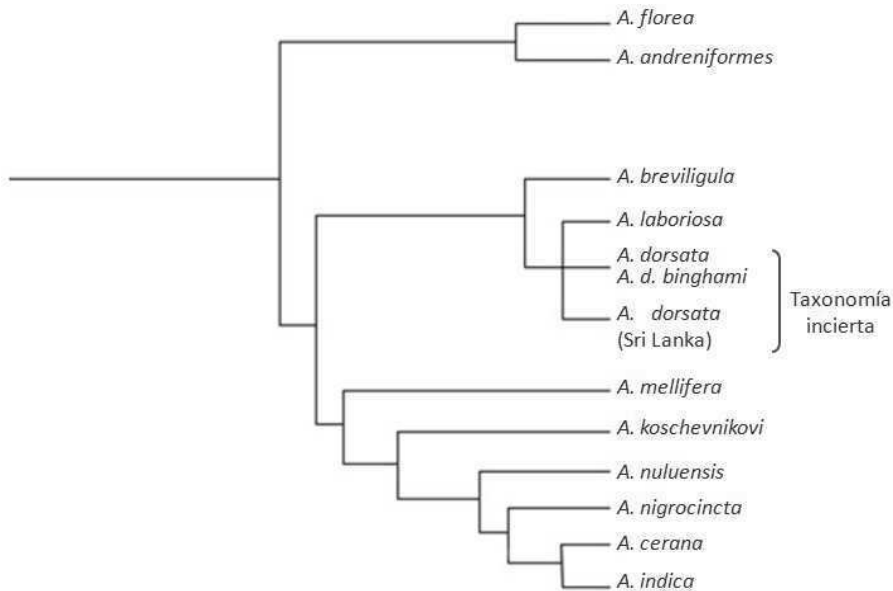
2.1 Origen

La abeja doméstica o abeja de la miel (*Apis mellifera* L.) fue descrita por Linneo en 1758 y está incluida en el orden Hymenoptera, familia Apidae, tribu Apini, género *Apis*.

La taxonomía de las especies del género *Apis* se ha basado tradicionalmente en caracteres morfológicos, de comportamiento (como la construcción de nidos) y en la distribución geográfica de cada especie (Ruttner, 1988). Sin embargo, estudios filogenéticos más recientes, basados en el análisis de genes múltiples, tanto mitocondriales como nucleares (Arias y Sheppard, 2005; Raffiudin y Crozier, 2007; Lo y col., 2010), han producido la filogénesis de la abeja melífera más comprensiva y mejor estructurada. Estos análisis incluyen las nueve especies reconocidas por Olroyd y Wongsiri (2006) (*Apis florea*, *Apis andreniformis*, *Apis laboriosa*, *Apis dorsata*, *Apis mellifera*, *Apis koschevnikovi*, *Apis nuluensis*, *Apis nigrocincta* y *Apis cerana*) y un décimo taxón, *Apis dorsata binghami* (Cokerell, 1906 citado por Lo y col., 2010) que sigue siendo centro de discusión ya que, el grado de divergencia existente entre las secuencias de *A. dorsata* y *A. d. binghami* es tan bajo (menor del 2,5 %) que es arriesgado pensar que sean dos subespecies diferentes (Arias y Sheppard, 2005).

Un estudio realizado por Lo y col. (2010) basado en características morfológicas, de comportamiento y genéticas incluye dos nuevos taxones dentro del género *Apis*: *Apis breviligula* y *Apis indica* (Fig. 1).

Figura 1. Relaciones filogenéticas existentes entre los taxones del género *Apis* (Lo y col., 2010)



La caracterización molecular basada en el ADN mitocondrial (ADNmt) ha permitido profundizar en el estudio de la diversidad de *A. mellifera*, así como formular diferentes hipótesis sobre el origen y la evolución de las subespecies. Esta técnica, utilizada en los estudios taxonómicos y filogenéticos permite reconstruir relaciones antecesor-descendientes por la vía materna al heredarse sólo por el óvulo, ya que el espermatozoide no aporta generalmente mitocondrias al cigoto (Meusel y Moritz, 1993; De la Rúa y col., 2005). Como consecuencia, toda la descendencia de una misma reina comparte su ADNmt, el cual pasa sin alteración a obreras y zánganos, salvo que se produzcan mutaciones puntuales. Esta propiedad permite caracterizar a la abeja reina y a toda la colmena con sólo estudiar el ADNmt de una obrera, pudiendo considerarse un marcador molecular a nivel de colmena. Los resultados de los análisis realizados con esta técnica han permitido definir molecularmente cinco linajes evolutivos (Garnery y col., 1992; 1995; Franck y col., 1998; 2000; 2001; Palmer y col., 2000; Hernández, 2002), confirmando así la clasificación realizada previamente por Ruttner y col., (1978) en base a datos filogeográficos y morfométricos. De esta manera los cinco linajes son:

- Linaje A: constituido por especies africanas como *Apis mellifera intermissa*, *Apis mellifera scutellata* y *Apis mellifera lamarckii*.

- Linaje M: abarca subespecies de Europa Occidental, incluyendo *Apis mellifera mellifera* y *Apis mellifera iberiensis*.
- Linaje C: esta formado por subespecies de Europa Oriental, entre ellas *Apis mellifera ligustica*.
- Linaje O: incluye subespecies de Oriente Próximo como *Apis mellifera syriaca*, *Apis mellifera caucasica* y *Apis mellifera anatolica*.
- Linaje Y: formado por una única subespecie: *Apis mellifera yemenitica* de Etiopía.

A su vez, se han descrito diferentes haplotipos mitocondriales dentro de cada linaje en función de la región intergénica del ARN transferente de la leucina (ARNt^{leu}) y la subunidad II del gen de la citocromo oxidasa (COII) (Garnery y col., 1991).

En un estudio reciente (Whitfield y col., 2006) realizado sobre poblaciones representativas de abejas melíferas de todo el mundo, se analizaron los polimorfismos de un sólo nucleótido y se confirmó la hipótesis sobre los linajes de Ruttner (1988) que sitúa el origen de *A. mellifera* en África. Además postuló que las poblaciones occidentales y orientales de Europa se originaron en al menos dos expansiones hacia Eurasia y que el grupo M (abejas melíferas del occidente y norte de Europa) está filogenéticamente más próximo al grupo A (africano), que al grupo C (abejas melíferas de Italia y Europa oriental), mucho más próximo geográficamente.

En España, *A. m. iberiensis* tiene una naturaleza híbrida con un componente norteafricano (linaje A) predominante en el sur peninsular, que es gradual o abruptamente reemplazado hacia el norte por el linaje europeo occidental (linaje M) (Smith y col., 1991; De la Rúa y col., 1998; 2001a, 2001b; 2004a, 2004b; Cánovas y col., 2002, 2008, 2011). Por tanto, el linaje A presenta un gradiente latitudinal en la península ibérica con dirección sudoeste-noreste, en vez de ser simplemente sur-norte, lo que indica la existencia de un patrón de distribución atlántico ibero-marroquí. Además, existen áreas de hibridación de los dos linajes evolutivos (A y M) y en algunas comunidades como la Canaria, la Valenciana y Cataluña, existe un porcentaje variable del linaje C, aparentemente procedente de la importación de colmenas (De la Rúa y col., 1998, 2001b, 2004b, 2005; Cánovas y col., 2008, 2011).

2.2 Ciclo biológico e individuos de la colonia

La organización social de una colonia de *Apis mellifera* sigue una jerarquía de tres tipos de individuos o castas. Por un lado, la reina, el único individuo con capacidad reproductora; por otro, las obreras, que desempeñan diversas tareas según la edad y las necesidades de la colonia; y finalmente los zánganos cuya principal misión es fecundar a la reina.

El desarrollo de las castas desde huevo a adulto pasa por una serie de fases, semejantes en cuanto a las transformaciones que sufren en las metamorfosis, pero diferente en cuanto a duración (16 días las reinas, 21 las obreras y 24 los zánganos) y tipo de celdilla en la que se cría (las de mayor tamaño las de las reinas, seguidas por las de los zánganos y las más pequeñas las de las obreras).

El ciclo biológico de las abejas melíferas comienza cuando la reina pone un huevo en el fondo de cada celdilla y éste, a través de una secreción mucilaginosa, se fija de forma casi perpendicular. El huevo se inclina paulatinamente hasta quedar casi tumbado. Tres días después de la puesta nace una larva de color blanco perlado que es atendida por las abejas nodrizas. Esta larva realiza varias mudas y se va curvando progresivamente hasta que los extremos se juntan. En el instante en que las obreras sellan la celda con una fina capa de cera u opérculo, la larva se estira hacia arriba, hila con su boca un capullo de seda y se inmoviliza, pasando al estadio de ninfa o pupa. En ese momento comienzan a diferenciarse las tres regiones propias del insecto (cabeza, tórax y abdomen) y se van desarrollando patas, alas y antenas. Los primeros órganos que se colorean son los ojos, la piel se amarillea antes de oscurecerse para finalmente dar lugar, en un tiempo variable (Tabla 1), al individuo adulto que roe el opérculo y sale.

Tabla 1. Días de desarrollo de las distintas castas (Jean-Prost P, 1989)

		Reina	Obrera	Zángano
Celdilla abierta	Huevo	3	3	3
	Larva	5 y ½	6	6 y ½
Celdilla operculada	Ninfa	7 y ½	12	14 y ½
Ciclo completo		16	21	24

La **reina** es el único individuo con capacidad reproductora de la colmena. Procede de un huevo fecundado (diploide) que es alimentado única y exclusivamente con jalea real en todos los estadios de su vida. La reina virgen, después de varios vuelos de orientación, copula en un único vuelo (nupcial) con varios zánganos y guarda el semen en su espermateca. De acuerdo a las necesidades de la colonia, la reina puede poner huevos fecundados para criar obreras o sin fecundar para criar zánganos. Tiene una esperanza de vida de tres a cuatro años, sin embargo la capacidad reproductora máxima la alcanza alrededor de los dos años. Periódicamente es sustituida por una reina más joven capaz de reproducirse y secretar cantidad suficiente de feromonas reales que controlen el comportamiento de colectividad.

Las **obreras** son los individuos de menor tamaño pero más abundantes en número dentro de la colonia. Proceden de huevos fecundados que dan lugar a una larva que será alimentada con jalea real sólo los tres primeros días para después hacerlo con una mezcla de miel, polen y agua. Este cambio en la nutrición provoca la parada en el desarrollo de los órganos reproductores y su posterior atrofia.

La vida media de una abeja obrera varía según la época del año en la que nazca. Así, las abejas que se crían durante la primavera tienen una esperanza de vida como abeja adulta de unos 25-35 días, mientras que las que se crían a finales de verano o principios de otoño, pueden llegar a vivir entre seis y ocho meses (Maurizio, 1950; Free y Spenser-Booth, 1959).

Las tareas de las obreras dentro de la colonia varían a lo largo de su vida ya que existe una relación edad-actividad (Rösch, 1927). En los primeros días (7-12 días) se encargan de la limpieza de la colonia y la alimentación de la cría (abejas nodrizas). En este momento las glándulas hipofaríngeas encargadas de la producción de jalea real adquieren su estado máximo de desarrollo. A partir de la tercera semana de vida, la actividad se hace más variada y menos relacionada con la edad. Empiezan a realizar vuelos de orientación, tareas de limpieza, extracción de larvas y abejas muertas, distribución del polen en las celdas, construcción de panales, operculación de celdas, maduración del néctar, aplicación de propóleos, recepción de néctar de las abejas que regresan del campo e incluso funciones de vigilancia. Una de las tareas más importantes es la secreción de cera ya que sólo las obreras están dotadas con glándulas cereras. La cera se utiliza para la construcción de las celdillas de los panales donde se producirá tanto la metamorfosis de huevo a adulto como la reserva de alimentos (miel y polen) de la colonia.

En la última fase de su vida, la actividad fundamental de las obreras es la recolección o pecoreo. Las abejas pecoreadoras se encargan de recolectar polen, propóleo, néctar y agua y transportarlos al interior de la colmena. La trofalaxia es un comportamiento que permite la transferencia de alimento de la boca de una abeja a la boca de otra con lo cual el néctar recogido en el exterior puede transferirse directamente a un gran número de individuos dentro de la colmena. Las abejas de interior depositan el néctar en las celdillas y mediante diferentes acciones físicas eliminan el exceso de humedad y le añaden enzimas que portan en su saliva, dando como resultado la transformación del néctar en miel madura (17,5% H₂O). Una vez que las celdillas están llenas de miel se sellan con un opérculo de cera para evitar su fermentación.

Otra de las labores esenciales y que no depende ni de la edad ni de la casta es la termorregulación (Jones y Oldroyd, 2007). El buen desarrollo de la cría precisa que la temperatura de la cámara de cría se mantenga dentro de un rango de 32-36°C con un promedio de 34,5°C (Kronenberg y Heller, 1982). Las desviaciones en este estrecho rango causan malformaciones en las abejas adultas durante la metamorfosis.

Como se ha dicho anteriormente, las actividades de las obreras están relacionadas con la edad, pero esta relación puede variar según las condiciones dentro y fuera de las

colmenas. Las abejas de una misma edad cronológica tienen capacidad de cambiar con gran rapidez de “edad fisiológica”, pudiendo pasar a desarrollar tareas de abejas más adultas cuando fuese necesario (Robinson, 2002; Johnson 2003). Los factores responsables de este cambio son la vitelogenina (VTG) y la hormona juvenil (HJ). Cuando una hembra nace las concentraciones de ambas sustancias son altas, pero a partir de este momento la concentración de HJ comienza a bajar, mientras que la de VTG permanece estable. El cambio de comportamiento de nodriza a pecoreadora va acompañado de una inversión en dichas concentraciones, incrementándose los niveles de HJ en hemolinfa y disminuyendo los de VTG en el cuerpo de la abeja. La HJ posee el control regulatorio de la síntesis de VTG (Amdam y Omholt, 2002) y actúa como una especie de marcapasos que determina los cambios fisiológicos y de comportamiento necesarios en cada momento.

Por último, los **zánganos** son individuos de mayor tamaño que las obreras y proceden de huevos sin fecundar (haploides). Su misión principal es fecundar a las reinas vírgenes, aunque también participan en la termorregulación de la colmena. Una colonia normal comienza a criar unos cientos de zánganos en primavera, cuando la entrada de néctar es mayor. A finales de verano, la colonia se prepara para la invernada y las obreras les impiden alimentarse de los depósitos de miel. Al ser expulsados de la colmena y carecer de capacidad para succionar el néctar, mueren de hambre y frío. También son eliminados en situaciones de escasez de néctar en cualquier época del año.

2.3 Anatomía y fisiología

El cuerpo de las abejas está dividido en tres partes: cabeza, tórax y abdomen. Posee una estructura de sostén rígida, segmentada y articulada (exoesqueleto) que envuelve y protege los órganos y aparatos internos. Los segmentos del exoesqueleto están unidos por tejidos no quitinosos que le confieren al cuerpo cierta flexibilidad y que junto con los músculos adosados permiten el movimiento del insecto.

En la **cabeza** se encuentran la mayor parte de los órganos y aparatos sensoriales: las antenas, los ojos y el aparato bucal.

En la parte frontal asoman dos antenas que constituyen auténticas herramientas de trabajo. Están formadas por varios segmentos de diferente tamaño (artejos), en cuya parte final (flagelo) residen los sentidos del olfato, del tacto y del oído.

Las abejas poseen dos tipos de ojos. Los simples u ocelos son muy sensibles a las variaciones de la intensidad lumínica y desempeñan un papel fundamental en la visión cercana para labores dentro de la colmena. Los ojos compuestos son los receptores de luz más importantes y les proporcionan una visión panorámica, útil en los trabajos fuera de la colmena como la recolección y orientación.

Las abejas están dotadas de un aparato bucal lamedor-chupador que en función de su uso, se divide en dos partes: trompa o probóscide para succionar y mandíbulas para

sujetar. El aparato bucal se mantiene replegado cuando la abeja está volando o en reposo y lo extiende cuando se dispone a libar o durante la trofalaxia.

El **tórax** es el centro de locomoción y vuelo de la abeja. En él se insertan las patas y las alas, por eso los haces musculares de esta región son mucho más potentes que los del resto del cuerpo. El tórax se divide en cuatro segmentos: el protórax (1º anillo torácico), del que sale el primer par de patas con una estructura circular que sirve como limpiador de antenas; el mesotórax (2º anillo torácico), de donde sale el segundo par de patas y el primer par de alas, de constitución membranosa y surcadas por nervaduras que le dan consistencia; el metatórax (3º anillo torácico) donde se insertan el segundo par de alas y el tercer par de patas (de mayor tamaño). Sólo en el caso de las abejas obreras, la tibia de estas patas posee una superficie cóncava, bordeada de pelos que forma un espacio llamado corbícula donde cargan polen y propóleos. Finalmente el propodio, que es el segmento de unión entre tórax y abdomen.

El **abdomen** de las abejas posee nueve segmentos. Recubriendo su cara interna se encuentran el cuerpo graso constituido por finas capas celulares que actúan como una reserva de alimento. Asimismo, en el interior del abdomen se alojan las glándulas aromáticas o de Nassanov que secretan una feromona capaz de alterar el comportamiento de las abejas y que es utilizada para atraer a los demás miembros de la colonia. En la parte ventral de las obreras se encuentran las glándulas cereras. La cera se secreta con temperaturas ambientales superiores a los 25-30°C después de un alto consumo de miel o néctar.

La **anatomía interna** de la abeja se divide en aparatos y sistemas:

El aparato digestivo se abre anteriormente al exterior por la abertura bucal y discurre por el tórax a través de la faringe y el esófago. Una vez en el abdomen, el esófago se dilata para formar el buche melario donde ocurre la primera transformación del néctar en miel. A continuación, la válvula ventricular regula el flujo hacia la siguiente parte, el ventrículo o intestino anterior, donde tiene lugar la digestión de los nutrientes. En el último tramo de este aparato, se hallan el intestino medio o delgado, donde se realiza la absorción y en el que desembocan los órganos secretores o tubos de Malpigio con función depuradora; y finalmente el intestino posterior o ampolla rectal, una dilatación donde se almacenan los excrementos que se eliminan a través del orificio anal.

El sistema circulatorio está constituido fundamentalmente por la hemolinfa, un líquido de color ámbar claro que circula por las cavidades impregnando directamente a todos los órganos para distribuir los alimentos y eliminar los productos de desecho hacia los tubos de Malpigio.

El aparato respiratorio de la abeja está compuesto por un conjunto de tráqueas y sacos aéreos en el abdomen que ocupa gran parte de la cavidad corporal de la abeja y que cuando están cargadas de aire facilitan el vuelo. Las tráqueas se comunican con el exterior a través de los espiráculos respiratorios. Posee un total de 10 pares de espiráculos, de los cuales tres están en el tórax y siete en el abdomen, y el flujo de aire está regulado por una

membrana. La disposición especial del aparato respiratorio hace que el oxígeno del aire llegue directamente a los tejidos por lo tanto se habla de una respiración de tipo directo.

El sistema nervioso consta de un sistema central y otro estomatogástrico. El sistema central está formado por el ganglio cerebral y una cadena nerviosa ventral de siete ganglios que inervan una región del cuerpo. Este sistema se relaciona con el medio exterior a través de los nervios sensitivos y motores. El sistema estomatogástrico regula las actividades de los órganos y aparatos internos, así como la regulación de los espiráculos respiratorios y la digestión. Además, las abejas melíferas están dotadas de un sistema químico muy específico y desarrollado basado en el uso de feromonas que se encargan de coordinar y dirigir el comportamiento de la colectividad. Por un lado, la feromona real permite identificar a las obreras de la misma colonia, atraer a los zánganos en el vuelo nupcial, estimular la agregación de los enjambres o impedir la construcción de realeras; y por otro lado, las propias obreras pueden “comunicarse” entre ellas y agregarse.

El desarrollo del aparato reproductor depende de la casta. Mientras que en la reina y en los zánganos es completo, los órganos reproductores de las obreras están atrofiados tanto por el tipo de alimentación recibida en la fase larvaria como por el control de feromonas producidas por las glándulas mandibulares de la reina. Cuando ésta muere, su acción desaparece y unos días después, los ovarios de las obreras empiezan a desarrollarse e incluso pueden llegar a poner huevos. Al no haber cópula ni suministro de espermatozoides, los huevos no fecundados se desarrollarán por partenogénesis dando lugar siempre a individuos machos.

Los órganos genitales de los zánganos son dos testículos, dos canales eferentes, dos vesículas seminales que contienen los espermatozoides, dos glándulas mucosas, un canal eyaculador y un órgano copulador que después del apareamiento queda en el interior de la hembra, por lo que el macho mutilado acaba muriendo. En cuanto al aparato reproductor de la reina consta de dos grandes ovarios formados por tubos ováricos u ovariolas, donde se forman y maduran los óvulos. Las ovariolas confluyen en los oviductos y éstos a su vez en la vagina junto con el conducto espermático procedente de la bolsa encargada del almacenamiento de los espermatozoides (espermateca). En la vagina hay además una dilatación denominada bolsa copuladora donde tiene lugar la fecundación de los huevos que posteriormente saldrán a través del orificio situado bajo el agujón.

El aparato defensivo es propio de las hembras, por lo que está ausente en zánganos. Está formado en primer lugar por dos glándulas, una ácida y otra alcalina, que vierten sus secreciones hacia el receptáculo del veneno (Kerr y Lello, 1962; Lello, 1968; 1971). A continuación, se encuentra la vaina del estilete y el estilete (agujón) propiamente dicho dotado de un número variable de espinas (mayor en las obreras que en las reinas). En el agujón se segrega una feromona de alarma que las abejas melíferas utilizan para alertar a las obreras y estimular el comportamiento de picar así como para identificar a la víctima que es picada.

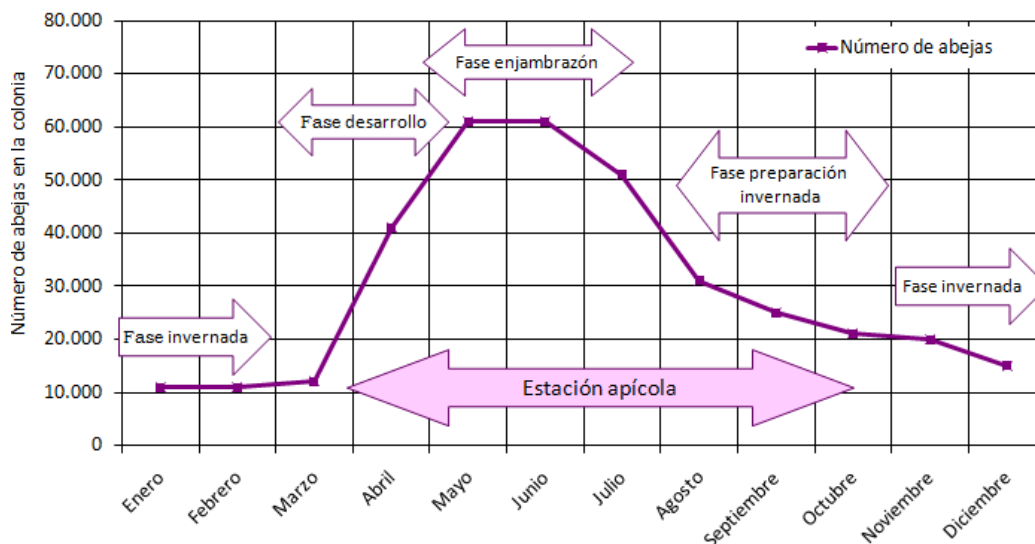
2.4 Biología de la colonia

Una colonia es un grupo de abejas melíferas compuesto por las tres castas (reina, obreras y zánganos) diferenciadas y especializadas en sus actividades. Estos individuos conviven en un determinado hábitat, interactúan intercambiando alimentos y otras sustancias necesarias para su vida, y trabajan juntas como una comunidad. De este modo, mantienen una estructura dentro de una compleja sociedad que permite la supervivencia indefinida del grupo mientras que los individuos tienen una vida de corta duración. Se hablaría de colmena, en el momento que el apicultor traslada la colonia a sus cajones ya que en la naturaleza, la colonia puede ocupar un hueco de un árbol, grietas en roca, recipientes o construcciones humanas. Debido a las características del apareamiento natural una colonia de abejas es una gran familia (con una madre común, la reina) formada por varias subfamilias (que tienen el padre en común: cada uno de los zánganos que se aparean con la reina). De esta manera, en un mismo momento, hay dentro de la colonia individuos (obreras) con diferente grado de parentesco.

La población de abejas melíferas en una colmena en un país mediterráneo como España pasa por las siguientes fases (Fig. 2):

- **Fase de invernada:** comienza a finales de otoño y se prolonga hasta el inicio de la primavera. A lo largo de este período la actividad de la colonia disminuye notablemente ya que la falta de floraciones, la bajada de temperatura exterior y las adversas condiciones climáticas obligan a las abejas a mantenerse en el interior de la colmena. El tamaño de la colonia en esta fase, oscila entre los 5.000 y los 15.000 individuos y está formada en su mayor parte por abejas obreras (AFSSA, 2009). La cría se detiene debido al descenso de la temperatura exterior y al desgaste energético que supone ya que en este momento las funciones de la colonia se reducen básicamente a mantener la temperatura. Para ello las abejas se agrupan formando una bola compacta (racimo o piña) y se alimentan de las reservas de miel que tienen cerca. Cuando la temperatura interior desciende hasta los 10°C ó 12°C, las abejas se entumescen y se mueven con dificultad. Si el descenso continúa, se paraliza totalmente y no se mueven ni para acercarse a panales cercanos de miel, llegando incluso a morir de frío y/o hambre. En aquellos asentamientos con inviernos templados donde la temperatura mínima no baja de los 2°C ó 3°C y cuando la colonia es fuerte, la cría de las abejas puede mantenerse aunque la cantidad siempre es muy pequeña.

Figura 2. Fluctuación teórica de la población de abejas de una colonia en el curso de un año en climas templados (AFSSA, 2009)



- **Fase de desarrollo:** es una etapa de expansión que se caracteriza por el trabajo en el campo y por la cría de abejas en el interior. Comienza con la llegada de la primavera que trae consigo la aparición de polen, la elevación de la temperatura y el mantenimiento de la humedad relativa apropiada para la incubación de las larvas. Tanto si se trata de una reina virgen recién fecundada como de una reina fecundada con anterioridad, comienza la puesta y durante este período la reina pone entre 800 y 2000 huevos al día, pudiendo llegar a los 3000 en el momento más álgido de la expansión. Estos huevos pueden ser fecundados, dando origen a hembras o sin fecundar, originando zánganos. La colmena se llena de panales de cría y el número de individuos en la colonia oscila entre los 40.000 y 60.000 (AFSSA, 2009).

- **Fase de enjambrazón:** Esta fase puede darse o no y en caso de hacerlo, es principalmente en primavera o principios de verano. Se trata de un mecanismo natural para la división o multiplicación de la colonia de abejas. Se han descrito diferentes factores desencadenantes: falta de espacio dentro de la colmena, aumento de la temperatura de la colonia, reducción o falta de feromona real, desequilibrio entre nodrizas y pecoreadoras, presencia de agentes patógenos, genética, climatológico e idiopático. Sean cuales sean las circunstancias y determinantes que inducen a una colonia a enjambrazar, una vez que la abeja reina de más edad decide hacerlo, abandona la colmena, llevándose consigo un grupo numeroso de obreras y dejando a la reina más joven a cargo de lo que queda de la colonia original. Esta fase es un punto crucial en el manejo apícola de la colonia ya que el apicultor puede organizar una estrategia de manejo que la evite.

- **Fase de preparación para la invernada:** Bien entrado el otoño, la colonia comienza a reducir de volumen y se concentra como preparación para la etapa invernal. Una de las estrategias seguidas por las obreras es evitar la entrada de los zánganos a la colmena

que debido a su incapacidad para succionar no pueden alimentarse en la naturaleza por ellos mismos y terminan muriendo. Las abejas en las piqueras realizan un movimiento hacia los lados y parece que estuvieran limpiando algo con las mandíbulas. Todas las colonias lo realizan y pocos días después empiezan a colocarse formando la típica bola compacta de la invernada y la actividad tanto exterior como interior se reduce, llegando a cesar prácticamente por completo. En situaciones de sequía, cuando se adelanta el final de las floraciones, las abejas pueden llegar a prepararse equivocadamente para la invernada y con la llegada de las floraciones de inicio de otoño realizan una pequeña recolección aunque pronto vuelven a su situación de reposo. Esto demuestra la perfecta sintonía entre la colonia de abejas y la flora del lugar. Sin embargo mientras las condiciones climáticas exteriores sean adversas y sobre todo siempre que la temperatura del ambiente esté por debajo de 10°C, las abejas permanecerán recogidas en la colmena.

3 Agentes nosógenos de *Apis mellifera iberiensis*

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 (RD 209/2002). Tanto el concepto de salud como el de enfermedad 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. Por eso, cuando se habla de enfermedad en apicultura, entendida ésta como cualquier otro animal de renta, se puede hablar de un estado clínico o subclínico sanitario y/o productivo.

Una colonia de abejas melíferas es susceptible a la acción de diversos agentes nosógenos. Entendemos por agente nosógeno aquel que es capaz de producir un daño o perjuicio en el organismo de la abeja al no reconocerlo como propio, 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 incrementado 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 se pueden clasificar en varios grupos. Por razones académicas se expondrán clasificados como agentes nosógenos bióticos (de origen parasitario o infeccioso) y agentes nosógenos abióticos (pesticidas).

3.1 Agentes nosógenos bióticos

Dentro del grupo de agentes bióticos que afectan a las abejas melíferas, destacan los que tienen un origen parasitario y los que poseen un origen infeccioso.

Los parásitos son organismos vivos que viven a expensas de otro de distinta especie (hospedador), alimentándose de él y debilitándolo, pudiendo en ocasiones causar su muerte. Estos agentes nosógenos pueden llegar a desarrollar una enfermedad en las abejas cuando coexisten con otros factores que favorecen su transmisión, desarrollo, multiplicación o virulencia.

En función de la localización de los agentes parasitarios en los hospedadores, se puede hablar de parásitos externos (ectoparásitos), los que se sitúan en la superficie del hospedador, o bien de parásitos internos (endoparásitos), aquellos que viven en el interior de su organismo, ya sea en las cavidades orgánicas, en las vísceras, bien en el lumen o en el seno de los tejidos, en situación intercelular o intracelular (Martínez y Cordero del Campillo, 1999). Ambos grupos de parásitos son organismos con un alto grado de organización lo que les ha permitido adaptarse perfectamente a este modo de vida. A lo largo de su evolución, han desarrollado estrategias para evitar los mecanismos de defensa de los hospedadores (en este caso, las abejas melíferas) e incluso algunos han conseguido ser resistentes a los medicamentos que se aplican para su control. Las colonias de abejas pueden soportar infestaciones leves, sin embargo en infestaciones masivas causan graves daños e incluso pueden llevarlas a la muerte.

Es importante diferenciar entre parasitismo y parasitosis. Parasitismo es la relación que se establece entre dos especies, ya sean vegetales o animales. En esta relación, se distinguen dos agentes biológicos: el parásito, que vive a expensas de la otra especie, a la que se le denomina hospedador. La parasitosis es una enfermedad cuyo agente etiológico es un parásito. Puede ser subclínica o clínica y establece un *continuum* con el parasitismo entre la presencia de algunos parásitos no lesivos a una patología grave por su elevado número.

Por otro lado, los agentes bióticos de origen infeccioso pueden ser a su vez de tipo bacteriano, fúngico y/o vírico.

Las bacterias son individuos primitivos, sin una membrana nuclear alrededor de su material genético, y carentes de otras muchas estructuras que aparecen en las células de organismos superiores. Algunas bacterias son autosuficientes (autótrofas), sin embargo otras dependen de la materia orgánica (heterótrofas) y se comportan como parásitas,

simbiontes o saprofitas. Las bacterias parásitas que afectan a las abejas tienen una alta especificidad por ciertos tejidos de su hospedador.

Los hongos son microorganismos con unas características especiales que hacen que se comporten como parásitos de otros seres vivos o como saprofitos. Los hongos que afectan a las abejas son microscópicos y pertenecen al orden de los *Ascomphaerales*.

Los virus que afectan a las abejas melíferas pueden atacar a diferentes estadios y castas de la colonia. Aunque normalmente producen infecciones inaparentes (sin signos de enfermedad), los virus afectan igualmente al buen estado sanitario de las abejas, acortando su vida bajo ciertas condiciones (Ball y Allen, 1988; Martin, 2001).

Dentro de los agentes bióticos que afectan a las abejas melíferas, destacan por su prevalencia e importancia económica las siguientes:

3.1.1 *Varroa destructor*

Este ácaro provoca en las abejas una enfermedad denominada varroosis y afecta a las abejas en todas sus fases de desarrollo. Es una de las enfermedades más graves de *A. mellifera* y, si no es convenientemente controlada, produce una alta mortalidad en las colonias de abejas. Existen otras especies de *Varroa* en distintas partes del mundo.

Hasta el año 2000 se consideraba que las abejas melíferas europeas (*A. mellifera*) estaban parasitadas por la especie *Varroa jacobsoni*. Este ácaro fue descrito por Oudemans en 1904 en la abeja melífera oriental *Apis cerana* en la Isla de Java (Indonesia). Posteriormente se detectó en abejas de otros países asiáticos y europeos por lo que se asumió que este parásito había sido capaz de parasitar a un nuevo hospedador y distribuirse por todo el mundo. No obstante, estudios genéticos recientes, realizados por Anderson y Trueman (2000), han demostrado que el ácaro que parasita a *A. mellifera* es diferente al descrito por Oudemans para *A. cerana* y que el Género *Varroa* es en realidad un complejo de al menos cuatro especies de ectoparásitos obligados, tal como se indica en la Tabla 2.

Tabla 2. Especies del género *Varroa*

Parásito	Hospedador
<i>V. jacobsoni</i> (Oudemans, 1904)	<i>A. cerana</i>
<i>V. underwoodi</i> (Delfinado-Baker y Argaawal, 1987)	<i>A. cerana</i>
<i>V. rindereri</i> (De Guzmán y Delfinado-Baker, 1996)	<i>A. koschevnikovi</i>
<i>V. destructor</i> (Anderson y Trueman, 2000)	<i>A. cerana/A. mellifera</i>

Anderson y Trueman (2000) identificaron 18 haplotipos distintos en base a la subunidad I del gen de la citocromo oxidasa (COI) del ADNm. Seis de los cuales se redefinieron como una nueva especie denominada *Varroa destructor*. Hasta el momento, sólo dos de estos seis haplotipos de *V. destructor* han conseguido infestar y reproducirse en *A. mellifera* (Anderson y Fuchs, 1998): el coreano (K) y japonés/thailandés (J), que reciben su

nombre conforme a su distribución inicial. Actualmente, el haplotipo de *V. destructor* más prevalente de los dos es el coreano (Anderson y Trueman, 2000) que ha sido descrito en colonias de África, Europa, Asia y América mientras que la distribución del haplotipo japonés/thailandés se reduce a Japón, Tailandia y América (Anderson y Trueman, 2000; De Guzmán y col., 1998; Garrido y col., 2003; Muñoz y col., 2008). El haplotipo coreano se caracteriza por su alta patogenicidad y virulencia para *A. mellifera* (De Guzmán y Rinderer, 1999) y es el único capaz de desarrollar mecanismos de resistencia a los acaricidas utilizados para su control (Anderson y Trueman, 2000). Aunque en los estudios realizados con microsatélites no se han encontrado casi polimorfismos dentro de los dos haplotipos (Solignac y col., 2003; 2005), recientemente se ha sugerido (Navajas y col., 2010) que los haplotipos J y K, serían en realidad dos haplogrupos (J1 y K1) con dos haplotipos cada uno (J1-5 y J1-6; K1-2 y K1-5). No obstante, hasta el momento sólo se ha podido demostrar que dos de los haplotipos nuevos (J1-5 y K1-2) colonizan *A. mellifera*; en los otros dos (J1-6 y K1-5), está pendiente saber si se trata de un hallazgo ocasional o si realmente estos ácaros se pueden reproducir en la abeja europea.

Distribución de *Varroa*

Los ácaros del Género *Varroa* se encontraron en la región de la costa este de la USSR (1952), en Pakistán (1955), Japón (1958), China (1959), Bulgaria (1967), Paraguay (1971), Alemania (1977), Estados Unidos (1987) (Ruttner y Ritter, 1980; De Guzmán y Rinderer, 1999). Hoy en día, *V. destructor* es casi cosmopolita, aunque todavía no se ha descrito en Australia (AQIS, Gobierno australiano: <http://daff.gov.au/aqis/quarantine/pests-diseases/honeybees>).

Morfología de *Varroa destructor*

Los ácaros *V. destructor* muestran un marcado dimorfismo sexual (Ifantidis, 1983) con adaptaciones morfológicas a su hospedador. Las hembras son diploides, con forma elíptica y un tamaño de 0,8-1,5 mm de longitud y de 1,3-1,9 mm de anchura. En cambio, los machos son haploides, con forma triangular y un tamaño claramente inferior al de la hembra (0,75 x 0,8 mm).

Una característica común para ambos sexos es la división del cuerpo en dos partes bien diferenciadas, el idiosoma y el gnatosoma. El idiosoma comprende la mayor parte del cuerpo del ácaro con una placa dorsal y varias ventrales. El gnatosoma es una estructura compacta en forma de tubo situado antero-ventralmente donde se encuentran las piezas bucales.

La hembra de *V. destructor* tiene un idiosoma aplastado, en forma de elipse con una coloración entre rojiza y marrón (Fig. 3). Las placas dorsal y ventrales altamente esclerotizadas (escleritos) están unidos mediante membranas delgadas y flexibles que le permiten a la hembra dilatarse durante la alimentación y la formación del huevo. La parte dorsal está recubierta por numerosos pelos protectores rígidos y ramificados. En la parte ventral se observan parte de los aparatos bucal, respiratorio, excretor y reproductor. El

grado de esclerotización en el macho es mucho menor, reduciéndose a las patas y al escudo dorsal, y su coloración es ligeramente amarillenta.

Figura 3. *Varroa destructor*: hembra (izquierda) y macho (derecha)



El aparato bucal situado en el gnatosoma está adaptado para perforar y succionar, además de desempeñar una función sensorial. La apertura bucal está rodeada por unos labios y en su interior aparece un par de apéndices denominados quelíceros. Son duros, afilados y están formados por tres segmentos (basal, medio y distal). El segmento distal es móvil en hembras y tiene dos pequeños dientes que, además de facilitar la rotura y penetración del aparato bucal en la membrana intersegmentaria de la abeja para nutrirse, colaboran en la fijación del ácaro a su hospedador (De Ruijter y Kaas, 1983). En los machos, el segmento distal se transforma en una estructura con forma de cánula denominado espermatodáctilo que permite transferir el esperma al tracto genital femenino (Milani y Nannelli, 1988).

En la hembra de *Varroa*, el ano se encuentra situado sobre el esclerito anal y sobre el esclerito epiginial se abre el orificio genital. Por el contrario, el macho presenta un esclerito esternogenital y anal mucho más desarrollados aunque menos delimitados.

Los orificios respiratorios se localizan también lateralmente, en el esclerito dorsal, próximos al lugar de inserción de las patas y se alargan para formar el peritrema. Las patas de la hembra son más fuertes y cortas que las de los machos en relación a la talla del cuerpo. El primer par de patas se dirige hacia el aparato bucal y los otros tres se curvan hacia la parte posterior.

Es importante destacar que los aspectos morfológicos de este ácaro que demuestran su clara adaptación al parasitismo son el aparato genital y los órganos sensoriales.

El aparato reproductor femenino está dividido en dos partes. La primera está formada por un ovario, un útero y una vagina que se dirige al orificio genital a través del cual salen los huevos. La segunda parte permite la recepción y maduración del esperma en las espermateca, y se comunica con el exterior a través de unos conductos espermáticos que se abren al exterior por los gonosporos.

El aparato reproductor masculino está formado por un único testículo en la parte posterior del cuerpo. Del testículo emergen dos vasos deferentes que se funden en un conducto eyaculatorio para posteriormente abrirse al orificio genital. El esperma pasa por ocho fases de maduración, seis de las cuales tienen lugar en el cuerpo masculino y las otras dos después del apareamiento en el interior del aparato reproductor femenino.

Biología de *Varroa destructor*

Aunque la mayoría de los estudios dieron por hecho que el ácaro presente en *A. mellifera* en Europa o EE.UU. era *Varroa jacobsoni*, actualmente se reconoce que sólo podían haber sido realizados en *Varroa destructor*. En cualquier caso, este ácaro es un parásito obligado, fuertemente adaptado a su hospedador. Se alimenta de la hemolinfa de las abejas melíferas que parasita y carece de una fase de vida libre. De hecho la esperanza de vida sin su hospedador no supera los dos días (De Guzmán y col., 1993).

En el ciclo biológico de *V. destructor* se distinguen dos fases: una fase forética y una fase reproductiva. La fase forética se desarrolla entre los segmentos abdominales y torácicos de las abejas adultas y tiene una duración variable que oscila entre siete y ocho días y varios meses, dependiendo de la presencia o ausencia de cría en las colmenas. Esta fase sólo se presenta en varroas adultas hembras ya que tanto los machos como las fases intermedias no sobreviven fuera de la cría. Las abejas jóvenes suelen presentar cargas parasitarias superiores a las abejas de mayor edad dedicadas a tareas de pecorea (Donzé y col., 1998; Harris y Harbo, 2001).

La fase reproductiva se desarrolla en el interior de la cría operculada de las colmenas y tiene una duración variable (12-15 días) dependiendo del tipo de cría parasitada (obrera-zángano). Para reproducirse, una o varias varroas hembras, fecundadas o no, penetran en una celdilla de abeja o zángano justo antes de ser operculada. Se ocultan en el fondo de la celdilla, en el alimento para la larva, en espera de que las abejas nodrizas la cierren. Aproximadamente cinco horas (h) después de la operculación de la celdilla, la larva ha consumido todo el alimento (Ifantidis y col., 1988) y las varroas aprovechan para subirse al cuerpo del hospedador y succionar su hemolinfa. A continuación la larva defeca y teje el capullo. Mientras tanto, el ácaro permanece sobre su cuerpo para no quedar atrapado entre el capullo y la pared de la celdilla, lo que le impediría alimentarse. Los ácaros de *Varroa* siempre se alimentan en la zona abdominal de la abeja, evitando dañar las extremidades, mandíbulas y alas del hospedador, que podría suponer que la abeja no fuese capaz de romper el opérculo llegado el momento y muriese, quedando el ácaro y sus descendientes atrapados en la celdilla (Donzé y col., 1998).

Es entonces cuando comienza la oogénesis del ácaro, seguida por la vitelogénesis (Steiner y col., 1994; 1995; Garrido y col., 2000). Aproximadamente 70 h después de la operculación tiene lugar la puesta del primer huevo (Ifantidis, 1983; Steiner y col., 1994) sobre el capullo, en la parte anterior de la celdilla. El tamaño medio de los huevos de *Varroa* es de 0,6 x 0,5 mm. El primer huevo está normalmente sin fecundar y debido al sistema de

determinación del sexo haploide-diploide, se desarrolla un macho haploide, mientras que los siguientes huevos puestos en un intervalo de 30 h, son hembras fértiles (Ifantidis, 1990; Martin, 1994; Rehm y Ritter, 1989). *Varroa* puede poner hasta cinco huevos en cría de obreras y hasta seis huevos en cría de zánganos en lo que se considera como un “programa reproductivo” normal (Martin, 1994; 1995; Garrido y Rosenkranz, 2003).

El ácaro se desarrolla dentro del huevo durante las primeras horas después de la oviposición (Nannelli, 1985), después eclosiona y sale una larva hexápoda con patas rudimentarias sin segmentar. La protoninfa es la primera fase móvil, de color blanco con cuatro pares de patas y de contorno redondeado. Son de tamaño variable, siendo las protoninfas que darán lugar a las hembras, de mayor tamaño que las que se desarrollarán como machos. La siguiente fase, la deutoninfa, no está esclerotizada y presenta cuatro pares de patas que son largas en el macho y cortas y robustas en la hembra.

El tiempo total de desarrollo de *Varroa* desde la puesta del huevo hasta la muda a adulta es de 5,8 días para las hembras y 6,6 días para los machos (Ifantidis, 1990; Donzè y Guerin, 1994; Martin, 1994).

La madre ácaro de *Varroa* prepara en la cutícula de la pupa un único orificio de alimentación para que las ninfas se alimenten a través de él. Esta “zona de alimentación” está generalmente localizada en la porción ventral del quinto segmento y cerca del denominado “lugar de acumulación fecal” (Donzè y Guerin, 1994; Kanbar y Engels, 2003). Este comportamiento es parte del “cuidado parental” necesario para la alimentación de las formas inmaduras, ya que éstas son incapaces de atravesar la cubierta de la pupa de la abeja. Se establece un sistema de turnos rotatorios de tal forma que sólo un ácaro se alimenta en un momento dado sobre la abeja (Donzè, 1995). Después de la alimentación, los ácaros regresan al lugar de acumulación fecal (Donzè y Guerin, 1994). Aunque este comportamiento facilita la organización interna de varios ácaros en el reducido espacio disponible, ocasiona un efecto de competencia por ocupar el orificio de alimentación en casos de multiparasitación.

Las varroas alcanzan la madurez sexual inmediatamente después de la última muda. Los machos la alcanzan antes que las hembras y están en el lugar de acumulación fecal, esperando que la primera hembra adulta mude a adulta 20 h más tarde o a su madre en el caso de varroas sin fecundar. Como la reproducción sólo puede ocurrir en el interior de la celdilla de cría, los machos empiezan a aparearse tan pronto se desarrolla la hembra (Donzè y col., 1996).

El apareamiento múltiple es común, hasta que la siguiente hembra hija madura y llega al lugar de acumulación fecal. De hecho, se necesitan varios apareamientos para llenar la espermateca con hasta 35 espermatozoides (Donzè y Guerin, 1994; Donzè y col., 1996).

Cuando la abeja nace, hay uno o dos ácaros hembras maduros (fecundadas o no) que se prenden directamente al nuevo hospedador al que abandonan para colocarse sobre abejas de más de dos días de vida (Kraus, 1993; Kuenen y Calderone, 1997). Cuando sale de

la celdilla, la propia abeja la limpia por lo que elimina al macho y a todas las formas inmaduras que pueda haber, al retirar los restos de la muda.

Este ciclo se repite siempre que hay cría en la colmena; durante los períodos estivales en los que existan unas diez generaciones de abejas, el número de ácaros puede aumentar de manera exponencial (Lange y col., 1976).

Epidemiología de la varroosis

La varroosis está directamente condicionada por la estrecha relación existente entre los ácaros y las abejas. El parásito (*Varroa*) y su hospedador original (*A. cerana*) han sufrido a lo largo de los años una evolución paralela hasta alcanzar un equilibrio biológico que asegura la supervivencia de ambas especies (Rath, 1999). Este equilibrio se basa en la exclusiva reproducción del ácaro en las celdillas de zángano (Martin, 1997; Anderson, 2000; Garrido, 2004) ya que las abejas son capaces de detectar y extraer los ácaros que invaden las celdillas de obrera y de descubrir rápidamente la muerte de la cría de zángano cuando es invadida por varias hembras de *Varroa* a la vez y extraerla, disminuyéndose notablemente el número de ácaros viables.

Sin embargo, entre la abeja europea (*A. mellifera*) y *Varroa* no ha existido esta coevolución. Los primeros datos de adopción de esta nueva especie de abeja como hospedador se remonta a principios del siglo XX.

Los dos haplotipos de *V. destructor* capaces de infestar a *A. mellifera* (Anderson y Fuchs, 1998; Navajas y col., 2010) hasta la fecha, puede reproducirse tanto en cría de zánganos como de obreras y el control de la población parasitaria no es tan eficaz, alcanzando elevadas cargas parasitarias con importantes repercusiones patológicas (Harris y Harbo, 2001). No obstante, el índice reproductivo real, entendido éste como el número de adultos viables en la descendencia por ácaro madre, depende entre otras cosas de la fertilidad del ácaro (reproducción sí o no) y de la fecundidad (número de descendencia por ciclo reproductivo) bajo condiciones naturales. Martin (1994, 1995) señaló que el índice reproductivo en cría de obrera infestada por un único ácaro es de 1,3-1,45 y en la cría de zángano donde el periodo de operculación es más largo, el índice reproductivo sería de 2,2-2,6. A lo largo de su vida, una varroa hembra puede llevar a cabo hasta siete ciclos reproductivos bajo condiciones de laboratorio (De Ruijter, 1987) y entre dos y tres ciclos reproductivos en condiciones de campo (Fries y Rosenkranz, 1996; Martin y Kemp, 1997).

En cuanto a la fertilidad, podemos decir que un cierto porcentaje de hembras de *Varroa* que entran en las celdillas de la cría de obreras o zánganos, no ponen huevos. Este porcentaje varía ligeramente en función de la especie o subespecies del hospedador y de las condiciones climáticas, lo cual podría contribuir a las diferencias en la tolerancia de las abejas europeas (Fries y col., 1994; Rosenkranz, 1999). En el caso de subespecies de abejas melíferas europeas este porcentaje estaría alrededor del 5-20% (Rosenkranz y Engels, 1994; Rosenkranz, 1999; Garrido y col., 2003). Por tanto, parece que la baja fertilidad del ácaro

depende más de las subespecies hospedadoras que de los haplotipos del ácaro (Rosenkranz y Engels, 1994).

Otro factor importante a la hora de diferenciar el índice reproductivo es la mortalidad de la descendencia de la cría dependiendo del clima y de la estación del año (Ifantidis y col., 1999; Mondragón y col., 2005, 2006). Las diferentes fases de desarrollo de *Varroa* se alimentan de hemolinfa, fundamentalmente de las fases larvianas de la abeja. Durante el invierno las hembras del ácaro se encuentran sobre las abejas adultas, ya que se trata de un periodo sin cría en la colonia de abejas. Los ácaros se fijan entre los terguitos tercero y cuarto ventrolateralmente preferentemente por el lado izquierdo. Esta posición facilita el contacto de las piezas bucales con la porción central del ventrículo de la abeja, accediendo a una hemolinfa con una mayor concentración de nutrientes. Al comienzo del invierno, la parasitación media de las abejas puede ser de un único ácaro por individuo, pero al final es fácil encontrar dos o más ácaros por abeja y con una gran movilidad. La mortalidad de los ácaros en invierno parece ser menor que la de las abejas, y los ácaros son capaces de desplazarse con facilidad entre sus hospedadores antes de que éstos mueran y caigan al fondo de la colmena. Estas hembras que han sobrevivido al invierno son las responsables de la continuación del ciclo biológico en primavera (Bowen-Walker y col., 1997).

La reproducción del ácaro de *Varroa* está fuertemente sincronizada con el desarrollo de la cría del hospedador. Debido a que *Varroa* únicamente puede reproducirse durante el periodo de operculación de la abeja melífera, cuanto más largo es este periodo, más numerosa será la descendencia (Fuch y Langenbach, 1989).

Las hembras de *Varroa* tienen una clara preferencia por las larvas de zángano (Fuchs y Langenbach, 1989). Esta predilección hace que en la época de producción de los zánganos, la infestación en celdillas de obreras baje hasta un 3%, mientras que las de zángano se encuentran infestadas del 70-100%. En esta preferencia intervienen factores tales como el mayor tamaño de la celdilla o la mayor cantidad de lípidos en cría de zánganos (Trouiller y col., 1994).

Sin duda las señales químicas volátiles juegan un papel crucial no sólo en la orientación y hallazgo del hospedador adecuado, sino también durante todas las fases del ciclo biológico de *Varroa*. Los ácaros hembra se sienten atraídos por varios extractos químicos de la cutícula de las larvas e incluso algunos de estos extractos estimulan la oviposición de los ácaros (Trouiller y Milani, 1999). Le Conte y col. (1989, 1990) definieron un efecto hormonal de tres ésteres secretados por las larvas de las abejas y comprobaron que también estimulan el comportamiento de operculación en las colmenas. La larva de zánganos produce cantidades ligeramente más altas durante un periodo de tiempo más largo lo que apoya también la preferencia en la infestación de los zánganos (Le Conte y col., 1989; Calderone y Lin, 2001).

Además de la larva en sí misma, tanto el capullo como el alimento de las larvas tienen un papel químico importante en la atracción de las hembras de *Varroa*. En el primer caso,

por la presencia de alcoholes alifáticos y aldéhdidos con longitud de cadena de 17 a 22 carbonos y en el segundo caso, por la presencia de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular (Donzè y col., 1998; Calderone y Lin, 2001).

En el interior del nido de cría también se ha demostrado la presencia de componentes naturales con un marcado efecto repelente para las hembras de *Varroa*. Por un lado, una kairomona de la larva de la reina, aunque en bajos niveles (Trouiller y col., 1994); y por otro, el ácido octanoico de la jalea real, en mayor proporción que en la comida de las obreras o de los zánganos. Estas dos sustancias explicarían la baja infestación de la celdillas reales (Harizanis, 1991; Trouiller y col., 1994).

No obstante, la infestación de hembras de *Varroa* está también influenciada por algunos factores físicos. Las celdillas con poca distancia entre la larva y el borde de la misma así como las de abejas europeas, son infestadas más frecuentemente. Lo mismo sucede en las celdillas viejas de cría con restos de capullos de varios ciclos de cría en comparación con los cuadros recién construidos. En este caso, el tamaño más pequeño de las celdillas viejas es presumiblemente compensado por el fuerte olor de los capullos (Piccirillo y De Jong, 2003).

La duración de vida del parásito es muy variable. Se puede decir, a partir del recuento de ácaros que se realiza sobre las hojas de papel impregnadas de vaselina que se colocan sobre el fondo de la colmena, que las hembras viven unos dos o tres meses en verano y entre cuatro y seis meses en invierno (Sanmataro y col., 2000).

La dispersión de la enfermedad se produce cuando los ácaros penetran en una colonia sana, no parasitada. Los aportes externos de ácaros a una colonia de abejas son determinantes en el desarrollo de la enfermedad. Una de las principales vías de acceso de este parásito se debe al pillaje (Nazzi y col., 1995), actividad realizada por abejas pecoreadoras de una colmena sana sobre una colonia debilitada, llevándose sus reservas de miel y por ello entrando en contacto con varroas u otros agentes nosógenos que pudieran estar presentes.

Las colonias libres de ácaros también pueden infestarse por la deriva de abejas pecoreadoras, que no son sino pérdidas de orientación de individuos cargados de néctar a los que se les permite la entrada a una colmena de la que no proceden. También existe deriva en los zánganos, que no tienen colmena propia y que en un momento determinado pueden transportar ácaros a una colonia libre y crear un nuevo foco.

La trashumancia y el comercio de enjambres parasitados es, junto a la trashumancia, realizados sin el adecuado control y desparasitación, son dos de las principales razones de la rápida dispersión de la varroosis por amplias zonas de territorio español.

El manejo del apicultor es otro parámetro que hay que considerar en esta infestación por *V. destructor*. El desdoblamiento de colonias enfermas o el fortalecimiento de colmenas sanas con abejas y cuadros de cría parasitados han intervenido decisivamente para iniciar nuevos focos.

La existencia de colonias silvestres parasitadas es un factor que tiene cada vez menos relevancia debido a la desaparición de la mayoría de las colonias de este tipo principalmente a causa de *Varroa*. Además se ha comprobado que la infestación de los enjambres silvestres es menor que la del resto de las colonias (Wilde y col., 2005).

Repercusiones patológicas de la varroosis

Varroa destructor ejerce una acción patógena característica sobre la abeja individual (adulta o cría) y otra diferente sobre la colonia de abejas.

Signos clínicos en las abejas

La acción patógena de *Varroa* sobre las abejas se debe, por una parte a la acción directa del parásito sobre el hospedador, dado que se alimenta de hemolinfa (De Jong y col., 1982a), y por otra, a la posibilidad de vehicular diferentes agentes patógenos, fundamentalmente virus (Boecking y Generesh, 2008) e interferir en la respuesta inmunitaria de las abejas frente a estos agentes (Yang y Cox-Foster, 2007).

Varroa afecta tanto a las abejas adultas como a las fases de desarrollo, sin embargo son las fases de larva y pupa las que claramente representan la población más sensible y por eso, las repercusiones son mucho más marcadas en aquellas zonas geográficas en las que existe cría de abejas durante la mayor parte del año.

En primer lugar, la succión de hemolinfa de los ácaros adultos y sus descendientes tienen repercusiones muy negativas. Esta pérdida de hemolinfa durante el desarrollo dentro de la celdilla de cría disminuye significativamente el peso de la abeja en metamorfosis. La pérdida de peso depende del número de ácaros madre de *Varroa* y la cantidad de ácaros en fase de reproducción que se alimentan de una larva, pero incluso en una infestación con un único ácaro la pérdida media de peso del cuerpo es del 7% de las abejas en desarrollo (De Jong y col., 1982a) alcanzando el 21,6% si en la celda se encuentran tres ácaros y su descendencia. En los zánganos, la pérdida de peso varía entre 11-19% dependiendo de la tasa de infestación (Duay y col., 2003) y va unida a una disminución en su actividad de vuelo (Duay y col., 2002). Las obreras parasitadas durante su desarrollo, empiezan más temprano la fase de pecoreo y tienen una esperanza de vida significativamente reducida (De Jong y col., 1982a; Amdam y col., 2004). Asimismo, las abejas parasitadas durante la metamorfosis no son capaces de compensar las pérdidas de peso cuando son trasladadas a colonias sin parasitar e incluso su longevidad es menor (Bowen-Walker y Gunn, 2001). Por otro lado, las pecoreadoras parasitadas muestran disminuida la capacidad de aprendizaje no asociado, prolongando ausencias de la colonia y una menor tasa de regreso a la colonia (Kralj y Fuchs, 2006; Kralj y col., 2007) que pueden ser debida a una reducida habilidad para volar (Ruano y col., 1991).

La presencia de uno o varios ácaros en la celda de cría influye en el porcentaje de proteínas totales y en las distintas fracciones proteicas. Aunque existen importantes discrepancias Weinberg y Madel (1985) encontraron una reducción del 27-50%, Sadov

(1976) señala una disminución del 15-20% y De Jong y col. (1982a) citan pérdidas entre el 6-17%. Por su parte, Yang y Cox-Foster (2007) indican que las abejas recién nacidas presentan un 18% menos de proteína soluble en la hemolinfa que las abejas no parasitadas, presentando un peso significativamente menor las primeras. En cuanto a la composición de la hemolinfa, se ha observado una variación de las distintas fracciones proteicas que componen tanto en la cría de obreras como en la de zánganos. Las abejas parasitadas con un ácaro presentan sólo un descenso en las proteínas de bajo peso molecular, mientras que las que tienen tres o más parásitos también tienen una notable disminución de las fracciones de alto peso molecular (Kolev y Shabanov, 1989).

Las alteraciones morfológicas se centran fundamentalmente en deformaciones de alas, del abdomen o de las patas. De Jong y col., (1982a) consideran estas alteraciones como el efecto externo de la pérdida de hemolinfa. Aunque en la mayoría de los estudios hay una estrecha relación entre el número de parásitos y la presencia e intensidad de alas deformadas y limitada capacidad de vuelo, este efecto se observó en el 24% de las pupas parasitadas sólo con un ácaro (Marcangeli y col., 1992). Actualmente esta deformidad en las alas se considera directamente relacionada con la presencia del virus de las alas deformadas (Chen y col., 2005; 2006; Yang y Cox-Foster, 2007).

El grado máximo de parasitación que puede soportar una ninfa de abejas está calculado en unos ocho ácaros (De Jong y col., 1982a). En estos casos, la ninfa muere antes de la eclosión y es retirada por las abejas limpiadoras. Si existe una reina joven y vigorosa en la colmena es posible que estas pérdidas se compensen por un tiempo.

El efecto sobre las abejas adultas es menor ya que los ácaros pasan menos tiempo sobre ellas y los niveles de parasitación suelen ser más bajos. En cierta manera actúan como hospedadores de transporte y el efecto observado es una disminución en el tamaño de las glándulas hipofaríngeas (Schneider y Drescher, 1987). Esta atrofia de las glándulas repercute en la cantidad y calidad de la jalea real y puede ser la causa de que las abejas parasitadas vuelen fuera de la colmena a los siete días de nacer, en lugar de los doce que tardan en salir las no parasitadas (Schneider, 1986). Casi un 36% de estas abejas no regresa a la colmena tras el primer vuelo y tanto la duración media del vuelo por abeja y día, como el número de vuelos al día están notablemente mermados. También se han demostrado en las abejas adultas, modificaciones del comportamiento (respuesta a alimentos azucarados), en la actividad del vuelo y en la orientación, lo que produce alteraciones en la eficacia del pecoreo y la recolecta de reservas para la colmena (Kralj y col., 2007; Kralj, 2010).

El cálculo de la acción succionadora de hemolinfa en las abejas adultas por *Varroa* es complicado y se ha establecido en relación con la variación del peso total del ácaro. El consumo de hemolinfa durante dos horas en primavera y verano asciende al 26-41% del peso del cuerpo del ectoparásito, lo que representa aproximadamente, un 0,1% del peso total de la abeja obrera (Smirnov, 1978).

Papel vectorial de *Varroa*

Un aspecto importante de *V. destructor* es su papel como vector de algunos de los 18 virus aislados hasta ahora en las abejas (Chen y Siede, 2007). Esto se ha comprobado para el virus Kashmir, el de la cría ensacada, el de la parálisis aguda, el israelí (Di Prisco y col., 2011), el de las alas deformadas (Boecking y Genersch, 2008) y el de la parálisis lenta (Denholm, 1999). Inicialmente la incidencia de ácaros de *Varroa* y virus de abejas se había considerado como un problema menor de la salud de las abejas (Allen y col., 1986; Bailey y Ball, 1991; Bowen-Walker y col., 1999; Yue y Genersch, 2005). Sin embargo, actualmente se considera que muchas de las alteraciones patológicas y mortalidad detectadas en colmenas fuertemente parasitadas por *Varroa*, están relacionadas con la acción sinérgica del parásito y los virus que transmite, o aquellos a los que activa su replicación. Esto se debe fundamentalmente a la capacidad del ácaro de producir inmunosupresión en las pupas parasitadas mediante la supresión en la expresión de los genes de la lisozima, de la fenol-oxidasa y la reducción en la expresión del gen de la himnoptaecina (Yang y Cox-Foster, 2007). Obviamente la inyección directa de partículas víricas en el hemocele de la pupa de abeja y la activación de las infecciones de virus latentes a través de la inyección adicional de proteínas salivares extrañas del ácaro puede provocar signos clínicos de enfermedad (Tentcheva y col., 2004) ya que al igual que sucede con las garrapatas, la saliva de *Varroa* podría inhibir la respuesta inmunitaria de la abeja (Yang y Cox-Foster, 2005).

Signos clínicos en la colonia

Desde el punto de vista de la apicultura como actividad agropecuaria, la parasitación por *Varroa* produce grandes pérdidas económicas y un daño irreversible de la colonia. La forma física y la capacidad reproductiva de las colonias de abejas infestadas, entendida como un “superorganismo” son reducidas, incluso si la infestación es moderada. Los zánganos parasitados durante su desarrollo tienen una probabilidad de aparearse significativamente baja (Duay y col., 2002) y las colonias infestadas producen menos enjambres (Fries y col., 2003; Villa y col., 2008).

La presencia de ácaros molesta a las crías que muestran un mayor movimiento dentro de las celdas y son frecuentemente extraídas por las abejas nodrizas y retiradas de la colmena. La reina vuelve a oviponer en estas celdas evacuadas, apareciendo una puesta no homogénea que puede confundirse con otros cuadros patológicos de la cría de abejas como la loque americana.

La estrecha relación establecida entre los efectos patológicos y el número de ácaros conlleva ineludiblemente una latencia larga de la enfermedad. Por su localización dentro de las celdas o sobre abejas de interior, los ácaros no son fáciles de observar. La varroosis es clínicamente inaparente hasta que casi un 20-30% de la población está afectada (Popa, 1985). La colonia se debilita progresivamente debido al acortamiento de la vida media de las abejas, a su falta de dinamismo y a una menor tasa de repoblación por pérdida de crías parasitadas. Las abejas adultas tienen grandes dificultades para el vuelo, se reduce la

actividad de pecoreo y cuidados de la cría, la reina disminuye la puesta y sobreviene la desorganización social de forma acelerada con pérdidas de producción, e incluso, abandono de la colmena (Rademacher, 1988).

Diagnóstico de la varroosis

La varroosis es una de las enfermedades recogidas por la OIE (2012), de comunicación semestral en la UE (lista C del anexo I del RD 617/2007) y los métodos recomendados (OIE, 2008) para su diagnóstico se basan en la detección de las hembras adultas de *V. destructor* sobre las abejas o en el interior de la cría, o de la presencia de sus deyecciones.

1. Examen de los fondos de colmena

Es un método sencillo que se basa en recoger del fondo de la colmena los ácaros muertos por causas fisiológicas o como consecuencia del comportamiento de limpieza de las abejas.

Para ello, se colocan una cartulina engrasada en el fondo de la colmena o un doble fondo de malla con una cartulina o bandeja. Tras 24-48 h se retira la cartulina y se identifican las varroas con ayuda de una lupa. La aplicación de un tratamiento acaricida en la colonia de abejas aumenta el número de varroas que se recogen con este sistema y se mejora la eficacia del diagnóstico.

En caso de que hubiese grandes cantidades de detritus en el fondo de la colmena, éstos pueden ser examinados en el laboratorio usando un procedimiento de flotación (Brem, 1980).

2. Examen de la cría

En este método se examina la cría de zánganos preferentemente o en su ausencia, la cría de abejas de la zona periférica de los cuadros. Para ello se eliminan los opérculos de cera de las celdillas con un cuchillo. Posteriormente se extraen las larvas con unas pinzas o se lavan las celdillas con agua a presión sobre un tamiz que retenga a éstas. El líquido recogido se pasa por un segundo tamiz de 1 mm de luz que retiene las varroas adultas.

3. Examen de las abejas

En este método se utilizan 200-250 abejas adultas de cuadros de cría no operculada. Las muestras deben tomarse de dos a tres cuadros y de varias colmenas del colmenar. Las abejas se matan introduciéndolas en un contenedor con alcohol, agua y alcohol a partes iguales o acetato de etilo. Se agita durante 5-10 min y a continuación se separan las abejas de los ácaros mediante un tamiz de 3 mm de malla. Las varroas se desprendan de las abejas adultas y se puedan identificar fácilmente sobre una cartulina blanca.

Para cuantificar el número de ácaros en la muestra, Llorente (1993) propuso la utilización de un contador digital de colonias bacterianas que permite la agilización del recuento.

Además existen una serie de métodos no recogidos en el manual de la OIE (2008) pero de gran interés para la identificación de *V. destructor*.

4. Examen de las deyecciones del ácaro (Erickson y col., 1994)

En los cuadros de la cámara de cría donde *Varroa* parasita la cría de abejas, se pueden apreciar las deyecciones de los ácaros con cierta facilidad. Estas deyecciones están compuestas fundamentalmente por guanina y son de color blanco-amarillento. Su presencia dentro de las celdillas que tuvieron cría indica la presencia del parásito. Este método es válido solamente en parasitaciones moderadas o graves.

5. Identificación molecular del haplotipo (Anderson y Fuchs, 1998).

Para la determinación del haplotipo de *V. destructor* se sigue una reacción de PCR-RFLP sobre el gen COI y con la utilización de las enzimas de restricción *XhoI* y *SacI*.

6. Diagnóstico diferencial

Bajo determinadas circunstancias, el ácaro *Varroa* puede confundirse con otros parásitos, por eso debe realizarse un diagnóstico diferencial con *Braula coeca* y *Tropilaelaps* spp. que causa daños similares a las colonias de abejas.

Braula coeca Nitzsch (Diptera, Braulidae) es un díptero braquícero. Por su aspecto y comportamiento suele llamársele erróneamente piojo de la abeja ya que se trata en realidad de una mosca cuyas alas se han atrofiado. Aunque pueden afectar a todas las castas (Smith, 1978), tiene predilección por la reina ya que el alimento que ésta recibe es de mayor calidad. Dado que generalmente se localizan en la parte dorsal del tórax de las abejas adultas, puede llegar a confundirse con *V. destructor*. Las abejas se muestran inquietas y friccionan el cuerpo con las alas con el fin de desprenderse del díptero. No obstante, el potencial dañino es mínimo y reside básicamente en la capacidad de las formas larvarias de *B. coeca* de excavar túneles bajo los opérculos de las celdillas con miel lo que puede alterar su calidad por un aumento en el porcentaje de humedad. Una de las características que ayudará en el diagnóstico diferencial con *V. destructor*, es que este ácaro posee cuatro pares de patas, cuerpo ovalado y un tamaño ligeramente mayor.

Por otro lado, la enfermedad causada por los ácaros del género *Tropilaelaps* (Acari: Lealapidae) afectan a la cría de las abejas sociales (*Apis* spp.). Hasta hace poco se pensaba que el género *Tropilaelaps* estaba compuesto por dos únicas especies: *Tropilaelaps clarae* (Delfinado y Baker, 1961), *Tropilaelaps koenigerum* (Delfinado-Baker y Baker, 1982a). Sin embargo, estudios moleculares recientes demostraron que se trataba en realidad de un conjunto de cuatro especies, añadiendo a las ya conocidas, dos nuevas: *Tropilaelaps mercedesae* y *Tropilaelaps thaii* (Anderson y Morgan, 2007).

Estos parásitos se alimentan de la larva y de la pupa de las abejas, provocándole malformaciones e incluso la muerte, lo que puede llegar a producir una notable disminución de la colonia. En cuanto a las repercusiones patológicas que se pueden observar en las abejas adultas son malformaciones anatómicas similares a los provocados por *Varroa*: abdómenes distorsionados, alas rechonchas y patas deformadas o amputadas (Sammataro y col., 2000). Algunas de las abejas afectadas pueden incluso aparecer arrastrándose en la piquera de la colmena (Atwal y Goyal, 1971).

La tropielalapsosis es una enfermedad de declaración obligatoria en la UE (lista C del anexo I del RD 617/2007) y los métodos de diagnóstico recomendados por la OIE (2008) se basan precisamente en la identificación del agente etiológico y el diagnóstico diferencial con *V. destructor*.

Control de la varroosis

El RD 608/2006 regula el Programa nacional de lucha y control de las enfermedades de las abejas melíferas en España y establece que es obligatorio al menos un tratamiento frente a la varroosis con un producto de uso veterinario en el período de septiembre a noviembre. Para este tratamiento, el apicultor recibe una ayuda económica a través del Plan Apícola Nacional. Asimismo, se recomienda un segundo tratamiento siguiendo las mismas indicaciones que para el primero.

Hoy en día los apicultores pueden escoger entre un amplio número de sustancias químicas y naturales para combatir los ácaros de *V. destructor*, así como técnicas de manejo y métodos biológicos que contribuyen a controlar esta parasitosis. Dentro de los compuestos con acción acaricida frente a la varroosis, destacan por su utilización y regulación, los que se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Principales compuestos utilizados en los tratamientos frente a *V. destructor*

Familia	Compuesto	Producto comercial
Piretroides	Fluvalinato*	Apistan® Klartan®, Mavrick®
	Flumetrina*	Bayvarol®
Derivados nitrogenados	Amitraz	Apivar®, Mitac-20®
Organofosforado	Clorfenvinfós	Supona®
	Clorpirifós	Clorpirifos®
	Cumafós	Perizin®, Checkmite+®, Asuntol®, Malation®
	Clorpirifós	Clorpirifos
Organoclorado	Tetradifón*	Tedión®
	Bromopropilato*	Folbex VA®
	Endosulfán*	Thionex®, Thidan®
Ácidos orgánicos	Ácido oxálico*	
	Ácido fórmico*	
	Ácido láctico*	
Aceites esenciales	Timol*	Apilife VAR®, Apiguard®
	Mentol*	Apilife VAR®,
	Alcanfor*	Apilife VAR®,
	Eucaliptol*	Apilife VAR®,

* No se exigen LMR en miel según el Reglamento (UE) 37/2010

El fluvalinato y el cumafós son los principios activos más utilizados. El método de aplicación es a través de unas tiras de plástico impregnadas con el compuesto que se colocan en el interior de la colmena, entre los cuadros de abejas. De esta manera, los compuestos entran en contacto con las varroas foréticas que se encuentran en las abejas adultas (Burgett y Kitprasert, 1990). El tratamiento se aplica en primavera, y cuando es necesario y sólo si no hay floración, se repite en otoño.

Si bien la mayoría de estos compuestos se aplican bajo las fórmulas comerciales que se indican en la Tabla 3, en muchos casos los apicultores han utilizado estos mismos principios activos de un modo artesanal, con dosis y duraciones del tratamiento no supervisadas por un veterinario. Como consecuencia, estos tratamientos resultan ineficaces y pueden conllevar incluso la pérdida de la colonia, sin descartar el elevado riesgo de someter al ácaro a dosis subeficaces y dejar residuos en los productos de la colmena.

Estas opciones químicas para controlar *Varroa* pueden provocar un serio problema, ya que exposiciones repetidas al mismo pesticida selecciona ácaros resistentes (Gerson y col., 1991). De hecho, ya se han descrito resistencias al fluvalinato en varios países mediterráneos como Italia (Lodesani y col., 1995; Milani, 1995) y Francia (Colin y col., 1997). La detección también de poblaciones al cumafós (Spreafico y col., 2001) y al amitraz (Milani, 1999; Mathieu y Faucon, 2000; Elzen y col., 2000; Rodríguez-Dehaibes y col., 2005) tiene una indiscutible repercusión, debido a que son las principales moléculas de síntesis que se han empleado como alternativa al fluvalinato durante los últimos años.

Los métodos biotécnicos se basan fundamentalmente en el manejo de la colonia y el objetivo es cortar el ciclo biológico del parásito para mantener la población de *Varroa* a unos niveles que no originen problemas sanitarios. Algunos de estos métodos son:

- Tratamiento térmico (Komissar, 1979): Se expone a la colonia de abejas a temperaturas superiores a los 38°C, lo que afecta negativamente a la vitalidad de las varroas. El problema es que se puede afectar a la cría ya que su umbral térmico de tolerancia es similar al del ácaro (44-45°C y 42°C durante dos días) (Engels y Rosenkranz, 1992)
- Cría de zánganos: se aprovecha la preferencia de los ácaros por las larvas de zánganos. Se introducen cuadros con cera estampada para zánganos en la parte central de la colmena. Una vez que las obreras las operculan, se retiran los cuadros y se destruyen (Imdorf y col., 1996).
- Utilización de cuadros trampa: Se confina a la reina, mediante excluidores en un cuadro vacío (Maul y col., 1988) y se mantiene en la colonia hasta que lo completa y todo está operculado, forzando la entrada de varroas en el mismo, tras lo cual se destruye.
- Espolvoreo de sustancia inertes como polvo inerte (Ramírez, 1989; 1994), harina (Shah y Shah, 1988; Loglio y Pinessi, 1992; 1993) o azúcar en polvo (Fakhimzadeh, 2000; 2001) sobre la colonia de abejas. Se cree que las partículas de polvo inutilizan las ventosas

tarsales de las varroas lo que evita la adhesión de las mismas y estimula además el instinto de limpieza de las abejas.

Otra medida que se puede tomar es la selección de razas de abejas resistentes a *V. destructor* basadas en el carácter higiénico. Éste se considera el mecanismo primario de la resistencia de las abejas melíferas a una variedad de enfermedades (Rothenbuhler, 1964; Spivak y Gilliam, 1993; Spivak y Reuter, 2001) y se define como la habilidad para detectar y sacar cría enferma o parasitada. Este comportamiento está determinado por varios genes que se expresan como recesivos, razón por la cual esta conducta se manifiesta en muy baja frecuencia en poblaciones naturales. La sustitución de una reina usando una buena reserva de abejas con carácter higiénico, ha llegado a ser uno de las prácticas más comunes para hacer frente a la enfermedad. Además se ha demostrado que en abejas de líneas no higiénicas se puede inducir comportamiento higiénico mediante estímulos suficientemente fuertes. Las colmenas genéticamente seleccionadas para tener una buena higiene son capaces de sacar de la colmena las larvas enfermas y de controlar la varroosis, con la producción final de miel significativamente mayor que en las colmenas comerciales no seleccionadas (Spivak y Reuter, 1998).

3.1.2 *Acarapis woodi*

La acarapisosis o acariosis es una patología de *A. mellifera* y de otras abejas del género *Apis* causada por el ácaro *Acarapis woodi* conocido también como el ácaro traqueal ya que se alimenta y reproduce en las tráqueas de las abejas adultas (Rennie y col., 1921; Delfinado-Baker y Baker, 1982b).

Distribución de *Acarapis woodi*

Acarapis woodi (Rennie) fue descrito por primera vez en 1921 en la Isla de Wight. En los siguientes 30 años se identificó en numerosos países europeos, siendo diagnosticada la enfermedad por primera vez en España en 1949 (Blanco-Loizelier, 1949; Ramirez-Gómez, 1949) en la zona mediterránea y posteriormente estudiada su incidencia por Pajuelo y Fernández-Arroyo (1979) y Orantes y col., (1997).

El ácaro *A. woodi* está actualmente distribuido en América (Delfinado-Baker, 1984), Asia y África y sólo el continente australiano permanece libre de este parásito (Mathenson, 1993, 1996).

En 1906, en la isla de Wight frente a la costa sur de Inglaterra, se presentó una inusual mortalidad de abejas sin ninguna causa aparente (Adam, 1968). Fue entonces cuando, como resultado de la investigación realizada para descubrir el origen de la que se había denominado “enfermedad de la isla de Wight”, se identificó el ácaro traqueal *Tarsonemus woodi* (Rennie y col., 1921), Posteriormente Hirst (1921) lo denominó *Acarapis Woodi* (latín: *acar*=ácaro; *apis*=abeja) o ácaro traqueal. Entre 1906 y 1919, la mortalidad de colonias se extendió a través de Gran Bretaña a Irlanda, al resto de Europa, Asia, África,

Sudamérica y finalmente Norteamérica (Bailey y Ball, 1991). Desde entonces se asoció el ácaro traqueal con estas muertes de colonias, pero nunca ha habido consenso sobre la causa real de la “enfermedad de la isla de Wight” y la duda sobre el papel de *A. woodi* en la mortalidad de las colonias está todavía sin esclarecer (Bailey, 1985, 1999; Adam, 1987; Collison, 2001).

Dentro del género *Acarapis*, además de *A. woodi*, hay otras dos especies que se asocian a las abejas melíferas adultas pero que aparentemente no son patógenas: *Acarapis externus* y *Acarapis dorsalis*. A diferencia de *A. woodi* que vive exclusivamente en las tráqueas (sólo se externaliza para infestar otro hospedador). *A. externus* habita en el área membranosa entre la región posterior de la cabeza y el tórax; y *A. dorsalis* se encuentran generalmente en el surco de la placa dorsal, entre las alas (Delfinado-Baker y Baker, 1982b). Es importante tener en cuenta estos detalles sobre todo a la hora de hacer un diagnóstico diferencial sobre todo por detección molecular.

Morfología de *Acarapis woodi*

Acarapis woodi es un artrópodo de la clase de los arácnidos, por lo tanto posee cuatro pares de patas y al igual que sucedía con *V. destructor* presenta dimorfismo sexual (la hembra de mayor tamaño que el macho) y la división del cuerpo en dos partes diferenciadas, el gnatosoma y el idiosoma que a su vez está dividido en podosoma (parte anterior) y opistosoma (parte posterior).

La hembra adulta de *A. woodi* mide 143-175 x 77-81 μm (Delfinado-Baker y Baker, 1982b). El gnatosoma es elongado y está formado por dos palpos dirigidos anteriormente y dos estiletes quelicerales largos, finos, puntiagudos apicalmente y estriados en toda su longitud que se juntan con el labro durante la alimentación para formar un canal que permite aspirar la hemolinfa. En toda la superficie están presentes unos largos pelos táctiles denominados setas que el ácaro utiliza para localizar los espiráculos de las abejas y trasladarse por su cuerpo (Sammataro y Needham, 1996). El idiosoma es ovoide, casi piriforme, más ancho entre el segundo y tercer par de patas, con apariencia lisa y brillante y de color blanquecino o blanco perlado. En general, el grado de esclerotización es débil en todas las placas tanto dorsales como ventrales. El endoesqueleto del ácaro está formado por varios apodemas donde se insertará la musculatura. Los cuatro pares de patas están espaciados. Las patas del primer par son robustas y presentan una única garra enganchada, el segundo y tercer par tienen cada uno garras pares y el cuarto es más corto donde el fémur y el tibio-tarso funcionan como un único segmento (Delfinado-Baker y Baker, 1982b).

El tamaño de los machos oscila entre 125-136 x 60-77 μm . La forma de su cuerpo es similar al de la hembra excepto por las diferencias sexuales y los apodemas III y IV que están poco desarrollados. En general las patas de los machos son más largas que las de la hembra, siendo las del primer par más robustas que el resto (Delfinado-Baker y Baker, 1982b).

Biología de *Acarapis woodi*

La hembra adulta fecundada de *A. woodi* penetra sólo a través del primer par de espiráculos ya que este orificio tiene un diámetro mayor que la de los demás y sin ningún tipo de cierre que dificulte su accesibilidad. Una vez dentro, el ácaro se sitúa en las tráqueas torácicas y ocasionalmente en los sacos aéreos torácicos y abdominales de las abejas jóvenes (menores de cuatro días de vida). La oviposición comienza tres días después de que la hembra haya entrado en la tráquea (Fig. 4) y tres días más tarde eclosiona una larva hexápoda que mudará a ninfa y finalmente a adulto. La duración del ciclo completo es menor en los machos (11-12 días) que en las hembras (14-15 días) (De Jong y col., 1982b; Royce y col., 1988; Baley y Ball, 1991; Sammataro y Needham, 1996).

Figura 4. Huevos de *A. woodi* en el interior de las tráqueas de una abeja



Los ácaros adultos de *A. woodi* utilizan su aparato bucal de tipo picador-chupador para perforar la tráquea de la abeja melífera y alimentarse de su hemolinfa (Hirschfelder y Sachs, 1952). También en el interior de las tráqueas se produce el apareamiento. Sólo las hembras fecundadas salen de la abeja huésped en busca de otra abeja joven a la que parasitar (Royce y col., 1988) y lo hacen a través del primer espiráculo torácico desde donde trepan a un pelo del tórax aferrándose a su punta con una o ambas extremidades posteriores, a la espera del contacto con otra abeja. Cuando una nueva abeja contacta con la vieja hospedadora, la hembra de *A. woodi* utiliza las extremidades anteriores para agarrarse a un pelo de la abeja nueva y cambiar de hospedador. A continuación desciende a la superficie del cuerpo donde los ácaros son atraídos hacia la región del primer espiráculo torácico por la vibración de las raíces de las alas y hacia las entradas de los espiráculos por las bocanadas de aire que salen de ellos (Hirschfelder y Sachs, 1952). Ésta es la única forma de emigrar de *A. woodi* ya que son incapaces de encontrar un nuevo huésped en los panales de miel o en las flores.

Epidemiología de la acarapisosis

Las abejas más susceptibles a la infestación por *A. woodi* son las más jóvenes, normalmente menores de cuatro días de vida (Gary y col., 1989). Esto es debido primero, a

la presencia de ciertos carbohidratos que hace a las abejas de esta edad químicamente más atractivas (Smith y col., 1989; Phelan y col., 1991); segundo, a que los pelos que rodean el primer espiráculo traqueal se van endureciendo con la edad, constituyendo una barrera difícil de superar (Sachs, 1952); tercero, a que los espiráculos de las abejas más mayores tienen un mecanismo de cierre más eficiente; y finalmente, a que el mecanismo de acicalamiento que les permite a las abejas desalojar los ácaros con el segundo par de patas se desarrolla con la edad.

Pese a que todas las castas son susceptibles a la parasitación por *A. woodi*, los ácaros tienen una cierta preferencia por los zánganos (Royce y Rossingnol, 1990). De hecho, se ha encontrado un mayor número tanto de ácaros hembras migratorias como del resto de las fases del desarrollo en zánganos que en las abejas obreras (Dawicke y col., 1992).

Todas las fases de desarrollo de *A. woodi* están dentro de las tráqueas (Hirschfelder y Sachs, 1952) e incluso se pueden encontrar al mismo tiempo (De Jong y col., 1982b). Únicamente las hembras fecundadas pasan un breve periodo fuera de la tráquea en busca de nuevos hospedadores (Sammataro y Needham, 1996). Inician su dispersión cuando las abejas infectadas tienen 13 días y alcanzan un pico máximo cuando las abejas tienen entre 15 y 25 días (Pettis y Wilson, 1996). Asimismo se ha comprobado que la difusión es mayor, o al menos tiene más éxito, por la noche que por el día (Pettis y col., 1992).

La época reproductiva de *A. woodi* es en otoño e invierno (Pettis y Wilson, 1996; Ottis y col., 1988; Scott-Dupree y Otis, 1988) y el contagio dentro y fuera de la colonia se produce siempre de forma directa, por contacto entre abejas, viéndose favorecida por los climas húmedos y fríos (Otis y Scott-Dupree, 1992). No es frecuente que el contagio se produzca a través del material apícola, ya que los ácaros viven muy poco tiempo fuera del hospedador. El índice de supervivencia depende de la temperatura, humedad o estado de alimentación del ácaro y varía mucho según la estación del año. En primavera, se sitúa entre las 12-15 h; en verano, entre 26-28 h; en otoño, de 30-40 h; y en invierno, alrededor de las 120 h (Sammataro y Needham, 1996).

El pillaje de colmenas sanas por parte de las parasitadas, la deriva de abejas y sobre todo la comercialización de paquetes de abejas y reinas, así como de colonias infestadas, ha favorecido la diseminación del ácaro en gran parte del mundo.

Los datos de Royce y col. (1988) apuntan a que las hembras de *A. woodi* ponen una media de seis huevos durante el periodo de tiempo que están en el interior de la tráquea, sin embargo los experimentos realizados por Pettis y Wilson (1996) fijan la tasa de oviposición en 0,85 huevos por hembra por día durante los 16 días de vida adulta sin tener en cuenta la estación. Estos autores afirman además que en todas las estaciones, en abejas de 24 días de edad se produce un pico de población, disminuyendo bruscamente la puesta a partir de ese día en abejas de primavera y verano, y más lentamente en abejas de otoño e invierno. Asimismo, la mortalidad de los ácaros aumenta con la edad del hospedador, siendo 35 días la longevidad de las hembras de *A. woodi* (Pettis y Wilson, 1996).

La carga parasitaria está condicionada por diversos factores como el estrés, la edad de las abejas, la fortaleza de la colonia y el flujo de néctar, además la intensidad de estos factores influyen en la esperanza de vida de las pecoreadoras siendo la vida de una abeja enferma un 30% más corta que el de una abeja sana (Royce y Rossignol, 1990). Morse (1978) estimó un 5% de reducción en la población de una colonia de abejas infestadas por *A. woodi*, a pesar de que las reinas infestadas pueden vivir por muchos años (Fyg, 1964). Tanto la producción de miel como de polen recogido también disminuyen cuando la colonia está afectada por este parásito.

Repercusiones patológicas de la acarapisosis

La infestación por el ácaro no causa una enfermedad aguda ni pérdidas devastadoras, pero la vida de las abejas puede acortarse. Además los signos clínicos sólo se manifiestan en casos de infestaciones severas.

La presencia de ácaros en la tráquea produce lesiones y oscurecimiento o manchas irregulares en la misma, ya que las deyecciones de los ácaros tienen guanina que al contacto con el aire que circula por la tráquea, se oxida y adquiere un color oscuro o negruzco. Cuando la cantidad de individuos (larvas, ninfas y adultos) presentes en la tráquea aumenta, se produce una obstrucción mecánica de las vías respiratorias que dificulta la respiración de las abejas e incluso pueden llegar a morir por asfixia. De forma indirecta se producen una degeneración de los músculos de las alas por el aporte insuficiente de oxígeno que incapacita a la abeja para volar. A esto se suma la extracción de la hemolinfa por parte de los ácaros, la contaminación de la misma por su saliva, y el posible papel como vector de virus y bacterias (Scott-Dupree y col., 1995). Todo ello contribuye al debilitamiento generalizado de la abeja que facilitan el contagio y aparición de otras enfermedades.

Finalmente, la abeja parasitada no tiene capacidad para volar, se arrastra sobre el terreno delante de la colmena, su cuerpo tiembla, se mueve de forma desordenada, con el abdomen más o menos distendido, es probable que sufra diarrea y que las alas se presenten perpendiculares al cuerpo, caídas o dislocadas (OIE, 2008). De hecho, se puede observar una alfombra de abejas ante la piquera que se arrastran por el suelo y se frotan el abdomen con las patas traseras. La tasa de mortalidad es variable y la presencia de estos síntomas son comunes a otras enfermedades de la abeja adulta.

En colmenas parasitadas por *A. woodi* se observa una mayor agresividad así como una predisposición a la enjambrazón debido al estrés que causa el parásito.

Diagnóstico de la acarapisosis

La acarapisosis es una de las enfermedades que deben ser comunicadas semestralmente a la UE (lista C del anexo I del RD 617/2007, OIE 2012). Debido a la falta de una sintomatología característica, el único diagnóstico eficaz es el que se puede realizar en el laboratorio, para lo cual la OIE (2008) recomienda una serie de técnicas.

Es importante subrayar que no hay métodos fidedignos para la detección de muy bajos niveles de infección y que la tasa de infección del 1-2% se puede detectar si se muestrean al menos 50 abejas (Giordani, 1970; Frazier y col., 2000). Asimismo, la visualización de ácaros es más fácil sobre abejas viejas (reinas, zánganos u obreras) ya que tienen más ácaros.

1. Disección de las abejas

1.1. Preparación directa (Ritter, 1996; Wilson y col., 1997)

Sobre una muestra de 50 abejas por colmena, se realiza la separación del tórax de la abeja de la cabeza para la observación de las tráqueas torácicas así como las primeras ramas de las tráqueas de la cabeza mediante un estereomicroscopio. Si hubiese melanización en una o ambas tráqueas o presencia de cuerpos ovoides translúcidos (huevos), el diagnóstico sería positivo ya que las tráqueas saludables son claras o blancas.

Para la confirmación de infestaciones leves se puede hacer un examen microscópico de las tráqueas a 100 aumentos para poder ver ácaros adultos o las demás fases del desarrollo.

1.2. Maceración (Ritter, 1996)

El fundamento de esta técnica es similar al anterior, la diferencia radica en que el tórax se corta en finos discos y se le añade una solución de hidróxido potásico (KOH) que facilita la visualización del primer par de tráqueas bajo un microscopio.

2. Moler con ácido láctico (Colin, 1979)

El ácido láctico sin diluir utilizado sobre un triturado de tórax se encarga de disolver las fibras musculares para mejorar la visualización microscópica de la posible presencia de ácaros.

3. Tinción con azul de metileno (Peng y Nasr, 1985)

La tinción con azul de metileno también facilita la observación de *A. woodi* ya que se tiñe el ácaro pero no las tráqueas.

Los dos últimos métodos no nos permiten conocer la ubicación exacta del parásito, por lo que se hace necesario establecer un diagnóstico diferencial con *A. dorsalis* y *A. externus*. Ritter (1996) fijó una serie de puntos diferenciales entre las tres especies que sirven para distinguirlas con el microscopio (Tabla 4).

Tabla 4. Diagnóstico diferencial de las tres especies del género *Acarapis* (Ritter, 1996)

Carácter	<i>A. dorsalis</i>	<i>A. externus</i>	<i>A. woodi</i>
Muesca en la placa coxal	Profunda	Corta	Plana
Espacio entre estigmas torácicos	16,7 µm	16,8 µm	13,9 µm
Longitud del tarso (par de partas IV)	7,6 µm	11,4 µm	7,5 µm

4. Métodos inmunológicos

Hace tiempo se utilizaron varias técnicas ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) basados en las reacciones antígenos-anticuerpos (Grant y col., 1993; Ragsdale y Furgala; 1987; Ragsdale y Kjer, 1989).

5. Visualización de guanina

Mozes-Koch y Gerson (1997) describieron un método basado en la visualización bajo luz ultravioleta (UV) de la guanina de las deyecciones de los ácaros a partir del macerado del tórax de las abejas.

6. Identificación molecular

A pesar de que todavía no hay un método molecular recomendado por la OIE (2008), tanto Evans y col. (2007) como Kojima y col. (2011) describieron sendas técnicas de PCR para identificar *A. woodi* centrándose en el gen mitocondrial COI.

Control de la acarapisosis

El tratamiento contra la acarapisosis está justificado siempre que el porcentaje de obreras infestadas sea igual o superior al 10% y debe hacerse a finales de verano principios de otoño.

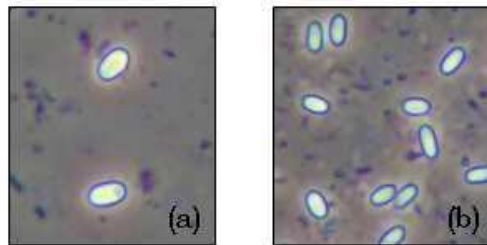
Las medidas de manejo y los productos empleados son básicamente los mismos que para la varroosis, no obstante los cristales de mentol son el compuesto que tradicionalmente se ha utilizado frente *A. woodi*.

3.1.3 Género *Nosema*

Actualmente hay dos especies de *Nosema* que afectan a la viabilidad de las colmenas. Las nosemosis son enfermedades que sólo afectan a las abejas adultas y que se encuentran recogidas en las listas actuales de la OIE (2012). Son producidas por microsporidios del Género *Nosema* que pese a su semejanza morfológica (Fig. 5) y genética cursan con una sintomatología diferente y por ende, serán tratadas como dos patologías independientes (COLOSS workshop, 2009): nosemosis tipo A producida por *Nosema apis* (Zander, 1909) y nosemosis tipo C producida por *Nosema ceranae* (Fries y col., 1996). Aunque la abeja europea (*A. mellifera*) es el hospedador natural de *N. apis* y la abeja asiática (*A. cerana*) lo es

de *N. ceranae*, ambos agentes pueden encontrarse en cualquiera de las especies de abejas. Aunque hay que destacar que *N. ceranae* se desarrolla mejor en *A. mellifera* comparada a *N. apis* en *A. cerana* (Fries y Feng, 1995; Fries, 1997).

Figura 5. Microscopio contraste fases a 400 aumentos: a) *Nosema apis* b) *Nosema ceranae*



3.1.3.1 *Nosema apis*

La nosemosis tipo A está causada por el microsporidio *N. apis* que se localiza y desarrolla en el interior de las células epiteliales del ventrículo de las abejas adultas.

Nosema apis fue uno de los primeros microsporidios descritos y hace más de cien años que se encontró infectando a *A. mellifera* (Zander, 1909). De hecho, se reconoció la enfermedad causada por este microsporidio en abejas melíferas incluso antes de que el agente etiológico se descubriera. Los corpúsculos ovalados y brillantes que se encontraron en el tracto digestivo indicaron el origen fúngico de la enfermedad (Neveu-Lemaire, 1938). En Alemania, estos corpúsculos se atribuyeron finalmente como la causa de la patología y en 1909, Zander los clasificó como *N. apis*.

Nosema apis pertenece a la clase Microsporidia que es un grupo de eucariotas que se comportan como parásitos intracelulares obligados y que recientemente se ha reclasificado desde la clase Protozoa hasta el grupo Fungi, rango Opisthokonta (Sina y col., 2005). Desde el punto de vista del parasitismo y de la evolución biológica, los microsporidios están altamente especializados y han evolucionado hacia un sofisticado mecanismo de infección con adaptaciones a la vida intracelular (Williams, 2009).

Distribución de *Nosema apis*

En la actualidad, la nosemosis tipo A está expandida mundialmente (Furgala y Mussen, 1990; Matheson, 1996) siendo la enfermedad más distribuida de las abejas adultas (Nixon, 1982), aunque su prevalencia es menor en áreas tropicales y subtropicales (Wilson y Nunamaker, 1983). Cuando la enfermedad se presenta de forma aguda, puede producir un impacto desfavorable en la producción de miel, en la polinización y en la cría de abejas lo que conlleva grandes pérdidas económicas (Hornitzky, 1985; Anderson y Giacon, 1992).

Morfología de *Nosema apis*

Nosema apis es un microsporidio que tiene fases vegetativas y de resistencia en forma de espora, la cual actúa como elemento de resistencia y difusión de la enfermedad. Inicialmente descritos como corpúsculos, las esporas se eliminan en las heces de las abejas (Gilliam y Shimanuki, 1967). Tienen forma ovalada, con un tamaño de 5-7 x 3-4 μm y son refringentes. Tiene dos membranas, la exospora proteínica y electrodensa, y la endospora quitinosa y electrolúcida, que la hacen resistente a los factores ambientales adversos. En el extremo anterior del interior de la espora, se encuentran el disco de anclaje donde empieza el tubo polar y el diplocarion rodeado por un filamento polar de 26-32 vueltas (Fries 1989). En el extremo posterior se aloja una vacuola con material flocular. Todo el conjunto, a su vez, se encuentra rodeado por el esporoplasma.

Biología de *Nosema apis*

La infección por *N. apis* se produce cuando las abejas adultas ingieren esporas viables ya sea durante la alimentación (Bailey, 1981; Webster, 1993), en la trofalaxia (Webster, 1993), mientras realizan tareas de limpieza de la colmena (Fries, 1989; Webster, 1993) o a través del agua (L'Arrivee, 1965). Una vez que las esporas llegan a la luz del ventrículo, germinan dando comienzo así a la diseminación del parásito (Bailey, 1955). Todavía no se han aclarado las señales que dirigen la germinación, aunque hay una indicación de que el anclaje calcio/calmodulina a la superficie de las esporas puede comenzar una cascada de señales que contribuyen a ello (Weidner y Byrd, 1982).

Se desencadena entonces la eversión del filamento polar que adquiere forma de túbulo hueco y penetra en las células intestinales donde inyecta el esporoplasma binucleado (Larsson, 1986). Éste crece en tamaño y madura para convertirse en fase vegetativa, denominada meronte por algunos autores. Aproximadamente 24 h *post-infección* se inicia la merogonia. En esta fase es típica la división binaria de los merontes diplocarióticos, aunque también pueden producirse múltiples fisiones para dar lugar a cadenas multinucleadas (Gray y col., 1969). A continuación se forman los esporontes sobre los que se evidencian deposiciones de queratina que darán lugar a la futura exospora. Inmediatamente después, vuelven a dividirse por fisión binaria una sola vez para formar dos esporoblastos. A partir de ellos se forma una primera generación de esporas binucleadas, que tienen una fina endospora (82-143 nm) y un corto filamento polar. Las esporas germinan de forma espontánea en el mismo citoplasma de la célula parasitada o en la adyacente (Fries y col. 1992). Este mecanismo sirve para propagar la parasitación de una manera rápida a través del epitelio ventricular. A partir del esporoplasma inyectado se obtiene una nueva generación de merontes que, tras múltiples divisiones, da lugar a una segunda secuencia de esporulación. Los esporontes diplocarióticos resultantes se dividen para dar lugar a dos esporoblastos, que evolucionarán para convertirse en esporas maduras. En este caso, la endospora es mucho más gruesa (278-379 nm) que los de la primera generación y el filamento polar mucho más largo. Una vez que las células parasitadas están repletas de esporas maduras, pueden romperse liberándolas a la luz intestinal. Aunque Gray y col.

(1969) indicaron que el ciclo biológico de *N. apis* duraba siete días, estudios posteriores han confirmado que se completa en 36 h (Fries y col., 1992).

Epidemiología de la nosemosis tipo A

La nosemosis tipo A puede afectar tanto a los individuos de las tres castas (Bailey y Ball, 1991; Fries, 1989, 1993), influyendo de forma notable la edad. De hecho, se ha demostrado que las abejas viejas son más susceptibles a la enfermedad y las abejas menores de 15 días son poco receptivas (Wang y Moeller, 1970).

La parasitosis de la abeja asiática por *N. apis* es autolimitante lo que determina una menor patogenicidad. En cambio en las abejas melíferas europeas no lo es, por lo que la parasitación por *N.apis* progresa con rapidez en las células epiteliales del ventrículo, fundamentalmente en las abejas más adultas (pecoreadoras). En las últimas fases de la enfermedad, en la colonia también se afecta la reina, lo que compromete la viabilidad de la colonia de abejas.

Los efectos de *N. apis* en reinas son particularmente importantes para la práctica apícola. La disminución en el desarrollo de los ovarios conduce a una infertilidad (Fyg, 1964; Liu, 1992) y consecuentemente a una sustitución de la reina (Farrar, 1947; Furgala, 1962; Czekonska, 2000).

La dosis infectiva de *N. apis* está cerca de 100 esporas por abeja (Fries, 1989) y la esperanza de vida de las obreras afectadas se reduce entre 22-44% respecto de las sanas (Kang y col., 1976) lo cual, durante la primavera y el verano, podría causar la escasez de las abejas de mayor edad. De este modo, la colonia no puede aumentar tan rápida y vigorosamente como lo haría en condiciones normales (Delaplane, 1998).

Las abejas de diferentes estaciones poseen características fisiológicas distintas que pueden influir en su receptividad al parásito. Las abejas de primavera y otoño son las más parasitadas por *N. apis* (Bailey, 1955). En la parasitación por este microsporidio, hay una clara influencia de las condiciones climáticas (Webster, 1993). Las bajas temperaturas del invierno hacen que el parásito se multiplique más lentamente, resultando difícil encontrar esporas en el ventrículo de las abejas, a no ser que las abejas estén fuertemente infectadas. Tan pronto como se eleva la temperatura en primavera, y comienza la cría de larvas y la ingestión de proteínas, el parásito se multiplica masivamente (Pickard y El-Shemy, 1989). Es en este momento de intercambio de abejas de invierno a abejas de verano cuando suele desarrollarse clínicamente la nosemosis tipo A. Si las abejas no pueden salir de la colmena por las bajas temperaturas se facilita el contacto entre las heces contaminadas y el alimento, aumentando la transmisión de la enfermedad y provocando la aparición de casos clínicos. En caso de que la población infectada sobreviviese, según avanza la primavera, las abejas más afectadas que salen a volar raramente regresan. Disminuye así la contaminación en el interior, lo que unido a la rápida sustitución de abejas viejas afectadas por abejas nuevas y la corta vida activa de las abejas de verano, hace que el parásito se multiplique menos y se reduzca la carga parasitaria. Esto es lo que se denomina autocuración. En veranos muy

lluviosos pueden repetirse los factores del inicio de la primavera y aparecer prevalencias elevadas en el otoño. En estos casos, las abejas van muriendo durante la pausa invernal y la colmena es incapaz de sobrevivir el invierno (Bailey, 1955). No obstante, este hecho resulta excepcional en la parasitación por *N. apis*.

Las esporas de *N. apis*, responsables de la transmisión de la enfermedad, pueden permanecer viables varios meses en la miel (White, 1919) y en los cadáveres de las abejas infectadas (Steche, 1985), e incluso más de un año en las heces (Bailey, 1962). Sin embargo, la infectividad no se conserva tanto tiempo (Malone y col., 2001). Es probable que la contaminación fecal de la cera, en especial en los panales utilizados para la cría, o de otras zonas de la colmena, proporcione suficiente cantidad de esporas para que la enfermedad se transmita a la nueva generación de abejas.

Repercusiones patológicas en la abeja individual

Las abejas parasitadas por *N. apis* no muestran signos clínicos evidentes de la enfermedad e incluso cuando la nosemosis tipo A se presenta de forma aguda, los signos clínicos son bastante inespecíficos pudiendo llegar a confundirse con otras enfermedades de las abejas adultas.

La acción patógena de *N. apis* en las abejas melíferas se centra casi exclusivamente en el epitelio del ventrículo (Bailey, 1981; Liu, 1984). Macroscópicamente aparece inflamado y presenta un aspecto blanquecino, friable, que se rompe con facilidad al extraerlo del abdomen.

Las lesiones producidas por la acción citolítica de los merontes se traducen en una disfunción en las células ventriculares del hospedador que finaliza con la destrucción de las mismas (Liu, 1984). Por esta razón las abejas afectadas por *N.apis* acumulan excrementos y presentan el abdomen dilatado y distendido. Como consecuencia final aparece la diarrea (Bailey, 1981), el signo más característico de la nosemosis tipo A. Sin embargo, en alguna ocasión se han observado colonias con altos niveles de infección sin diarrea (Moeller, 1978). En aquellos casos en los que aparece, las heces son de color marrón claro casi verdoso y olor fétido, y las abejas las eliminan tanto en el exterior como en el interior de la propia colmena.

Otros síntomas visibles en la abeja son un aspecto brillante, la imposibilidad para volar a consecuencia de la compresión de los sacos aéreos abdominales, y una debilidad generalizada resultado de la malnutrición. Los bajos niveles de proteína, lípidos, glucosa y fructosa con respecto a las abejas sanas (Tomaszewska, 1979) y la anemia ocasionada por la disminución en los elementos formes de la hemolinfa (hemocitos) contribuyen fuertemente a esa debilidad (Gilliam y Shimanuki, 1967). Asimismo, las abejas parasitadas sufren un deterioro del metabolismo proteico representado por una menor actividad proteolítica del ventrículo (Malone y Gatehouse, 1998). La disminución de la cantidad de amino ácidos en la hemolinfa causa una reducción de las glándulas hipofaríngeas (Wang y Moeller, 1969, 1971; Liu y col., 1990) y un descenso de los niveles de proteínas en el cuerpo graso (Lotmar, 1939).

Como consecuencia de la debilidad generalizada que presentan las abejas parasitadas por *N. apis*, aparecen otros síntomas como temblores y parálisis. De hecho, es frecuente encontrar grupos de abejas moribundas o muertas en el suelo, delante de la colmena en colonias con altos niveles de infección. De acuerdo a Moeller (1978), las abejas que se arrastran son sólo características de la enfermedad de los primeros días de la infección de la abeja, en épocas de un gran flujo de miel.

Por otro lado, la accesibilidad de polen fresco no reduce las repercusiones patológicas de *N. apis* en abejas infectadas (Mattila y Ottis, 2006; Avilez y Araneda, 2007).

Todas estas lesiones pueden agravarse por la posible acción patógena de diversos virus asociados a *N. apis* como el virus filamentoso (VF) o el de la realera negra (VRN) (Bailey, 1982).

Repercusiones patológicas en la colonia

Al igual que ocurre en la abeja individual, en las colonias afectadas de nosemosis tipo A no se observan signos evidentes de enfermedad.

La forma latente de la enfermedad es más habitual durante el invierno y a pesar de que no presenta ningún síntoma evidente, la fisiología de las abejas está alterada. Sólo se observa una disminución en el número de individuos de la colonia, un mayor consumo de alimento y una falta de dinamismo en primavera, lo que conlleva a un menor rendimiento en la producción de miel en las colmenas afectadas.

También se ha descrito un envejecimiento prematuro de las abejas, que se traduce en una reducción de la longevidad de las mismas (Furgala y Mussen, 1990). Estos efectos además están acompañados por cambios en la división de tareas y precocidad en el pecoreo (Wang y Moller, 1970) que afecta al comportamiento de las abejas. Woyciechowski y Kozlowski (1998) también demostraron un incremento del pecoreo de obreras afectadas con *N. apis* durante condiciones meteorológicas adversas.

Diagnóstico de la nosemosis tipo A

La ausencia de signos patognomónicos en la nosemosis tipo A y la recomendación de comunicar esta enfermedad a la UE (lista C del anexo I del RD 617/2007) hace que sea necesaria la confirmación laboratorial del diagnóstico. Para ello la OIE (2008) propone algunos métodos:

1. Examen macroscópico

Se realiza una disección de las abejas parasitadas y se examinan los ventrículos, que como se ha comentado anteriormente, aparecen blanquecinos y friables en grado variable. Es importante señalar que esta apariencia puede ser debida a otros problemas intestinales (alimentación con jarabes con gran cantidad de levaduras en multiplicación) o infección por virus epiteliotropos [virus Kashmir (VK) y virus de las realeras negras (VRN)].

2. Examen microscópico

Se puede realizar un examen microscópico cuantitativo o cualitativo. En ambos casos, se recogen abejas de más de 10-15 días, a ser posible pecoreadoras, para evitar resultados falsos negativos, ya que en abejas jóvenes el microsporidio puede no haber producido un número suficiente de esporas maduras que sean detectables.

Para el método cualitativo, se aconseja recoger, al menos 60 abejas con el fin de detectar el 5% de las abejas enfermas con un 95% de confianza (Fries, 1989). Las muestras de menor tamaño, pueden dar como resultado final un diagnóstico erróneo. Se separan los abdómenes de las abejas, se maceran en agua destilada estéril, se centrifuga y tres gotas del sedimento resuspendido en agua destilada estéril, se coloca en un portaobjetos bajo un cubreobjetos para hacer una observación en fresco a 400 aumentos, en un microscopio de contraste de fases (Cantwel, 1970). En estas condiciones las esporas de *Nosema* aparecen refringentes, con un contorno bien definido y sin diferenciarse su contenido interno, lo que permite no confundirlas con levaduras (no refringentes y con contenido granuloso en su interior). Las esporas de *N. apis* son ovals con polos más redondeados y más grandes que las de *N. ceranae*, que aparecen más alargadas. Además es importante distinguir entre una infección por *N. apis* y una infección causada por *Malpighamoeba mellificae* (Webster, 1993). Los quistes de *M. mellificae* son esféricos y de aproximadamente 6-7 μm de diámetro.

En caso de ser necesaria la aplicación de tinciones, está recomendada la tinción con Giemsa. Las esporas de *N. apis* tienen una apariencia distintiva con una pared gruesa no teñida y un interior azul, sin núcleos visibles.

El método cuantitativo es similar al anterior pero en este caso sólo se utilizan 10 abejas. Se maceran en agua destilada estéril y posteriormente se centrifuga, el sedimento se resuspende en agua destilada estéril. Una vez homogeneizado el macerado, se llena una cámara de recuento (hemocitómetro) y se cuenta el número de esporas, que es orientativo del grado de parasitación de la muestra y no está directamente relacionado con el grado de parasitación real de la colmena.

3. Identificación molecular

Desde el año 2008, la OIE recomienda una técnica de PCR múltiple de la región SSU del gen 16S del ARN ribosómico (*SSU-16S* ARNr) desarrollada en nuestro centro, con la que se pueden identificar simultáneamente ambos tipos de microsporidios: *N. apis* y *N. ceranae*, descrita por Martín-Hernández y col. (2007).

Además de forma muy reciente, para la detección de *Nosema* spp. se han descrito un amplio número de métodos moleculares utilizando cebadores específicos (Cox-Foster y col., 2007; Chen y col., 2008; Suwannapong y col., 2011), técnicas de PCR-RFLP (Klee y col., 2007; Tazpasi y col., 2009) o PCR a tiempo real (Chen y col., 2009; vanEngelsdorp y col., 2009; Bourgeois y col., 2010; Burgher-MacLellan y col., 2010; Traver y Fell, 2011; Erler y col., 2011).

Control de la nosemosis tipo A

El producto activo más utilizado para el control de las nosemosis ha sido la fumagilina (Katznelson y Jamieson, 1952; Cantwell y Shimanuki; 1970; Fries, 1997; Nozal y col., 2008) pero en la actualidad su uso no está autorizado. Se trata de un antibiótico que actúa únicamente sobre la forma vegetativa de *Nosema* spp., en el interior de las células del epitelio ventricular, favoreciendo por otra parte la reepitelización de las zonas afectadas. Este antibiótico puede alcanzar un 100% de eficiencia durante seis meses si es aplicado en una posología adecuada (Higes y col., 2008a, 2009a), siendo el otoño el mejor momento para tratar las colonias (Bailey, 1955). Es interesante destacar la alta inestabilidad de la fumagilina bajo radiación, lo que implica una rápida degradación de la misma, sin embargo la temperatura tiene un efecto menor (Nozal y col., 2008).

En obreras enjauladas, alimentadas con jarabes con timol y resveratrol, se han observado índices significativamente más bajos de infección. Además, el resveratrol incrementó el tiempo de vida de las abejas (Maistrello y col., 2008).

En cualquier caso, antes de recurrir a un tratamiento veterinario, lo mejor es prevenir la aparición de la nosemosis tipo A. Para ello, se hace necesario eliminar aquellos factores que favorecen la aparición de la enfermedad, manteniendo una buena higiene en el colmenar, vigilando en particular las reservas alimenticias y controlando la fecundidad de la reina.

El apicultor debe evitar las manipulaciones excesivas a principios de primavera, cuando las condiciones meteorológicas no son plenamente satisfactorias, eliminando las colonias muy débiles, renovando periódicamente los cuadros y efectuando una desinfección sistemática del material. Esta desinfección debe realizarse con ácido acético y derivados (Bailey, 1957a; De Ruiter y Van Der Steen, 1989).

3.1.3.2 *Nosema ceranae*

La nosemosis tipo C es una enfermedad de las abejas melíferas causada por *N. ceranae* de reciente descripción (COLOSS workshop 2009, Higes y col., 2010a). Todavía se desconocen muchos aspectos sobre esta patología e incluso muchos de los que se saben, se han asumido similares a *N. apis*. Por lo tanto, aún se necesitan estudios que permitan esclarecer los rasgos propios de esta patología ya que a pesar de que *N. apis* y *N. ceranae* tienen una morfología similar bajo microscopio óptico y una homología del 92% en la secuencia *SSU* del ARNr (Fries y col., 1996), presentan un patrón diferente en su epidemiología, clínica y repercusiones patológicas. De hecho, la nosemosis tipo C se considera un problema de sanidad de mayor impacto, tanto en la abeja individual (Paxton y col., 2007; Martín-Hernández y col., 2009; Antúnez y col., 2009) como en el conjunto de la colonia (Higes y col., 2008a; 2009a). Pese a que un estudio reciente ha demostrado similar virulencia entre las dos especies de *Nosema* (Forsgren y Fries, 2010), hay todavía muchos

factores por esclarecer tanto técnicos como epidemiológicos como la raza de las abejas o de las condiciones climatológicas de la zona (Higes y col., 2010a)

Nosema ceranae es un patógeno que aparentemente ha dado el salto desde su hospedador original, *A. cerana* (Fries, 1996) a *A. mellifera* en tiempos muy recientes (Higes y col., 2006; Huang y col., 2007). Aunque los análisis retrospectivos realizados hasta el momento, sugieren la presencia de *N. ceranae* en Europa durante la última década (Higes y col., 2006; Martín-Hernández y col., 2007; Klee y col., 2007; Paxton y col., 2007; Botías y col., 2011a), la fecha exacta de la llegada de dicho microsporidio a este continente sigue siendo desconocida. A pesar de ello, en la actualidad presenta una distribución mundial (Martín-Hernández y col., 2007; Klee y col., 2007; Huang y col., 2007; Cox-Foxter y col., 2007; Giersch y col., 2009; Gajger y col., 2010; Yoshiyama y Kimura, 2011; Traver y Fell, 2011) y se ha demostrado que también es capaz de parasitar otras especies de abejas como *A. florea*, *A. dorsata* y *A. koschevnikovi* (Botías y col., 2009a; Chaimanee y col., 2010). Los recientes estudios sobre la secuenciación del genoma de *N. ceranae* (Cornman y col., 2009) abre puertas a futuras respuestas sobre este parásito.

Gran parte de los trabajos sobre *N. ceranae* en Europa se han visto estimulados desde la creación de un grupo de trabajo europeo reunido inicialmente en Wageningen (2007) denominado “Prevención de las pérdidas de abejas en Europa”. Está constituido como una *EU COST Action* (FA0803) con más de 150 miembros de 40 países (incluidos también países de fuera de la EU) altamente organizado y conocido como *COLOSS Group* (Neumann y Carreck, 2010).

Al igual que en el caso de la nosemosis tipo A, los elementos de difusión de *N. ceranae* son las esporas. Morfológicamente son similares a las de *N. apis*, aunque de menor tamaño (3,3-5,5 x 2,3-3 μm) (Fries y col., 1996; Chen y col., 2009). También son binucleadas (Fries y col., 1996, 2006; Higes y col., 2007), pero el filamento polar es considerablemente más corto (18-23 vueltas) (Fries y col., 1996; Higes y col., 2007, 2008b; Chen y col., 2009). Todo ello está rodeado por una exospora y endospora con una separación entre ambas de 14-17 nm (Fries y col., 1996). *N. ceranae* mantiene el contacto directo entre el plasmalema y el citoplasma de las células hospedadoras faltando algún tipo de envoltura interfacial como vesículas parasitóforas o esporóforas similar a *N. apis* (Higes y col., 2010a).

El desarrollo de ambas especies dentro de las células del ventrículo parece ser similar (Fries y col., 1996; Higes y col., 2007; Chen y col., 2009). En menos de tres días después de la infección, se pueden observar tanto esporas maduras como esporas vacías dentro de las células infectadas (Higes y col., 2007). Esto indica que la germinación intracelular de esporas con *N. ceranae* tiene lugar en *A. mellifera* por una transmisión horizontal entre células epiteliales similares a *N. apis*. Hasta ahora, en *A. cerana* no se habían detectado la presencia de esporas de germinación intracelular (Fries y col., 1996), lo que implicaría una menor capacidad de diseminación del parásito, apareciendo las células parasitadas aisladas, rodeadas de célula sanas libres del parásito.

La primera infección experimental de *A. mellifera* por *N. ceranae* (Higes y col., 2007) mostró claramente que este parásito era altamente patógeno para su nuevo hospedador y que además inducía una mortalidad apícola mayor que *N. apis* (Paxton y col., 2007). Si bien las lesiones histológicas tanto en condiciones naturales (García-Palencia y col., 2010) como en abejas enjauladas (Higes y col., 2007) son similares a las descritas para *N. apis*, se han descrito una serie de diferencias entre las que cabe destacar la rotura de las membranas plasmáticas de las células del ventrículo y la ausencia de signos de lisis celular (p. ej. vacuolas autofágicas o lisosomas) característicos de *N. apis* (Liu, 1984). Asimismo, las células epiteliales más parasitadas muestran los núcleos desplazados apicalmente con algunas fases inmaduras y maduras de *N. ceranae* en las invaginaciones de la membrana nuclear (Higes y col., 2007; García-Palencia y col., 2010) como se había descrito anteriormente para *N. apis* (De Graaf y col., 1994).

En cuanto a las lesiones en los tejidos de la reina son similares a las de las obreras (Higes y col., 2009b) y además, a nivel fisiológico se puede observar una alteración en producción de la VTG (indicador de la fertilidad y longevidad) así como de las feromonas mandibulares que podrían explicar la prematura sustitución de las reinas infectadas (Alaux y col., 2011).

A pesar de que *N. ceranae* parece ser un parásito específico del ventrículo de las abejas (Higes y col., 20097; 2010a; García-Palencia y col., 2010), Chen y col. (2009) han sugerido que otros tejidos (túbulos de Malpigio, cuerpo graso, glándulas hipofaríngeas y salivares) pueden estar infectados por estos microsporidios después de la detección por PCR. Sin embargo, la infección de dichos tejidos no está confirmada ya que el estudio no incluyó un análisis histológico.

Nosema ceranae, tiene una mejor adaptación para completar el ciclo endógeno con un mayor índice biótico a diferentes temperaturas que *N. apis* (Martín-Hernández y col., 2009) lo que explicaría que *N. ceranae* sea más prevalente en climas templados que *N. apis* (Fries, 2010). Además, en las fases iniciales de la infección por *N. ceranae*, a 33°C, hay un mayor número de fases inmaduras (70%) que de esporas maduras. En *N. apis* a la misma temperatura, la proporción es igual entre fases maduras e inmaduras (50%). Esto justificaría que las consecuencias patológicas de la infección para cada especie no sean las mismas incluso cuando se detecten recuentos de esporas similares.

En condiciones experimentales, se ha demostrado la transmisión horizontal de *N. ceranae* de abejas infectadas a reinas (Higes y col., 2009b) por medio de la alimentación. Este hecho sugiere que la trofalaxia es una importante vía de transmisión de abeja a abeja, y de colonia a colonia a través de la deriva. Sin embargo, en abejas enjauladas se ha observado una menor inclinación para compartir solución de azúcar con otras abejas lo que podría afectar a este tipo de transmisión (Naug y Gibbs, 2009).

En relación a la epidemiología de la nosemosis tipo C, el rasgo más característico es que la infección por *N. ceranae*, se puede detectar a lo largo de todo el año (en muestras

recogidas en todas las estaciones y meses). Esta falta de estacionalidad se une a un aumento de la muerte de las colonias manifestada por los apicultores así como la ausencia de los signos típicos de la nosemosis tipo A en colonias (Martín-Hernández y col., 2007; Tapaszki y col., 2009) como las diarreas y los abdómenes dilatados. De hecho, recientemente se ha sugerido que *N. ceranae* podría ser un factor clave de las pérdidas de colonias en colmenares profesionales en España (Higes y col., 2010b).

A pesar de que la viabilidad de las esporas en la miel (Giersch y col., 2009; Granato y col., 2009) y la jalea real (Cox-Foxter y col., 2007) es todavía desconocida, se ha demostrado que pueden actuar como reservorio de *N. ceranae*, así como el polen transportado en las corbículas de las abejas (Higes y col., 2008b). El hecho de que haya esporas en el polen corbicular puede deberse a la autocontaminación durante los procesos de recolección del polen (regurgitación, saliva, etc.) por un mecanismo desconocido hasta la fecha. Aunque la posibilidad de recoger esporas directamente de flores contaminadas no es descartable, esta opción parece altamente improbable (Higes y col., 2008b).

Por otro lado, la presencia de esporas de *N. ceranae* en los regurgitados de los abejarucos (*Merops apiaster*) es un hallazgo con unas repercusiones epidemiológicas importantes en la diseminación de las esporas a través de Europa (Higes y col., 2008c; Valera y col., 2011) ya que las abeja y los abejorros constituyen el principal constituyente de la dieta de este tipo de pájaros (Martínez, 1984; Cramp, 1985).

Los productos apícolas también juegan un importante papel en la dispersión de esporas infectivas de *N. ceranae* de colmenar a colmenar a lo largo de diferentes áreas geográficas (Klee y col., 2007). De este modo, el comercio de reinas se ha sugerido como fuente de infección en algunas áreas (Giersch y col., 2009).

Si bien en la nosemosis tipo C no hay las marcas fecales como en la nosemosis tipo A (Higes y col., 2008a; 2010a), y que los mecanismos de transmisión pueden por lo tanto ser diferentes, no se puede descartar la contaminación del material con esporas infectivas ya que parece ser el camino más probable para el establecimiento de la infección en algunas islas de Holanda (Van der Zee, 2010). Las abejas infectadas pueden contaminar el material apícola al ser machacadas durante el manejo apícola de las colmenas (Malone y col., 2001).

Las esporas de *N. ceranae* son más resistentes a la desecación y tienen una mayor termotolerancia a 60°C durante seis horas (Fenoy y col., 2009) comparado con las esporas de *N. apis* que mueren tras 15 min a esa misma temperatura (Cantwell y Shimanuki, 1970). Por el contrario, después de la congelación, las esporas de *N. apis* muestra un índice de infectividad mayor que las de *N. ceranae* (Fries y Forsgren, 2009), aunque si éstas se mantienen en un medio de conservación adecuado, la pérdida de viabilidad no es tan dramática y pueden mantenerse viables más del 80% de las esporas congeladas durante tres semanas (Fenoy y col., 2009).

Esta enfermedad muestra un largo período subclínico inaparente en la colonia que puede explicar la ausencia de signos reconocibles y evidentes antes de la muerte de la

misma (Higes y col., 2008a). La amplia fluctuación en el recuento medio de esporas en abejas infectadas desde el principio hasta el final de la enfermedad en abejas de interior, demuestra que estadísticamente no es una medida fiable para *N. ceranae*. Se ha sugerido que la proporción de abejas infectadas es el indicador más útil en el pronóstico de la nosemosis tipo C en la colonia (Higes y col., 2008a; Meana y col., 2010). Asimismo, se ha detectado que incluso el tamaño de la muestra y el momento de recolección de la misma deben tenerse en cuenta a la hora de dar un diagnóstico fiable (Botías y col., 2011b).

En España, se han descrito algunos rasgos clínicos de la infección que normalmente pasan desapercibidos por los apicultores (Higes y col., 2008a). Estos son, un mayor período de cría durante los meses fríos (incluso cuando normalmente debería ocurrir la parada invernal); un número superior de cuadros cubiertos por cría en relación a los cuadros de abejas durante los meses templados; y bajas producciones de miel incluso uno o dos años antes. Finalmente, tras un periodo que varía entre 1,5-2 años las colonias infectadas están claramente debilitadas, hay un descenso llamativo de las abejas adultas y la colonia muere o colapsa. Se han observado dos modos diferentes de colapso que podrían estar relacionados con el momento en el que las colonias mueren. Cuando el colapso se detecta durante los meses de invierno, más del 50% de las abejas muertas dentro de la colmena están infectadas, siendo siempre el recuento medio de esporas en estas abejas mayor de 10 millones, y las reinas también están infectadas. Por otro lado, cuando el colapso ocurre en primavera, el porcentaje de infección y media de recuento de esporas es siempre más bajo, y las reinas normalmente no están infectadas. Probablemente, las diferencias entre estos dos casos reflejan la cantidad de abejas viejas y jóvenes en cada estación. A comienzos de la primavera, la proporción de abejas recién nacidas puede actuar como un factor de dilución ya que al nacer, pueden reducir el porcentaje de abejas adultas parasitadas, lo que a su vez retrasará la infección de la reina (Higes y col., 2009b).

El debilitamiento de la colonia es probablemente debido al hecho de que las abejas fuertemente infectadas (principalmente pecoreadoras) no regresan a la colmena dado el número de abejas muertas e infectadas lejos de la colonia (Higes y col., 2008a, 2009a; Krajl y Fuchs, 2010). Al igual que sucede con otros microsporidios, *N. ceranae* suprime parcialmente los mecanismos de defensa humoral y celular de las abejas, algo que no ocurre con *N. apis* (Antúnez y col., 2009).

La elevada prevalencia de *N. ceranae* en todos los estudios realizados en este siglo (Chauzat y col., 2007; Martín-Hernández y col., 2007; Klee y col., 2007; Tapazsi y col., 2009; Granato y col., 2009; Korpela, 2009) se ha interpretado por varios autores como un aparente desplazamiento de *N. apis*. Sin embargo, un amplio estudio recientemente ha desmentido dicha hipótesis a pesar del corto periodo de tiempo de estudios en Europa (Martín-Hernández y col., 2011)

A pesar de que se han presentado alternativas para el tratamiento de la nosemosis tipo C, como ApiHerb® (Nanetti, 2009) o Nonosz® (Békési y col., 2009) basados fundamentalmente en extractos de hierbas, la fumagilina sigue siendo el antibiótico

principalmente empleado para tratar esta patología. Se ha demostrado que la producción de miel en colonias infectadas y asintomáticas es mucho menor cuando se compara con la de colonias tratadas con fumagilina (Botías y col., 2009b).

3.1.4 *Ascosphaera apis*

Este agente infeccioso causa una patología conocida bajo el nombre de ascosferosis, cría yesificada o pollo escayolado. Se trata de una micosis invasiva que afecta exclusivamente a las larvas de abejas en desarrollo. Es la enfermedad micótica más frecuente de *A. mellifera* y es causada por el hongo *Ascosphaera apis* (Spiltoir y Olive, 1955).

La mayoría de las especies del género *Ascosphaera* se asocian a abejas sociales y solitarias, algunas como saprofitas, pero muchas otras son patógenas. Tal es el caso de *A. apis*, el agente etiológico de la ascosferosis. Fue Maasen (1913) quien primero reconoció esta especie y la denominó *Pericystis apis* y pese a que Claussen (1921) hizo una pequeña descripción del hongo y mantuvo el nombre, fue posteriormente cuando se describió el ciclo de vida, el momento en el que se introdujo el actual nombre del género *Ascosphaera* (Spiltoir, 1955; Spiltoir y Olive, 1955).

La clasificación taxonómica del género *Ascosphaera* ha sido centro de debate a lo largo de los años debido a que se basaban en características fenotípicas que en muchas ocasiones dependían de las condiciones medioambientales (Cain, 1972; Malloch, 1981).

La reciente aplicación del análisis del material genético ha resultado de gran utilidad (James y col., 2006, Hibbett y col., 2007), pero la falta de significación de los datos obtenidos en algunos casos hace que las conclusiones de tales estudios no sean suficientes en el esclarecimiento de las clasificaciones. Con la ayuda de la amplificación del ADNr por PCR y la posterior secuenciación, Berbee y Taylor (1992) y Anderson y col. (1998) concluyeron que el género *Ascosphaera* debería ser mantenido dentro de la clase *Plectomycetes*, tal como se había hecho en la clasificación tradicional, sin embargo esta conclusión no ha sido aceptada e incluso el término *Plectomycetes* ha sido completamente abandonado en la actualidad.

Distribución de *Ascosphaera apis*

La ascosferosis fue reconocida como enfermedad a principios del siglo XX (Maassen, 1913) y aunque no fue hasta mediados de este siglo que se vio ampliamente distribuida fuera de Europa. En los últimos años se ha convertido en un problema de gravedad para gran parte del mundo. Actualmente se halla muy expandida en Europa, América del Norte, Asia y en algunos países de América del Sur, América Central, África y Oceanía (Aronstein y Murray, 2010).

Morfología de *Ascosphaera apis*

En medios de cultivo sólido *A. apis* crece como un micelio denso y blanco que contiene hifas aéreas, superficiales y profundas. Las hifas son septadas, con un diámetro de

2,5-8 μm y pronunciadas ramificaciones (Spiltoir, 1955). Si una hifa se rompe, el septo le da rigidez física y limita la pérdida del citoplasma. Además cada septo posee un poro que permite el movimiento del citoplasma y los pequeños núcleos entre las células vegetativas (Spiltoir, 1955). Asimismo, el microscopio electrónico de barrido reveló la presencia de mitocondrias y numerosos ribosomas en el citoplasma del micelio de *A. apis* (Anderson y Gibson, 1998).

Ascosphaera apis es un hongo heterotálico donde la reproducción sexual ocurre típicamente entre parejas haploides morfológicamente idénticas, distinguiéndose únicamente por su tipo de apareamiento (Bisset, 1988; Anderson y Gibson, 1998; Poggeler, 2001).

Un cuerpo fructífero o ascoma maduro mide entre 47-140 μm de diámetro (Christensen y Gilliam, 1983; Chorbinski y Rypula, 2003), posee una pared de doble capa con una superficie exterior lisa (Bisset, 1988; Anderson y Gibson, 1998; Chorbinski y Rypula, 2003) y contiene numerosas ascas en su interior. La medida de las ascas oscila entre 7-18 μm en diámetro y tienen una membrana externa no visible. Cada asca posee en su interior varias ascosporas maduras con forma elipsoidal, que tienen una pared gruesa, una membrana con muchas depresiones y un esporoplasma con numerosos ribosomas y mitocondrias (Bisset, 1988). El tamaño de una ascospora individual está entre 2,7-3,5 X 1,4-1,8 μm (Bailey y Ball, 1991; Anderson y Gibson, 1998). Las ascosporas son resistentes a temperaturas extremas, a radiaciones UV, a la temperatura de fusión de la cera y a la acción de soluciones formuladas pudiendo sobrevivir durante años en el medio ambiente (Aronstein y Murray, 2010).

En condiciones de laboratorio, las esporas germinan mejor a 35°C en un ambiente casi anaerobio, produciendo un único tubo germinativo, mientras que los micelios requieren un ambiente aeróbico para crecer (Bailey, 1967), con una temperatura óptima de 30°C. En la naturaleza, su temperatura de crecimiento y formación de cuerpos fructíferos está alrededor de los 30°C (Maurizio, 1934).

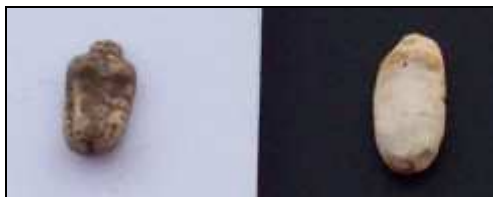
Biología de *Ascosphaera*

La fuente primaria de infección de la cría son las esporas de *A. apis* (ascospora) producidas sexualmente (Spiltoir, 1955; Hitchcock y Christensen, 1972; Rose y col., 1984). Si bien los estudios iniciales apoyaban la hipótesis de que dos eran las vías de infección por *Ascosphaera*: a través de la cutícula (Roussy, 1962) y por ingestión (Matus y Sarbak, 1974), hoy en día se ha aceptado que las ascosporas no pueden germinar en la cutícula larvaria. Por eso, la infección comienza cuando larvas de *A. mellifera* consumen ascosporas de *A. apis* junto con el alimento (Heath, 1982; Puerta y col., 1994; Flores y col., 1996). Las ascosporas germinan en el lumen del intestino, probablemente activadas por el CO₂ (Bailey y Ball, 1991). Las larvas infectadas rápidamente reducen la consumición de alimento para finalmente dejar totalmente de comer. Algunas de las enzimas producidas por *A. apis*, ayudan al patógeno en la penetración de la membrana peritrófica del intestino medio de las larvas (Theantana y Chantawannakul, 2008) y una vez dentro, el micelio fúngico empieza a crecer, invade los

tejidos y acaba atravesando la cutícula en el extremo final de la larva (Nelson y Gochnauer, 1982; Koenig y col., 1987). La muerte ocurre como resultado final de un daño mecánico y enzimático, de la interrupción de la circulación de la hemolinfa y de una toxicosis generalizada (Glinsky y Buczek, 2003). El crecimiento vegetativo de *A. apis* se va extendiendo desde el extremo posterior de la larva al anterior, hasta que está recubierta por una gruesa capa de micelio blanco. A continuación, el crecimiento fúngico es moteado con manchas color marrón o negro debido a la producción de los cuerpos fructíferos que puede variar en tamaño y color.

Los cadáveres de las larvas se encuentran normalmente estirados en las celdas en una posición vertical, aumentadas de tamaño hasta cubrir el de la celda. Posteriormente se deshidratan y forman las denominadas momias que pueden ser blancas o negras (Fig. 6). Las primeras están compuestas fundamentalmente por restos celulares o fragmentos del micelio (Gochnauer y Hughes, 1976) y las segundas están compuestas por ascosporas, de hecho cada momia negra contiene entre 10^8 - 10^9 ascosporas (Hornitzky, 2001).

Figura 6. Momia negra (izquierda) y momia blanca (derecha)



Pese a que se ha sugerido que las momias blancas son debidas a la infección con micelio de un único tipo de apareamiento (Davis y Ward, 2003), esto parece cuestionable dado que nunca se ha demostrado que el micelio sea infectivo, ni tan siquiera que un único tipo de apareamiento sea capaz de producir esporas asexuales. Además, ambos tipos de apareamiento han sido rutinariamente aislados de momias blancas (Rose y col., 1984) y los cultivos fúngicos originados de momias blancas y crecidas separadamente producen consistentemente ascosporas en cultivo (Arostein y Murray, 2010). Otros hipotetizaron que uno de los tipos de apareamiento de *A. apis* puede inhibir el crecimiento del otro o ellos pueden no ser igualmente distribuidos en el ambiente (Christensen y Gilliam, 1983). Puede ser verdad que hay una inhibición de un tipo de apareamiento por el otro, pero esto no parece ocurrir cuando ambos tipos de apareamiento se desarrollan juntos en el laboratorio, aunque su comportamiento puede ser diferente en condiciones naturales. Lo que parece más probable es que las momias más jóvenes son blancas y con suficiente tiempo y las condiciones apropiadas, llegan a ser negras debido al desarrollo final de las ascosporas.

Al igual que otros hongos patógenos, *A. apis* infecta insectos al atravesar sus primeras barreras físicas (membranas peritróficas) (Barr y Shope, 1975; Glinski y Jarosz, 2001). Sin embargo, las componentes químicos de la cutícula como las ceras y los ácidos grasos insaturados tienen una potente actividad antifúngica (Glinski y Jarosz, 2001). Además,

el ambiente bioquímico del intestino medio proporciona algunas defensas contra hongos patógenos transmitidos por los alimentos. Por otro lado, las lesiones sépticas rápidamente desencadenan la activación de las cascadas proteolíticas en el lugar de la lesión que conduce a la coagulación de la sangre localizada y la formación de un coágulo de melanina que impide la pérdida de la hemolinfa a pesar de la herida. El subproducto de la producción de melanina es una liberación de especies reactivas de oxígeno que tienen propiedades antimicrobianas citotóxicas (Davis y col., 2008).

Cuando las barreras exteriores son atravesadas, los hongos invasivos se encuentran con una variedad de defensas inmuno fisiológicas por activación de las reacciones inmunes humorales y celulares (Glinski y Jarosz, 2001; Glinski y Buczek, 2003). La respuesta inmunocelular empieza inmediatamente después de que la invasión es detectada en la hemolinfa mientras que los péptidos antimicrobiales típicamente aparecen en la hemolinfa algunas horas después de la infección (Govind, 2008; Strand, 2008; Stanley y col., 2009). La fagocitosis y la encapsulación son los mecanismos de defensa más comunes en abejas contra hongos entomopatógenos (Glinski y Buczek, 2003). Los hemocitos pueden matar directamente las esporas fúngicas y destruir otras pequeñas moléculas extrañas por mecanismos fagocíticos (Strand, 2008; Stroschein-Stevenson y col., 2009). La activación de la inmunidad humoral induce la síntesis de péptidos antimicrobiales y enzimas bacteriolíticas.

Epidemiología de la ascosferosis

La única fuente de infección de *A. apis* está representada por las ascosporas y aunque pueden infectar a todas las castas de la cría de abejas melíferas, es menos frecuente en reinas. La susceptibilidad a la infección depende de la edad larvaria. Mientras que Bailey (1963; 1981) apunta que es mayor a los tres o cuatro días de edad de las larvas, otros opinan que el primer y segundo día son también altamente susceptibles (De Jong, 1976).

Si bien las abejas adultas no son susceptibles a este patógeno, juegan un importante papel en la transmisión de la enfermedad tanto dentro de la colmena como entre ellas a través del pillaje o la deriva. Además las pecoreadoras pueden llevar las ascosporas, pasarlas a las nodrizas a través de la trofalaxia y éstas a su vez a las larvas cuando las alimentan. Pero sin duda, la transmisión entre colonias es principalmente responsabilidad de los apicultores al intercambiar material contaminado con esporas fúngicas (Gilliam y Vandenberg, 1997). Este material contaminado es una fuente de infección de larga duración (Toumanoff, 1951; Gilliam, 1986; Anderson y col., 1997; Flores y col., 2005a, 2005b) ya que las esporas pueden acumularse en todas las partes de la colmena y en todos los productos de ésta (cera fundida, polen almacenado y miel) y permanecer viable al menos 15 años (Toumanoff, 1951).

En la naturaleza, el desarrollo y crecimiento de *A. apis* depende estrictamente de los nutrientes y de las condiciones específicas de temperatura y pH, requeridas para la germinación de las ascosporas y que encuentran en el intestino de la larva (Bignell y Heath, 1985; Winston, 1991).

La temperatura de las larvas influye en el crecimiento de *A. apis*, siendo mayor en larvas ligeramente frías ya que en condiciones naturales la temperatura de crecimiento y formación de cuerpos fructíferos es sobre 30°C (Aronstein y Murray, 2010). Varios experimentos han demostrado que la cría es más susceptible cuando se enfría inmediatamente después de que la celdilla ha sido sellada (Bailey, 1967). Basta solo una ligera reducción de temperatura por debajo de la normal (35°C) durante unas pocas horas. Esto puede suceder a principios de verano cuando las colonias están creciendo, en las larvas de zánganos que se localizan generalmente en la periferia del nido de cría, en colonias pequeñas cuyo riesgo de enfriarse es mayor al tener una menor capacidad para calentar y superficies relativamente amplias e incluso en climas templados, en los que las colonias que tienen temporalmente una cantidad de abejas adultas insuficiente para incubar de forma adecuada a su cría.

La ascosferosis es más prevalente durante la primavera dado que el crecimiento del hongo se ve favorecido por las colmenas frías y húmedas, es decir, mal ventiladas (Mehr y col., 1976; Puerta y col., 1994; Flores y col., 1996; Borum y Ulgen, 2008). Además la enfermedad se agrava cuando disminuye la proporción de abejas adultas respecto a la cría (Koenig y col., 1987). Y aunque la mortalidad de la cría generalmente es baja, en ocasiones puede llegar a sobrepasar el 30%. Pederson (1976) demostró que colmenas calentadas artificialmente en primavera disminuían la incidencia de la enfermedad.

Además de las condiciones medioambientales, las interacciones entre factores bióticos como diferencias en las cepas fúngicas y los factores genéticos de las abejas pueden afectar la incidencia y severidad de la enfermedad. En cuanto a las cepas fúngicas, Glinski (1982) demostró que varias cepas de *A. apis* mostraban hasta una diferencia de 20 veces el nivel de virulencia. Una alta concentración de esporas fúngicas en la colonia aumenta sustancialmente la posibilidad de infección (Koenig y col., 1987; Flores y col., 2005a, 2005b), así la incidencia de enfermedad es probablemente dependiente de un nivel de producción de ascospora de una cepa fúngica concreta, así como la tasa de geminación de éstas y su eficiencia de dispersión.

Otros factores no letales, como infecciones leves por virus o bacterias, parasitaciones por *V. destructor*, envenenamientos, estrés o incluso una alimentación inadecuada de las nodrizas enfermas podrían causar los mismos efectos que el enfriamiento al disminuir la tasa de desarrollo de las larvas (Bailey y Ball, 1991), y afectar en último término, a la incidencia y severidad de la enfermedad.

Repercusiones patológicas de la ascosferosis

Las larvas afectadas, principalmente de obreras y zánganos, aparecen muertas después de que sus celdillas hayan sido selladas y en los opérculos se pueden observar pequeñas perforaciones. Además, la extracción de las momias por parte de las obreras hace que la disposición de la nueva puesta de la reina sea irregular dando una apariencia de cría salteada o “en mosaico”.

En el caso en el que las celdillas no hayan sido operculadas, las larvas mueren verticalmente y son de color blanco, consistencia algodonosa, con un tamaño mayor al normal y pueden adquirir la forma hexagonal de la celdilla. Es lo que se denomina como momias blancas. Si la fase es más avanzada y los cuerpos fructíferos se han desarrollado, las larvas se secan hasta endurecerse y aparecen como momias negras con apariencia de tiza y de color gris o negro. En este momento, debido a la falta de adherencia de las larvas a las paredes de las celdillas operculadas, el movimiento del cuadro produce un ruido de “tableteo” o “maraca”.

La aparición de momias en el fondo de las colmenas así como en las proximidades de la piquera o en los caza polen es solo indicativo de la presencia de la enfermedad y no de su intensidad.

Diagnóstico de la ascosferosis

La ascosferosis no es una enfermedad de declaración obligatoria ni de comunicación semestral a la UE por lo que su notificación no está regulada dentro del RD 617/2007. El diagnóstico se basa en el reconocimiento de los signos característicos de la enfermedad como puede ser la presencia de momias (blancas y/o negras) y en la identificación del agente causal (*A. Apis*) en las muestras analizadas.

1. Cultivo microbiológico

La búsqueda de *A. apis* se realiza preferentemente en momias negras que son las que tienen las esporas, los elementos importantes en la identificación taxonómica del hongo. A la muestra se le añade agua o alguna tinción y luego se agita. La suspensión resultante es analizada bajo el microscopio, en la cual se busca la presencia de esporas de *A. apis*, que de aparecer son una prueba determinante del diagnóstico.

En el caso de que sólo hubiese momias blancas, el diagnóstico bajo el microscopio no es determinante, y es necesario hacer un cultivo microbiológico del hongo en un medio adecuado para detectar estructuras reproductivas. Antes de la siembra, es recomendable realizar un tratamiento de calor del inóculo para matar los posibles microbios no formadores de esporas que se encuentran habitualmente en las momias (Johson y col., 2005).

Pese a que hay un gran número de medios de cultivos diferentes que permiten el crecimiento de *A. apis* (Heath, 1982), los más utilizados son Agar Patata Dextrosa (Skou, 1972) y el MY20 (Raper y Fennell, 1965). Las placas de cultivo deben mantenerse a 35°C bajo condiciones aeróbicas para el desarrollo del micelio, mientras que para la germinación de las esporas se necesita una fuente de CO₂ (10%) (Heath y Gaze, 1987). Normalmente el crecimiento del micelio en placa es visible en 2-3 días y la esporulación (formación de cuerpos fructíferos) aparecerá a los 4-6 días Después de la inoculación como líneas negras donde el micelio de las dos formas de apareamiento se cruza y después de una semana, la superficie de la placa está normalmente cubierta con cuerpos fructíferos.

2. Examen microscópico

Los cultivos de *A. apis* se pueden observar mediante examen microscópico de preparaciones a 400 aumentos (Anderson y Gibson, 1998). La tinción de estas preparaciones con azul de lactofenol aumenta el contraste y mejora el análisis de la morfología del cultivo. La presencia de cuerpos fructíferos en muestras es un diagnóstico de la enfermedad.

3. Identificación bioquímica y molecular

Se han descrito varios métodos para analizar enzimas presentes *A. apis* (Gilliam y Lorenz, 1993; Chorbinski, 2003) y diferentes métodos moleculares para la identificación de *Ascosphaera* spp. como el análisis de isozimas (Maghrabi y Kish, 1985; 1987; 2001) y del ADN polimorfo amplificado aleatoriamente (*RAPD-PCR*) (Lu y col., 1996). La mayoría de estos estudios utilizan la región de ADN más ampliamente secuenciada en hongos, es decir el ADNr y los espaciadores internos transcritos ITS1 e ITS2 ya que es especialmente útil para esclarecer las conexiones entre especies fuertemente relacionadas. Varios autores emplean métodos para amplificar la región ITS1-5.8S-ITS2 seguida por una clonación y una secuenciación del fragmento entero (Anderson y col., 1998; Chorbinski, 2004; Borum y Ulgen, 2008). Reynaldi y col. (2003) le dio un enfoque diferente al basar sus experimentos en secuencias repetidas (*rep-PCR*) para caracterizar aislados de *A. apis* a partir de muestras de miel.

También se han desarrollado nuevos métodos especie-específicos para la identificación de *A. apis* y otros hongos estrechamente relacionados (Murray y col., 2005; James y Skinner, 2005; Song y col., 2009). Ambos utilizaron cebadores especie-específicos que también amplificaban la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr de *A. apis*.

Más recientemente se han propuesto técnicas de PCR a tiempo real para la identificación y cuantificación de *A. apis* (Lee y col., 2006; Song y col., 2010).

Control de la ascosferosis

El número de fármacos probados de forma experimental para comprobar su efectividad en el control de *A. apis* ha sido amplio, pero ninguno hasta el momento ha demostrado tener esta capacidad lo suficientemente eficaz como para ser aceptado a nivel mundial (Hornitzky, 2001). Es por esto que aún se está en la búsqueda de un fármaco que consiga eliminar al agente etiológico, que sea inocuo para las abejas, y que no deje residuos en los productos de la colmena.

Sin embargo hay una serie de técnicas de manejo de las colmenas que minimizan los efectos de la enfermedad en las colonias afectadas (Heath, 1982; Hornitzky 2001) y que se describen a continuación:

- El fortalecimiento de las colonias debilitadas mediante la adición de abejas adultas jóvenes y marcos de cría, alimentándolas con jarabe de azúcar y no permitiéndoles invernar en cámaras de cría de un tamaño muy grande en proporción al tamaño de la

colmena que les pudiese causar problemas para mantener un control eficiente de la temperatura (Seal, 1957).

- El recambio periódico de las reinas y la mejor ventilación de la colmena (Gochnauer y col., 1975).
- La incineración de los cuadros afectados en casos severos (Betts, 1951) y aplicación de cuadros nuevos (Nelson y Gochnauer, 1982; Koenig y col., 1986).
- Eliminación de las esporas de *A. apis* por incubación de la miel durante 8 h a 65°C o a 70°C durante 2 h en baños de agua (Anderson y col., 1997). Aunque el calentamiento de la miel sobre 90°C da como resultado una caramelización, un cambio en el color, además de un aumento del hidroximetilfurfural y una reducción considerable de la actividad de las enzimas beneficiosas de la miel.
- La radiación gamma liberada por Cobalto 60 es eficiente en la destrucción de las esporas (Katznelson y Robb, 1962) al igual que los haces de electrones de alta velocidad (Shimanuki y col., 1984).
- La fumigación con óxido etileno es capaz de matar *A. apis* en cuadros infectados (Gochnauer y Margetts, 1980).

Al igual que en el caso de la varroosis, el uso de abejas con un desarrollado comportamiento higiénico es una alternativa a la hora del control de la ascosferosis, además de la utilización de productos naturales y microorganismos que forman parte de la flora normal de la colmena, localizados en el alimento almacenado, en las celdillas e incluso sobre el cuerpo de abejas sanas. Algunos de estos microorganismos viven en el tracto digestivo de las abejas ayudándolas en la digestión, otras ayudan a fermentar los granos de polen y a formar el “pan de abeja” (mezcla de polen, néctar y varias enzimas) que alimenta a las crías y a las abejas jóvenes. Otros actúan ayudando en la preservación del “pan de abeja” e incluso existe microbiota (*Penicillium*, *Aspergillus* y *Bacillus*) que produce componentes con capacidad para inhibir el crecimiento del hongo y por ende la producción de esporas. Estos fungicidas bacterianos como el ácido glucónico pueden ser la clave de la protección de las abejas ante *A. apis* en el futuro. Es lógico pensar que un fungicida producido por un microorganismo especializado sea mucho más eficiente en la penetración de las defensas de la espora del hongo que cualquier producto sintético, y por eso, la aparición de generaciones del hongo resistentes a este tipo de sustancias es casi nula.

3.1.5 *Paenibacillus larvae*

Este agente bacteriano causa loque americana (peste maligna, cría pútrida o peste viscosa) que es una enfermedad altamente infecciosa de la fase larvaria de *A. mellifera* y otras *Apis* spp. y está considerada como una gran amenaza para las abejas melíferas por el significativo descenso que provoca en el número de colonias afectadas (Hansen y Brødsgaard, 1999).

Distribución de *Paenibacillus larvae*

Paenibacillus larvae es una bacteria cosmopolita mundialmente distribuida (Riessberger-Galle y col., 2001; De Graaf y col., 2006; Genersch y col., 2006).

La clasificación de *P. larvae* (Genersch y col., 2006) como agente etiológico de la loque americana ha sido el centro de grandes discusiones a lo largo de la historia.

En el siglo XVIII, se describió una enfermedad de la cría de abeja caracterizada por el olor fétido que provenía de la colonia enferma y de ahí su nombre en inglés *Foulbrood* (cría fétida) (Schirach, 1769, citado por Genersch, 2010). Más de un siglo después, Dzierzon (1882, citado por Genersch, 2010), insinuó por vez primera que ese término podría comprometer en realidad dos enfermedades diferentes. Una que afectaba de forma leve a la cría no operculada y era curable (probablemente lo que hoy día se conoce como loque europea) y la otra, una enfermedad maligna e incurable que afectaba a la cría operculada (loque americana).

En 1885, se aisló *Bacillus alvei* de larvas enfermas y se identificó como el agente causal de la enfermedad de la cría fétida (Cheshire y Cheyne, 1885 citado por Genersch, 2010). En 1906, White intentó sin éxito aislar *B. alvei* de larvas enfermas y en su lugar cultivó una bacteria desconocida que clasificó como *Bacillus larvae* (White, 1906) en base a su morfología (forma de bastón) y a su capacidad para formar endosporas. En sus estudios, se dio cuenta de que había dos enfermedades diferentes causadas por patógenos distintos que a su vez desarrollaban sintomatologías diferentes. Por un lado, la loque europea estaba causada por *Melissococcus plutonius* con los saprofitos *Bacillus alvei* y/o *Enterococcus faecalis* como invasores secundarios frecuentes (Bailey, 1983; Bailey y col., 1973); y por otro, la loque americana cuyo agente etiológico era *B. larvae* (White, 1906).

En 1950, a partir de cría de abeja muerta y seca en forma de escama polvorienta (enfermedad de escama polvorienta) se aisló otra bacteria diferente que se identificó como *Bacillus pulvifaciens* (Katznelson, 1950).

A través de la utilización de los análisis del gen 16S del ARNr en la taxonomía bacteriana, se demostró que el género *Bacillus* incluía 5 líneas filogenéticas: grupos 1-5 bacilos ARNr (Ash y col., 1991). No obstante, una de estas líneas, en concreto el grupo 3, era lo suficientemente distinta para justificar la reclasificación en un nuevo género denominado *Paenibacillus* y tanto *B. larvae* como *B. pulvifaciens* se reclasificaron a su vez como *P. larvae* y *P. pulvifaciens*, respectivamente (Ash y col., 1993). Sin embargo, análisis como los patrones de restricción de ADN y los estudios ADN vinculante de varias cepas referentes de ambas especies revelaron un alto nivel de similitud molecular que no justificaba la clasificación en dos especies. Se apoyaba así la reclasificación en una única especie, *Paenibacillus larvae* con dos subespecies *P. larvae* subsp. *larvae* y *P. larvae* subsp. *pulvifaciens* que eran fenotípica y genotípicamente diferentes, además de producir dos patologías diferentes (Heyndrickx y col., 1996).

La revisión más reciente basada tanto en métodos clásicos (morfología de la colonia y análisis de la morfología de la espora por microscopio electrónico) como métodos moleculares (electroforesis en campo pulsado, análisis del perfil proteico, amplificación de elementos *rep-PCR* y ERIC) realizados sobre varios tipos y cepas de referencia de ambas subespecies y, sobre una colección de cepas aisladas de campo de colonias enfermas de loque americana en Alemania, Suecia y Finlandia (Genersch y col., 2006), dirigen a la reclasificación de una única especie *P. larvae* sin diferenciación entre subespecies. Un resumen de las características de los cuatro genotipos ERIC de *P. larvae* se representan en la Tabla 5.

Tabla 5. Características de los genotipos ERIC I, ERIC II, ERIC III y ERIC IV de *P. larvae* (Genersch y col., 2006)

Especies Genersch y col. (2006)	<i>Paenibacillus larvae</i>			
	Subespecies Heyndrickx y col. (1996)		<i>P. l. larvae</i>	<i>P. l. pulvificiens</i>
Genotipos ERIC	ERIC I	ERIC II	ERIC III	ERIC IV
Patógena (con síntomas de loque americana)	Si	Si	Si	Si
LT ₁₀₀	12 d	7 d	7 d	7 d
Progresión enfermedad como plaga	Si	Si	n.o	n.o.
Morfología colonia pigmentada	No	Si	Si	No
Hemólisis en CSA	No	No	Si	Si
Fermentación de manitol	No	Si	Si	Si
Fermentación de salicilina	Si	No	No	No

LT₁₀₀: tiempo que requiere el patógeno para matar todos los individuos infectados (Tiempo letal)

CSA: Agar columbia de sangre de oveja

n.o.: no observada

Debido a la reciente reclasificación del agente etiológico de la loque americana, éste se puede encontrar en la literatura como *B. larvae* (White, 1906) teniendo una cercanía relativa a *B. pulvificiens* (Katznelson, 1950), como dos especies separadas *P. larvae* y *P. pulvificiens* (Ash y col., 1993), como dos subespecies diferentes *P. l. larvae* y *P. l. pulvificiens* (Heyndrickx y col., 1996) y finalmente, como una única especie *P. larvae* (Genersch y col., 2006).

Morfología de *Paenibacillus larvae*

Paenibacillus larvae es una bacteria Gram positiva que se puede presentar en su estado vegetativo; o bajo la forma de espora, la cual juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad ya que es la fase infecciosa.

La forma vegetativa de *P. larvae* se caracteriza por ser un bacilo con forma de bastón o varilla estrecha, con los extremos rectos pero redondeados, apareciendo en ocasiones ligeramente curvados. Su tamaño oscila entre 1,5 y 6 x 0,5 μm y puede presentarse individualmente y/o formando cadenas. Presentan movimientos *brownianos* ya que están dotadas de 30-35 cilios vibrátiles de 15 a 30 μm de largo. El perfil bioquímico se caracteriza por ser anaerobio facultativo, catalasa negativo o ligeramente positivo de manera tardía, por

hidrolizar la gelatina, la caseína además del azúcar esculina y por ser ureasa e indol negativo. Produce ácido a partir de D-glucosa, glicerol, D-manosa, ribosa y trealosa, pero no lo produce a partir de arabinosa y xilosa (Gordon y col., 1973).

La fase vegetativa de la bacteria que se encuentra sobre las larvas infectadas, forma esporas. Éstas son formas de reposo que representan una etapa del ciclo de vida de *P. larvae* y que se caracterizan por su marcado estado de deshidratación y por la considerable reducción de actividades metabólicas, lo que contrasta con su riqueza enzimática. Las esporas son ovoides, brillantes y refringentes, con un tamaño de 1,3 x 0,6 μm (Hornitzky y Wilson, 1989) que poseen siete capas protectoras (Bakhiet y Stahly, 1985) lo que le confiere una gran resistencia.

Biología de *Paenibacillus larvae*

Las esporas de *P. larvae* son las responsables del inicio del ciclo de la enfermedad una vez que las larvas de 12-36 h de vida ingieren una dosis de alrededor de diez esporas o incluso menos junto con la comida larvaria contaminada (Brødsgaard y col., 1998; Hansen y Brødsgaard, 1999; Genersch y col., 2005). Las abejas nodrizas pueden albergar dichas esporas tanto en la superficie corporal como dentro de su tracto digestivo y cuando alimentan a las larvas, transmiten la infección bien por vía oral o bien indirectamente al contaminar la celdilla. Una vez ingeridas, las esporas pasan a través del intestino anterior y germinan en el intestino medio de la larva (pH 6,5) alrededor de 12 h después de la ingestión (Bamrick, 1967; Yue y col., 2008).

Aunque históricamente se había admitido que la fase vegetativa de *P. larvae* penetraba el epitelio del intestino medio por fagocitosis inmediatamente después de la germinación y que el lugar primario de la proliferación bacteriana era el hemocele (Davidson, 1973; Bailey y Ball, 1991), estudios más recientes han demostrado que la bacteria coloniza el intestino medio, donde prolifera masivamente, sin destruir visiblemente la integridad del tejido epitelial (Yue y col., 2008).

Durante la fase de infección, *P. larvae* se comporta como comensal nutriéndose de la comida ingerida por la larva. Además, el hecho de que la fase vegetativa posea enzimas activas capaces de metabolizar diferentes azúcares incluyendo glucosa y fructosa apoya su crecimiento vegetativo (Julian y Bulla, 1971; Neuendorf y col., 2004).

La membrana peritrófica de las larvas infectadas ayuda a retener la masa bacteriana en el lumen del intestino medio pero finalmente *P. larvae* puede llegar a penetrar esta capa protectora (Davidson, 1970; Yue y col., 2008) y atacar el epitelio en la última fase de la infección cuando el intestino larvario está repleto de estas bacterias patógenas. A continuación las células vegetativas se mueven a través del espacio intercelular para entrar en el hemocele donde se multiplican y esporulan nuevamente (Genersch, 2010).

Otra característica de esta bacteria es la secreción de proteasas altamente activas durante el crecimiento vegetativo (Dancer y Chantawannakul, 1997; Hrabák y Martínek,

2007; Antúnez y col., 2010), entre las que cabe destacar la enolasa y la metaloproteasa (Antúnez y col., 2011a, b), que utilizará en la degradación final de los restos de la larva. La pupa muere por septicemia generalizada entre los días 11 y 12 de la eclosión del huevo (Tanada y Kaya, 1993) y se descompone en un coloide líquido como pegamento (fase filamentosa), de color marrón que desprende un olor sulfuroso característico que algunos han denominado como a cola de carpintero (Shimanuki, 1990; Bailey y Ball, 1991). Transcurridos varios días, esta masa se seca y adquiere una forma típica de escama dura de color marrón-negro que permanece adherida al fondo y/o a las paredes de las celdas y que se caracteriza por su alto poder infectivo (Bailey y Ball, 1991).

Epidemiología de la loque americana

En condiciones naturales *P. larvae* ataca fundamentalmente a las fases larvianas de las abejas obreras a pesar de que las larvas de zánganos y reinas son también susceptibles a la infección.

La susceptibilidad de la larva a la loque americana disminuye con el aumento de la edad siendo el momento óptimo para la infección a las 12-36 h de vida (Gregorc y Bowen, 1998). Después de las 53 h de la puesta del huevo, las larvas no pueden ser infectadas y de hecho, las esporas son inocuas para las abejas adultas ya que las condiciones de su tracto digestivo (pH 3-3,5) no permiten la germinación de las células vegetativas bacterianas y son eliminadas con las heces fuera del intestino (Wilson, 1971; Hitchcock y col., 1979).

Como se ha comentado anteriormente, las esporas son la única fase capaz de producir la enfermedad y una larva muerta por loque americana en la última fase de la infección (escama), puede llegar a presentar más de $2,5 \times 10^9$ esporas. Éstas son extremadamente resistentes al calor y a los agentes químicos y pueden permanecer infectivas al menos 35 años en el medio ambiente (Haseman, 1961). Son resistentes además a las bajas temperaturas y a la ebullición durante 14 min en agua y 30 min en miel.

Las abejas intentan retirar larvas muertas y las escamas de las celdillas y de este modo difunden las esporas a otras larvas e incluso pueden transmitir las a otras colonias o colmenares a través de la deriva, el pillaje, la visita de zánganos, el polen y/o la miel contaminados (Delaplane, 1991; Hornitzky, 1998). Pero el intercambio de cuadros que contienen restos de cría enferma es el medio más común de difundir la enfermedad, y la propagación del agente entre países está a menudo asociado a la importación de colonias de abejas o al uso de miel contaminada para la alimentación de las propias abejas (Von der Ohe y Dustmann, 1997; Aydin y col., 1998).

La enfermedad es tan contagiosa que avanza de forma progresiva, apareciendo en cualquier época del año y puede llegar a destruir las colonias de abejas infectadas en pocos meses o años (Hansen y Brødsgaard, 1999).

Repercusiones patológicas de la loque americana

Al comienzo de la loque americana el debilitamiento de la colonia es bastante lento, por lo que en poblaciones insuficientemente vigiladas no se constata la enfermedad hasta que se hace evidente la falta de actividad. La enfermedad se limita fundamentalmente a las larvas que han muerto una vez selladas las celdillas, aunque aquellas sin opercular también pueden contener larvas muertas lo que confiere a la cría un aspecto irregular, “en mosaico”, aunque esto no es característico de la loque americana. Las celdas afectadas tienen los opérculos hundidos y oscurecidos, de apariencia húmeda, con perforaciones irregulares. Al introducir un palillo a través del opérculo, se extrae una masa viscosa y filante de color variable entre amarillento y castaño oscuro, casi negro que se estira más de 2,5 cm y que tiene un olor característico. Esto se conoce como “prueba de la cerilla” y los apicultores la emplean como diagnóstico de campo de la enfermedad. Con el paso del tiempo aparecen las escamas fuertemente adheridas al fondo de las celdillas.

Diagnóstico de la loque americana

Los métodos recomendados por la OIE (2008) para el diagnóstico de la loque americana como enfermedad de declaración obligatoria en la UE (lista B del anexo I del RD 617/2007; OIE, 2012) se basan en las siguientes características:

1. Epidemiología y sintomatología

Se basa en el reconocimiento de los signos clínicos propios de la enfermedad así como la epidemiología anteriormente descrita.

2. Examen microscópico

Los tipos de muestras que se pueden utilizar para detectar la presencia de esporas de *P. larvae* son los cuadros de cría (20 cm²) con cría muerta si es posible, así como miel (Ritter y Kiefer, 1995), polen (Gochnauer y Corner, 1987), abejas adultas (Lindström y Fries, 2005) y restos de cera (Titera y Haklova, 2003). Cada una de ellas se tratará de una forma determinada hasta obtener una suspensión de esporas que a su vez debe someterse a un tratamiento térmico para matar otros microorganismos formadores de esporas. A continuación se pueden realizar dos tipos de tinciones. Por un lado, la tinción Gram sobre un frotis de colonias aisladas de bacterias (*P. larvae* es positiva) y por otro, la tinción carbol fucsina sobre frotis larvario que puede confirmar la enfermedad clínica basada en la morfología de la espora (Hornitzky y Wilson, 1989).

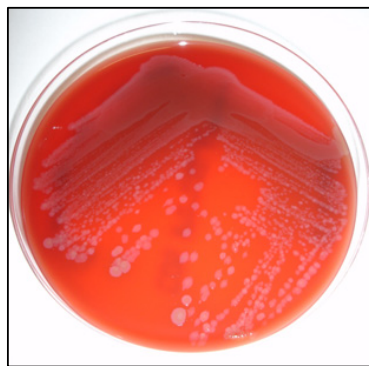
3. Cultivo microbiológico

Aunque se han descrito varios medios para el cultivo de *P. larvae*, los recomendados por sus buenos resultados son: agar *P. larvae* (Schuch y col., 2001); agar de crecimiento Mueller-Hinton (extracto de levadura, fosfato potasio, glucosa y piruvato) (Digmann y Sthaly, 1983), agar cerebro-corazón (suplementado con tiamina) (Gochnauer, 1973) y CSA (agar columbia con 5% de sangre de oveja). Las placas se inoculan y se incuban a 34-37°C durante

2-4 días en una atmósfera de 5-10% CO₂ en aire (aunque la incubación aeróbica es también posible) y la morfología de las colonias obtenidas es la que se detalla a continuación:

- Agar *P. larvae*: colonias pequeñas, de color verde pálido a amarillo (mismo color del medio) con un ligera opacidad y superficie rugosa, a veces el centro es elevado.
- Agar de crecimiento Mueller-Hinton: colonias pequeñas, rugosas, planas o elevadas y de color blanquizco a beige.
- Agar CSA: colonias pequeñas, regulares, brillantes, de aspecto mantecoso, y de color grisáceo (Fig. 7).

Figura 7. Colonias de *P. larvae* en agar CSA.



4. Identificación molecular

La OIE (2008) recomienda dos técnicas moleculares para el diagnóstico de la loque americana basadas en el gen 16S del ARNr. Por un lado, la PCR desarrollada por Dobbelaere y col. (2001a) que se puede usar para una confirmación rápida de la enfermedad clínica y para la identificación de las colonias de bacterias después de un cultivo; y por otro la PCR anidada propuesta por Lauro y col. (2003) que permite el análisis directo de las solución de esporas.

No obstante, a lo largo de estos últimos años se han ido desarrollando otras muchas técnicas biomoleculares orientadas a la discriminación entre las subespecies, anteriormente conocidas como *P. l. larvae* y *P. l. pulvifaciens*: PCR convencionales (Govan y col., 1999; Piccini, 2002; Bakonyi y col., 2003; Kilwinski y col., 2004), enzimas de restricción a través de RFLP (Alippi y col., 2002); utilización de elementos rep-PCR, ERIC (Alippi y col., 2004; Neuendorf y col., 2004).

Los métodos más recientes incluyen PCR a tiempo real que identifican y cuantifican *P. larvae* (Han y col., 2008; Chagas y col., 2010; Martínez y col., 2010).

5. Test bioquímicos

El perfil bioquímico de *P. larvae* se basa en el test de la catalasa (Haynes, 1972), la producción de ácido a partir de los carbohidratos (Gordon y col., 1973), glucosa y trealosa y a partir de arabinosa y xilosa, y la hidrólisis de la caseína o leche (Schuch y col., 2001). También se puede considerar el uso de kits comerciales como *API 50 CHB* (Carpana y col., 1995), *BBL CRYSTAL* (Dobbelaere y col., 2001b) y *Biolog system* (Neuendorf y col., 2004) para la caracterización bioquímica de *P. larvae*.

6. Métodos inmunológicos

Se han descrito varias técnicas basadas en la reacción antígeno-anticuerpo, tanto de inmunofluorescencia a partir de cultivo como directamente de restos larvarios (Otte, 1973; Toshkov y col., 1970; Zhavnenko, 1971; Peng y Peng, 1979;) como técnica ELISA con anticuerpos monoclonales específicos (Olsen y col., 1990). Además se ha comercializado un dispositivo de flujo lateral para la detección temprana de loque americana denominado *VITA diagnostic kit*[®].

Control de la loque americana

Los antibióticos comúnmente empleados para el control de loque americana son la oxitetraciclina hidrociorada y el sulfatiazol sódico (Bailey y Ball, 1991; Morse y Shimanuki, 1990). Con respecto a la oxitetraciclina, se han detectado casos de resistencia *in vitro* en las cepas bacterianas (Alippi, 1999b; Miyagi y col., 2000; Evans, 2003) así como la reaparición de la enfermedad y toxicidad del antibiótico para las abejas adultas (Alippi y col., 1999). Una alternativa efectiva para el control de la enfermedad es el empleo de tartrato de tilosina ya que no es tóxico para las abejas, la presencia de residuos del antibiótico en miel es baja y la enfermedad no presenta recurrencia hasta un año después de efectuado el tratamiento (Peng y col., 1996; Alippi y col., 1999).

Existen estudios *in vitro* sobre la eficacia de algunos aceites esenciales de origen vegetal (Alippi y col., 1996) en la inhibición del desarrollo de *P. larvae*, pero las dosis y modos de aplicación en campo no han sido efectivos para el control de la enfermedad (Albo y col., 2001).

Como ocurría en las patologías descritas anteriormente, la aplicación de medidas de manejo adecuadas y/o la utilización de abejas con carácter higiénico son una alternativa para el control de la loque americana ya que en muchos países el diagnóstico de loque americana significa el sacrificio de la colonia.

3.1.6 *Melissococcus plutonius*

La loque europea es una enfermedad infecto-contagiosa provocada por la bacteria *Melissococcus plutonius* que afecta a la cría de las abejas de *A. mellifera* aunque también ha sido aislada en *A. cerana* (Bailey, 1974) y *A. laboriosa* (Allen y col., 1990).

Distribución de *Melissococcus plutonius*

La loque europea está distribuida en la mayoría de áreas donde se practica la apicultura, excepto en Nueva Zelanda (Matheson, 1993, 1996; Hornitzky y Wilson, 1989; Ellis y Munn, 2005). La reaparición anual de esta enfermedad en apiarios infectados es particularmente problemática en Gran Bretaña (Thompson y Brown, 2001), convirtiéndola en la enfermedad bacteriana de la cría más ampliamente distribuida en ese país (Wilkins y col., 2007; Budge y col., 2010). En Suiza, la incidencia ha aumentado constantemente cada año desde finales de los 90, aún cuando se eliminan las colonias clínicamente enfermas (Forsgren y col., 2005; Roetschi y col., 2008).

Los investigadores Cheshire y Cheyne (1885, citado por Forsgren, 2010) creyeron que *Bacillus alvei* era el causante de la loque europea, pero fue White (1912) quien años después denominó a *Bacillus pluton* como la bacteria responsable de dicha enfermedad y, ante la imposibilidad de cultivarla, la describió únicamente en base a su examen microscópico. Posteriormente, fue Bailey (1957b) quien consiguió cultivarla y caracterizarla de una forma más detallada, dándole un nuevo nombre, *Streptococcus pluton*. No obstante, los análisis físico-químicos llevados a cabo sobre varias cepas de *S. pluton* mostraron un bajo contenido de las bases guanina y citosina en su ácido nucleico por lo que su retención dentro del género *Streptococcus* no estaba suficientemente fundamentada. Por eso, se describió un nuevo género denominado *Melissococcus* con una única especie llamada *Melissococcus pluton* (Bailey y Collins, 1982; Allen y Ball, 1993). Pero al analizar el significado etimológico de *M. pluton* (Plutón, Dios romano del inframundo) la bacteria fue definitivamente rebautizada como *Melissococcus plutonius* (perteneciente a Plutón o al inframundo) (Truper y de Clari, 1998). Cai y Collins (1994) hicieron un análisis comparativo de la secuencia genética que reveló que *M. plutonius* está filogenéticamente próxima al género *Enterococcus*.

Morfología de *Melissococcus plutonius*

Melissococcus plutonius es una bacteria Gram-positiva, no esporulada y de naturaleza pleomórfica que se puede observar bajo la forma de cocos lanceolados (0,5 x 1 µm) y que se presenta de forma aislada, en grupos o formando cadenas de longitud variable. Es una bacteria microaerofílica o anaeróbica que necesita CO₂ para su crecimiento así como la presencia de lisina, cisteína, peptona o extracto de levadura. Crece en un rango de pH de 7 a 9, con una temperatura óptima de 35°C. Fermenta los azúcares: glucosa, fructosa y manosa; siendo el resultado variable en el caso de la maltosa y la salicina. No utiliza el citrato y no crece en medios de cultivo básicos.

Biología de *Melissococcus plutonius*

La infección comienza cuando larvas de *A. mellifera*, ingieren alimento contaminado con la bacteria *M. plutonius* (Shimanuki 1997). El primer paso de la enfermedad pasa por la colonización asintomática del intestino medio (pH 6,5) donde las bacterias se instalan entre la membrana peritrófica y el alimento y se multiplican vigorosamente (Bailey 1983). A los 5

días, el área del intestino que debiera estar ocupada por el alimento está invadida por las bacterias. Primero destruye la membrana peritrófica y a medida que la infección progresa, invade el resto del epitelio intestinal.

Bailey (1983) sugirió que el efecto patógeno de la infección de *M. plutonius* resulta de la inanición de la larva ya que existe una competición por los nutrientes entre la larva infectada y la bacteria. Sin embargo, en infecciones experimentales realizadas posteriormente, en las que las larvas infectadas tenían alimento en exceso, los síntomas de enfermedad y la muerte de larvas infectadas seguían manifestándose (McKee y col., 2004). Por lo tanto, la muerte de la larva podría ser el resultado de mecanismos patogénicos adicionales como la invasión de la membrana peritrófica y la penetración del resto de los tejidos de la larva.

Los principales factores del segundo paso de la infección continúan siendo un enigma. Lo que se ha podido observar es que las larvas infectadas se vuelven frágiles, mostrando el sistema traqueal por transparencia, y en lugar de adoptar la posición enrollada normal, se desplazan en su celdilla; estirándose longitudinalmente y fundiéndose con las paredes para acabar finalmente muriendo, cuando la celda todavía está abierta, convertida en una masa más o menos fibrosa y filante con hilos de menos de 1,5 cm de largo de color marrón amarillento (Shimanuki, 1997).

Debido a la estrecha relación entre *M. plutonius* y *E. faecalis* y en base a los factores de virulencia de los enterococos, pueden realizarse importantes comparaciones. En general, las bacterias del género *Enterococcus* son idóneas para habitar en el tracto gastrointestinal de los mamíferos y la mayor parte existe como comensales en armonía con su hospedador y con el resto de bacterias que conforman la flora intestinal. Sin embargo, los tratamientos antibióticos disminuyen la inmunidad del hospedador y facilitan a la bacteria la adquisición de nuevas características que le permitan vencer las defensas de los hospedadores y colonizar nuevos nichos, permitiéndole así desviarse de su comportamiento comensal y llegar a ser patógena (Tendolkar y col., 2003).

La muerte de la larva infectada puede acelerarse en presencia de bacterias secundarias, que aunque no causan loque europea se pueden confundir con *M. plutonius* (OIE, 2008; Forsgren, 2010) y tienen una influencia importante en el olor y la consistencia de la cría muerta. Estas bacterias causan una serie de síntomas que pueden enmascarar la enfermedad y dificultar el correcto diagnóstico de campo.

Por un lado, *Achromobacter euidice* que es un habitante común del tracto digestivo de *A. mellifera*. La cantidad de esta bacteria aumenta en larvas infectadas con *M. plutonius*, permitiendo que los síntomas de la loque europea sean mucho más evidentes. La incidencia de *A. euidice* en abejas sanas es muy baja en invierno y mayor a principios de primavera, aumentando en verano. Debido a su naturaleza pleomórfica y que aparece como coco Gram positiva en ciertos estadios de su ciclo de vida, se ha llegado a confundir con *M. plutonius*. Sin embargo sus características de cultivo parecen estar mucho más relacionadas con

Corynebacterium pyogenes y su multiplicación es mínima bajo las condiciones necesarias para el cultivo microbiológico de *M. plutonius*.

Por otro lado, *E. faecalis* sólo se multiplica en larvas de abejas infectadas con *M. plutonius*, pudiendo llegar a ser patógena a dosis elevadas. Por ende, su presencia puede ser tomada como una evidencia presuntiva de loque europea. El hecho de que *E. faecalis* crezca perfectamente bajo las condiciones de *M. plutonius* y de que sean morfológicamente similares ha provocado la confusión entre ambas. Sin embargo, hay un rasgo que diferencia a *E. faecalis*, y es su habilidad para crecer aeróbicamente, formando pequeñas colonias transparentes en 24 h. Se multiplica en una variedad de medios comunes con o sin carbohidratos o CO₂ y el pH final en presencia de glucosa es de 4. *E. faecalis* raramente excede el número de *M. plutonius* en larvas de abejas e *in vitro* puede producir suficiente ácido para prevenir su multiplicación. A diferencia de *M. plutonius*, no permanece viable durante mucho tiempo en condiciones de sequía o persiste como contaminación mecánica dentro de las colonias de las abejas. Es responsable del olor agrio encontrado a veces en la loque europea.

Paenibacillus alvei es generalmente más común que *E. faecalis* en colonias de abejas afectadas con loque europea, pero no está invariablemente asociada con la enfermedad así que no puede actuar como un indicador fiable de ello. Se trata de una bacteria saprofita que sólo se multiplica en los restos de descomposición de larvas infectadas con *M. plutonius*, pudiendo incluso establecerse en colonias crónicamente enfermas. *P. alvei* es una bacteria aeróbica que forma rápidamente esporas tan resistentes que a menudo predominan sobre el resto de bacterias. *P. alvei* se multiplica con dificultad bajo las condiciones necesarias para el cultivo *in vitro* de *M. plutonius*. Produce un crecimiento expansivo de colonias transparentes, algunas de las cuales son móviles sobre la superficie del agar. Los cultivos tienen las características del olor a rancio que se asocia con la loque europea cuando *Bacillus* está presente.

Finalmente, *Brevibacillus laterosporus* es otra bacteria esporulada saprofita que puede encontrarse ocasionalmente sobre los restos larvarios en descomposición de un modo similar a *P. alvei*. Aunque no participan en el ciclo infectivo de *M. plutonius*, puede acelerar la muerte de la larva infectada además de tener influencia sobre el olor y consistencia de la cría muerta (Alippi, 1991).

Epidemiología de la loque europea

Las larvas de las abejas melíferas son susceptibles de sufrir loque europea en cualquier fase de su desarrollo, pero *M. plutonius* ataca principalmente a la cría sin opercular siendo el momento óptimo a las 48 h de edad larvaria o incluso antes. Alrededor de cien unidades formadoras de colonias (UFC) son suficientes para causar la infección en la larva (Bailey, 1960). En los bioensayos realizados por Mckee y col. (2004) se observó un fuerte correlación entre la dosis de *M. plutonius* y la mortalidad de la larva. No obstante, la infección por *M. plutonius* en larvas individuales no es siempre letal. Existen bioensayos en

las que larvas experimentalmente alimentadas con dosis altas de *M. plutonius* sobrevivieron a la infección para alcanzar la fase de pupa, aunque de una forma retrasada (McKee y col., 2004). Estas pupas defecan, dejando así las bacterias en los panales que pueden ser infecciosos durante años, a pesar de que esta bacteria no produzca esporas (Bailey 1981, 1983).

La bacteria sobrevive en las paredes de las celdas o en las heces y restos larvarios que quedan en el fondo de las mismas, así como en los restos de celdillas que caen al piso de la colmena pudiendo permanecer viable en estos depósitos y sobreviviendo largos períodos de desecación (Bailey, 1959).

La transmisión de *M. plutonius* tiene lugar cuando las abejas limpiadoras, después de limpiar las celdillas, llevan estas bacterias en su aparato bucal y las pasan de abeja a abeja durante el intercambio de comida para finalmente transferirlas nuevamente a las larvas cuando son alimentadas por las nodrizas (Bailey y Ball, 1991; Shimanuki, 1990). *M. plutonius* se localiza principalmente en larvas enfermas del área de cría, aunque también puede ser detectada en larvas y pupas sin ningún síntoma clínico (Forsgren y col., 2005).

La carga bacteriana de las obreras recogidas sobre el nido de cría es mayor que la de las abejas de la piquera (Roetschi y col., 2008), probablemente porque las primeras están en contacto directo con la cría infectada con grandes cantidades de bacterias. Además, tanto las obreras del nido de cría en colonias aparentemente sanas como las pecoreadoras pueden también contener altos niveles de *M. plutonius* (Roetschi y col., 2008) y actuar como portadores de bacterias no sólo dentro de la colonia si no también entre colonias y apiarios (McKee y col., 2003; Belloy y col., 2007). Asimismo, más de un tercio de las colonias de apiarios aparentemente sanos puede incluir abejas adultas portadoras de estas bacterias, dependiendo de la proximidad a otros asentamientos con casos clínicos de loque europea, y casi todas las colonias dentro de apiarios infectados contienen abejas adultas portadoras de *M. plutonius*. Esto significa además que en áreas regionalmente aisladas es posible que la bacteria pueda estar ausente (Belloy y col., 2007).

Otro factor a tener en cuenta en el contagio de loque europea es la estructura espacial del hospedador ya que se ha demostrado que la alta densidad de colonias y apiarios actúa como promotor de la transmisión de patógenos (Belloy y col., 2007). Asimismo existen algunas evidencias de que la transmisión también puede ocurrir por mordeduras del ácaro *V. destructor* (Kanbar y Engels, 2003).

Por otro lado, la contaminación habitual de la miel con *M. plutonius* (Hornitzky y Smith, 1998; McKee y col., 2003) sugiere que el pillaje podría contribuir a distribuir la bacteria entre las colonias y los colmenares. Las prácticas apícolas rutinarias también pueden contribuir a la rápida expansión de la loque europea al igual que el movimiento de colonias con una alta carga bacteriana de áreas endémicamente infectadas hacia áreas libres de enfermedad.

La loque europea tiene carácter estacional, ataca en primavera o principios de verano y ocasionalmente en otoño, sin embargo la aparición de brotes de la enfermedad se relaciona con las condiciones de estrés en la colonia, como la falta de alimento o agua. Además, otros factores como la genética, el clima y la geografía, pueden también jugar un papel importante (Bailey, 1960). Bailey (1983) explicó que la loque europea es una enfermedad propensa a permanecer inaparente durante un tiempo y a aparecer en forma de brotes repentinos, en ocasiones severos, seguidos por espontáneas recuperaciones unas pocas semanas después, especialmente a mediados de verano.

Los síntomas aparecen a los 4-5 días de edad larvaria, matándolas normalmente a esta edad, por tanto, las larvas más viejas son las menos afectadas por la infección (Bailey y Ball, 1991).

Repercusiones patológicas de la loque europea

La larva de *A. mellifera* infectada por *M. plutonius* se vuelve frágil, se seca y da lugar a una escama gomosa e irregular. En este caso, a diferencia de lo que ocurre en la loque americana, no hay adherencia a las paredes de las celdillas y la extracción del cadáver es siempre fácil (Llorente, 2003). Además de las modificaciones en la consistencia, la larva sufre una serie de cambios en la coloración desde el blanco perlado normal, al amarillo, para posteriormente pasar a marrón y finalmente, cuando ya están descompuestas, alcanzar un color negro-grisáceo (Bailey, 1960).

Generalmente las larvas mueren antes de que la celdilla sea sellada y son expulsadas de la colonia por las obreras limpiadoras. Sin embargo, también pueden morir después de la operculación y vaciar su infectividad con el contenido intestinal dentro de las celdillas de la cría. Incluso puede suceder que las larvas infectadas muden con éxito a pupa, con una forma, tamaño y peso de adulto normal o ligeramente inferior, cuando se comparan con sus homólogos sin infectar, apoyando así la idea de que la infección crea altas demandas de energía (Bailey 1960, Mckee y col., 2004).

Si una alta proporción de larvas muere después de la operculación, los opérculos de las celdillas aparecen hundidos, en lugar de su posición cóncava normal, e incluso perforados, confiriendo un patrón de la cría “en mosaico”.

Diagnóstico de la loque europea

El diagnóstico de la infección de una colonia de *A. mellifera* por *M. plutonius* debería empezar con una inspección visual sobre las colonias. Sin embargo, la inexperiencia de los apicultores con la loque europea y la necesidad de comunicar semestralmente esta enfermedad a la UE (lista C del anexo I del RD 617/2007; OIE, 2012) hace que sea inevitable la confirmación laboratorial del diagnóstico antes de tomar cualquier tipo de medida. Para ello la OIE (2008) propone los siguientes métodos.

1. Examen microscópico

Las larvas recién muertas son las mejores muestras sobre las que realizar cualquier tipo de análisis. Antes de la descomposición de la larva se puede hacer una extensión en un portaobjetos, bien directamente de la larva enferma o bien de los contenidos del intestino medio previamente extraídos del centro del cuerpo con la ayuda de un par de fórceps que separan la cutícula. En el portaobjetos todavía aparece la membrana peritrófica transparente y gelatinosa parcial o casi completamente invadida por *M. plutonius*. El contenido del intestino medio de las larvas sanas tiene un color marrón-oro y puede contener una mezcla de bacterias y polen. Cuando el contenido de polen es abundante es importante diferenciarlas, ya que el intestino adquiere un color claro que puede parecerse a aquellos que están llenos de bacterias.

Para la investigación bacteriológica, se toma una gota de una suspensión diluida del contenido del intestino medio, se transfiere a un portaobjetos limpio y se mezcla con una gota de nigrosina al 5%. Esto se reparte en uno o dos centímetros cuadrados, se seca sobre la llama, y se examina directamente bajo microscopio. La presencia de numerosos cocos lanceolados (0,5 x 1 µm), individualmente o en grupos (pares o pequeñas cadenas) es casi ciertamente diagnóstico de loque europea, sin embargo la presencia de algunas bacterias asociadas a *M. plutonius* con morfología similar (*P. alvei* y *B. euridice*) pueden dificultar su identificación.

2. Cultivo microbiológico

Melissococcus plutonius se puede cultivar en un medio específico propuesto por la OIE (2008). Las placas son incubadas anaeróticamente en una atmósfera de aproximadamente 5-10% CO₂ a 35°C. A los cuatro días, aparecen pequeñas colonias blancas y opacas de *M. plutonius*. Debido a la naturaleza pleomórfica de esta bacteria *in vitro*, a menudo aparece con forma de varilla.

3. Métodos inmunológicos

Pinnock y Featherstone (1984) propusieron un método ELISA para la confirmación de la presencia de este agente nosógeno. Además, también se ha desarrollado y comercializado una *test* para la identificación de los anticuerpos frente a *M. plutonius* que proporciona una rápida confirmación de la infección de la loque europea en las larvas de abejas melíferas (*VITA diagnostic kit*®).

4. Identificación molecular

Si bien la técnica molecular recomendada por la OIE (2008) es una PCR anidada desarrollada en 1998 por Djordjevic y col., (1998) sobre el gen 16S del ARNr, ese mismo año Govan y col. (1998) propusieron una PCR convencional. Y más recientemente se han desarrollado varias técnicas de PCR a tiempo real para la detección y cuantificación de *M. plutonius* (Ha y col., 2006; Roetschi et al. 2008).

Control de la loque europea

El medicamento de uso veterinario más empleado es la oxitetraciclina (OTC). Se trata de un antibiótico bacteriostático que inhibe la multiplicación de *M. plutonius* y es usado en muchos países (Thompson y Brown, 2001). Sin embargo, ya se han detectado resistencias a este antibióticos en Estados Unidos (Miyagi y col., 2000), donde la OTC se empleaba como preventivo tanto para la loque europea como americana. En otros países como Australia o Reino Unido, *M. plutonius* todavía sigue siendo susceptible a OTC (Waite y col., 2003; Hornitzky y Smith, 1999).

Una alternativa a la oxitetraciclina empleada en Gran Bretaña es el Método Enjambre Agitado (*shook swarm method*). Consiste en agitar las abejas sobre un nuevo cuadro fundido y destruir el cuadro infectado, sin embargo las colonias fuertemente infectadas mueren sin remedio (Wilkins y col., 2007).

3.1.7 Virus

De los 18 virus descritos en abejas, 8 son los que provocan la mayoría de las infecciones y han sido objeto de los estudios más recientes: el virus de las alas deformadas (VAD), el virus de las realeras negras (VRN), el virus de la cría ensacada (VCS), el virus Kashmir (VK), el virus de la parálisis aguda (VPA), virus de la parálisis crónica (VPC), el virus israelí de la parálisis aguda (VIPA) y el virus filamentoso (VF). El contenido genético de todos estos virus es el ARN monocatenario dispuesto en partículas isométricas de 30-nm a excepción del VF que contiene ADN.

Es importante destacar el papel del ácaro *Varroa* como vector de algunos virus tal como se ha explicado con anterioridad. Por otro lado, el diagnóstico en base a la sintomatología producida por cada uno de los virus que afecta a las abejas melíferas, solamente se puede realizar en aquellos casos en los que los síntomas son muy evidentes. La información de la secuenciación parcial o completa del genoma de los virus disponible en bancos de datos genéticos ha contribuido al desarrollo de métodos de diagnóstico basados en la reacción de retrotranscripción para la detección de ARN viral en muestras de abejas melíferas (Stoltz y col., 1995; Benjeddou y col., 2001; Grabensteiner y col., 2001; Bakonyi y col., 2002; Ribière y col., 2002; Tentcheva y col., 2004; Chen y col., 2005; Berényi y col., 2006; Teixeira y col., 2008).

3.1.7.1 Virus de las alas deformadas

Se aisló por vez primera en abejas enfermas en Japón (Bailey y Ball, 1991) y actualmente es el virus de las abejas que presenta mayor distribución (Ellis y Munn, 2005; Lanzi y col., 2006).

Es responsable de una sintomatología definida: acortamiento del abdomen lo que conlleva una disminución del tamaño del cuerpo, alas arrugadas, decoloración en las abejas adultas y en definitiva, una disminución del período de vida (Bailey y Ball, 1991; Ball y Bailey,

1997; Yue y Genersch, 2005). Sin embargo, el mecanismo por el cual el virus produce estas malformaciones en el hospedador es todavía desconocido.

3.1.7.2 Virus de la cría ensacada

El VCS se identificó en Estados Unidos en 1913 (White, 1913) y en la actualidad la infección por dicho virus se ha encontrado en cada continente donde *A. mellifera* está presente (Allen y Ball, 1996; Ellis y Munn, 2005).

Las larvas afectadas adquieren la apariencia de un saco lleno de un fluido que contiene millones de partículas víricas. Esta apariencia es característica a la hora de su diagnóstico tanto en campo como en laboratorio. Asimismo, cuando la colonia está altamente infectada, se pierde la estructura normal de la cría apareciendo cría dispersa, parcial o totalmente desoperculada. Las larvas tornan oscuras y las escamas ensacadas y frágiles son fácilmente eliminadas a diferencia de lo que ocurre con larvas infectadas por *P. larvae*.

3.1.7.3 Virus de las realeras negras

El VRN presenta una distribución mundial (Allen y Ball, 1996; Ellis y Munn, 2005). Afecta principalmente al desarrollo de las larvas y pupas de reinas cuando las celdillas han sido operculadas. Se multiplica fácilmente en el estadio de pupa y éstas adquieren un color oscuro y mueren rápidamente. La pared de la celdilla real también se oscurece y muestra así un síntoma característico de esta enfermedad.

En condiciones de campo, la enfermedad producida por el virus de las realeras negras se ha relacionado con la infección por *N. apis* (Allen y Ball, 1996; Bailey, 1981; Bailey y col., 1983). Sin embargo, quedan por determinar las evidencias experimentales que ayuden a descifrar el mecanismo por el que *N. apis* activa y transmite el virus.

3.1.7.4 Virus Kashmir

El VK se aisló en abejas adultas de *Apis mellifera* después de haber sido inoculadas experimentalmente con un extracto preparado a partir de abejas asiáticas enfermas (*A. cerana*) en Kashmir, región del noroeste de India, de ahí su nombre (Bailey y Woods, 1977).

Este virus ataca a todos los estadios del ciclo de vida de las abejas (Hornitzky, 1981,1982) y normalmente persiste en la cría y en las abejas adultas como una infección inaparente sin sintomatología clara (Dall, 1985).

El VK está genética, serológica y patológicamente relacionado con el VPA. Ambos virus persisten en infecciones inaparentes y se replican fácilmente sólo cuando son inyectados en la hemolinfa de las abejas adultas (Anderson, 1991). Diversos análisis moleculares revelaron que estos dos virus comparten alrededor de un 70% de homología en

su secuencia genética, aunque hay diferencias significativas en áreas críticas del genoma entre ellos (De Miranda y col., 2004).

3.1.7.5 Virus de la parálisis aguda

Se descubrió durante infecciones experimentales con el VPC (Bailey y col., 1963) y actualmente tiene una distribución mundial (Allen y Ball, 1996; Ellis y Munn, 2005).

El VPA puede infectar tanto a abejas adultas como a la cría. Las larvas infectadas con grandes cantidades de virus antes de ser operculadas las celdillas, sobreviven como abejas adultas inaparentemente infectadas (Bailey y Ball, 1991). No obstante, la sintomatología típica con la que cursa esta patología pasa por incapacidad para volar, temblores y muerte rápida.

3.1.7.6 Virus de la parálisis crónica

Este virus se identificó como causante de la parálisis crónica (Bailey y col., 1963) después de sospechar de *A. woodi* como culpable del síntoma de parálisis. En la actualidad se ha detectado en abejas adultas de *A. mellifera* de todos los continentes a excepción de Sudamérica (Allen y Ball, 1996; Ellis y Munn, 2005).

El VPC ataca principalmente a abejas adultas y causa enfermedad infecto-contagiosa que puede cursar de dos formas (Bailey y col., 1963). La más común está caracterizada por un anormal temblor del cuerpo y de las alas, las abejas reptan por el suelo debido a la incapacidad para volar, presentan el abdomen hinchado y las alas dislocadas. La otra forma se caracteriza por la ausencia de pelo y por la apariencia oscura y brillante de las abejas que son atacadas y rechazadas por las abejas guardianas a su regreso a la colmena. Ambas formas se pueden observar en abejas de la misma colonia. La variación en los síntomas de la enfermedad puede reflejar diferencias entre los individuos por su susceptibilidad inherente a la multiplicación de los virus (Kulincevic y Rothenbuhler, 1975; Rinderer y col., 1975).

3.1.7.7 Virus israelí de la parálisis aguda

Se trata de un virus identificado por primera vez en colonias de abejas melíferas en Israel y que ha sido parcialmente secuenciado y caracterizado como *Dicistroviridae* (Mayo, 2002; Liljas y col., 2002).

Las abejas afectadas exhiben un comportamiento inusual, moviendo de un modo anormal las alas que desencadena una parálisis del insecto. Además, la colmena sufre una pérdida en la población de abejas obreras.

Cox-Foster y col. (2007) descubrieron una correlación entre el despoblamiento de las colmenas (fenómeno del colapso de colonias o CCD) de las abejas melíferas y este virus. Sin embargo, este descubrimiento no identifica el virus como la causa del despoblamiento de las colonias.

3.1.7.8 Virus filamentoso

Originalmente se pensaba que este virus era una rickettsia, pero en 1978 se identificó como un virus en EE. UU. (Clark, 1978).

Se multiplica en el cuerpo graso y en los tejidos ováricos de las abejas adultas. La hemolinfa de las abejas infectadas se convierte en un fluido lechoso con partículas víricas. Además de esto, no hay otros síntomas conocidos. La incidencia del virus muestra un regular ciclo anual con picos llamativos en mayo y en septiembre (Bailey y Ball, 1991).

3.2 Agentes nosógenos abióticos: Pesticidas

El papel ecológico y económico más importante de las abejas es el servicio que proporcionan como polinizadores de muchos cultivos y plantas silvestres (vanEngelsdorp y Meixner, 2010). No obstante, las abejas son seres vivos sensibles y susceptibles a una amplio número de amenazas medioambientales, algunas de las cuales han aumentado significativamente en los últimos 5 a 10 años (Genersh, 2010). Entre ellas, es bien conocido el efecto potencialmente nocivo que ciertos tratamientos agrícolas pueden tener en este grupo de beneficiosos insectos (FAO, 2008) y por ende, desde hace varios años se investiga la contaminación de los productos apícolas con pesticidas (Bogdanov y col., 1998; Jiménez y col., 2005). El origen de este tipo de contaminantes puede ser agrícola (agropesticidas) o ganadero (p. ej. acaricidas), e incluso algunos de los compuestos se usan en ambas actividades.

En la última década, se ha denunciado un aumento en la pérdida de colonias de abejas en varios países europeos y americanos (Gross 2007, 2008) incluido España, donde datos recientes de muchos apicultores indica una pérdida del 80% de colmenas (COST office action FA0803-COLOSS y datos sin publicar del CA). Varios investigadores han supuesto que es un problema multifactorial en el que factores externos como pesticidas pueden llegar a confundir a las abejas, impidiéndoles encontrar su camino de regreso a la colonia o causándoles directamente la muerte (El Hassani y col., 2005; Rortais y col., 2005; Gross, 2008). De este modo, hay varias líneas de investigación dedicada a medir el contenido de residuos (Chauzat y col., 2009; Mullin y col., 2010), para buscar compuestos específicos principalmente relacionados a la evaluación de posibles efectos subletales de algunos pesticidas en las abejas, lo cual está aumentando el interés entre los científicos, apicultores y autoridades reguladoras (Halm y col., 2006; Nguyen y col., 2009).

Como ya se comentó anteriormente, desde la introducción de *V. destructor* en la colonias de abejas europeas (*A. mellifera*), los apicultores han intentado controlar el número de ácaros para prevenir las pérdidas de colonias. La mayoría de los tratamientos acaricidas (apartado 3.1.1) dejan residuos en la colmena y en algunas ocasiones, los apicultores utilizan para dichos tratamientos concentraciones incorrectas o incluso sustancias no registradas y

cuyos efectos sobre las abejas (subletales o a largo plazo) no se ha determinado convenientemente (M'Diaye y Bounias, 1991).

Las abejas pueden introducir insecticidas sistémicos a la colmena e intoxicar al conjunto de la colonia a través del transporte de polen y néctar contaminados en regiones de cultivos tratados extensamente por este tipo de insecticidas. (Bos y Masson, 1983; Villa y col., 2000). La mayoría de los pesticidas rociados en la superficie de la planta tienen una acción rápida y residual que pueden persistir desde unas pocas horas a unos cuantos días, mientras que los insecticidas sistémicos penetran en la planta incluyendo plantas melíferas y poliníferas (Rortais y col., 2005). Los insecticidas en las plantas pueden ser tóxicos para las abejas obreras que están pecoreando y entran en contacto con plantas tratadas (Koch y Weisser, 1997) o a través de la absorción de partículas de polvo contaminado mientras vuelan (Prier y col., 2001). El riesgo de la transferencia de algunos químicos es más grande con los insecticidas sistémicos (Waller y col., 1984).

El análisis de abejas y otros productos apícolas (miel, cera y polen) normalmente provee indicadores útiles con respecto a la difusión de éstos y otros contaminantes dentro del medio ambiente y es común que los investigadores los utilicen como herramientas para evaluar la contaminación medioambiental en áreas industriales o agrícolas (De Greef y col., 1994; Wallner, 1999; Chauzat y col., 2006; Belayiannis y Belayiannis, 2008; Gross, 2008). De hecho, el polen es uno de los productos apícolas analizado a menudo para controlar la presencia de pesticidas relacionados con la mortalidad de las abejas (Johansen y Brown, 1972; Waller y col., 1984; Kubik y col., 1999). Asimismo, existen varios estudios en los que se han monitorizado residuos de acaricidas en cera de abejas como el bromopropilato (Hansen y Petersen, 1988;), cumafós (Tremolada y col., 2004), amitraz (Lodesani y col., 1992), flualinato (Lodesani y col., 1992; Tsigouri y col., 2004) y tetradifón, un compuesto mayoritariamente usado en países asiáticos.

No obstante, dentro de los insecticidas destacan la imidacloprida (Gaucho®) y el fipronil (Regent®), que en la última década, se han relacionado estrechamente con la pérdida de colonias (Suchail y col., 2000).

En cuanto al fipronil es un fenilpirazol que actúa como insecticida sistémico de segunda generación ampliamente usado en medicina veterinaria ya que impide la transmisión del impulso nervioso estimulando la acción del ácido gamma aminobutírico, el cual se fija sobre los receptores impidiendo el impulso nervioso (Cole y col., 1993). Provoca hiperexcitación, convulsiones y parálisis que causan la muerte de los insectos. Tiene excelente actividad terapéutica y persistente contra pulgas y garrapatas cuando se administra de forma tópica en los animales domésticos (Hainzl y Casida, 1996; Le Faouder y col., 2007). Como el fipronil es también efectivo a bajas dosis contra numerosos insectos terrestres como las plagas de los cultivos (Balança y de Visscher, 1997) se usa también como pesticida, así como para el control de muchos suelos e insectos foliares en una variedad de cultivos.

Sin embargo, los efectos de este compuesto (y sus metabolitos) sobre las abejas varían según la concentración a la que son sometidas ya que afecta a distintos receptores con diferente afinidad por cada uno de ellos. La concentración más baja de fipronil podría bloquear un primer receptor, desencadenando determinados efectos en el comportamiento (como por ejemplo, extensión de la proboscide como respuesta a la sacarosa) y una concentración más alta bloquearía otros receptores que a su vez antagonizarían los efectos del primero. Alternativamente, este efecto no lineal también se desencadena por diferentes metabolitos del fipronil.

En España, el fipronil está registrado como producto fitosanitario desde 2002 y su uso está autorizado para girasol y maíz, por lo que su aplicación a las semillas de girasol es bastante reciente y limitada a áreas específicas en el centro y sur de nuestro país.

Por otra parte, en el registro de productos fitosanitarios del MAGRAMA además de Gaucho® figuran desde 1993 otros productos autorizados cuyo principio activo es la imidacloprida, con concentraciones que oscilan entre el 0,015 y el 70%. La imidacloprida es un insecticida que pertenece a la familia de los neonicotinoides, es altamente tóxico para las abejas y produce un pico de mortalidad inesperado a muy bajas dosis lo que puede explicarse por la alta toxicidad de sus metabolitos (Suchail y col., 2001). Además se han descrito varias alteraciones en el comportamiento en abejas expuestas a varias concentraciones de imidacloprida como cambios en el comportamiento pecoreador y recolector de alimento (Colin y col., 2001), pérdida de capacidad para comunicar la localización de las fuentes de alimentos (Kirchner, 1999) y capacidad de aprendizaje (Decourtye y col., 2003). Asimismo, las abejas son más sensibles a la acción tóxica de la imidacloprida y sus metabolitos durante el verano, momento en el que podrían aparecer signos clínicos de intoxicación (Suchail y col., 2004) que afectan principalmente al sistema nervioso y pueden ocasionar incluso la muerte de las abejas. En el otoño-invierno, las abejas son menos sensibles a la intoxicación con estas sustancias (Decourtye y col., 2003), por lo que no parecen ser las responsables de la reducción de abejas que se produce fundamentalmente en la otoñada. Recientemente se ha descrito que el consumo de polen almacenado en la cámara de cría y contaminado con las sustancias anteriormente descritas durante esta época del año, podía afectar a colonias de abejas ya debilitadas o afectadas de otras patologías (Faucon y col., 2005).

MATERIAL Y MÉTODOS

4 Diseño del estudio nacional

4.1 Cálculo muestral

Uno de los objetivos iniciales de este estudio fue analizar la relación del problema con la presencia de diferentes agentes nosógenos, con la frecuencia y características del fenómeno del despoblamiento y pérdidas de colonias en las explotaciones analizadas. Además, se incluyó en el diseño la distribución de varios factores medioambientales en un cuestionario epidemiológico que debía ayudar a generar una hipótesis sobre los factores de riesgo asociados al fenómeno descrito.

Se preparó un estudio transversal y se programó una toma de muestras que se llevó a cabo 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 nosógenos que pueden afectar a las colonias de abejas melíferas en España. Los estudios transversales proporcionan una instantánea de la situación epidemiológica en un determinado momento, es decir, permiten estimar la prevalencia y distribución de los patógenos en un momento dado (sin continuidad en el eje del tiempo) ya que en ellos, la población total o una muestra representativa de ella, es estudiada en un momento y lugar determinado. El carácter transversal proviene de la medición de la variable dependiente (enfermedad u otra situación) en un momento determinado. Asimismo, estos estudios son útiles para identificar y cuantificar posibles factores de riesgo. En ellos, la población total o una muestra representativa de ella, es estudiada en un momento y lugar determinado.

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 CA, teniendo en cuenta una prevalencia estimada de la pérdida de colonias 40% en base a datos previos del CA, un error aceptado del 10% y un nivel de confianza del 95%. Asimismo, el cálculo se realizó en función del censo de apicultores y su distribución por comunidad autónoma (REGA 01/05/2011). La finalidad era realizar cuatro muestreos sobre la misma colmena, dos en 2006 (primavera/otoño) y dos en 2007 (primavera/otoño).

Cada colmena (unidad epidemiológica) incluida finalmente en el estudio se muestreó y clasificó subjetivamente por un veterinario como afectada por el fenómeno de despoblamiento o pérdida de colonia (PC) o asintomática. Los criterios de definición de PC fueron los utilizados previamente (Higes y col., 2010a) y establecidos de acuerdo al AFSSA 2008 y recomendaciones del EFSA 2009. Por lo tanto las colmenas definidas como PC debían cumplir alguna de estas premisas: desaparición de las abejas adultas de las colmenas con poca o ninguna acumulación de abejas muertas en o delante de la colonia; significativa mortalidad en el colmenar de colonias de abejas en otoño/invierno sin síntomas previos de cualquier enfermedad; o despoblamiento neto de la colonia de abejas muestreada en el estudio. La información sobre posibles factores de riesgo asociados con el estado de PC, se obtuvo a través de una encuesta relativo a la información general y sanitaria con respecto al

año anterior para cada apiario, o mediante análisis de laboratorio correspondientes (presencia de agentes nosógenos bióticos y/o abióticos, flora circundante, etc.).

4.2 Tipo de muestra y obtención de los datos

El estudio se dio a conocer en diversas jornadas y congresos nacionales con la finalidad de establecer contactos con el mayor número posible de participantes distribuidos por toda la geografía española. En aquellos casos en los que no se pudo contactar de un modo directo, se hizo por vía telefónica. Asimismo, con el objetivo de alcanzar una mayor organización se contactó, principalmente con asociaciones apícolas y/o veterinarios de la administración pública que coordinasen el reparto y recogida de material de muestreo.

Para el análisis de los principales agentes nosógenos que pueden afectar a las abejas melíferas, se solicitaron muestras de abejas adultas, cría de abeja, polen de reserva, miel y cera. Con la finalidad de facilitar el envío de muestras al laboratorio, se prepararon paquetes que se enviaron a los organismos participantes.

En el diseño del paquete (Fig. 8) que se envió para cada uno de los cuatro muestreos, se tuvo en cuenta, tanto el tamaño de las muestras a analizar, como el material (cartón o plástico) donde debían ser recogidos con el fin de garantizar su conservación desde su recogida en el campo hasta su recepción en el laboratorio. Además, se usaron bolsas de plástico que contenían todos los recipientes para la recogida de muestras.

Finalmente, se eligieron cajas de cartón identificadas con pegatinas de color verde para las abejas adultas y amarillo para la cría; botes de plástico estériles de 100 mL identificadas con el texto miel y otros similares para el polen. Para la identificación de la colmena centinela, se diseñaron unas etiquetas adhesivas de un material resistente a las inclemencias meteorológicas y al paso del tiempo, que debían colocarse al inicio del estudio en una parte visible de dicha colmena. Asimismo, y con el objetivo de facilitar la toma de muestras, se envió una hoja con las instrucciones de cómo se debía realizar.

Figura 8. Paquete muestreo. 1. Caja para cría. 2. Caja para abejas adultas. 3. Bote para miel. 4. Bote para polen. 5. Identificador de colmena. 6. Hoja de instrucciones. 7. Encuesta epidemiológica.



El muestreo transversal sobre la colmena centinela (unidad epidemiológica) requería que la elección de la misma, se realizara de forma aleatoria, es decir, sin exclusión de aquellas enfermas ni selección anticipada de las más sanas.

Los paquetes con todo el material necesario para la recogida de las muestras se enviaron a través de un servicio de mensajería, a las Asociaciones y servicios veterinarios de Comunidades Autónomas participantes en el estudio.

4.3 Toma de muestra

Las muestras fueron recogidas en las explotaciones apícolas tanto por los propios apicultores como por los veterinarios de los servicios oficiales o de las Asociaciones y se mantuvieron en congelación hasta su envío al CA. Las cajas utilizadas para el transporte al CA eran en su mayor parte de cartón con o sin revestimiento interno de aluminio y en menor medida de poliestireno expandido. En todos los casos se enviaron con acumuladores de frío comerciales o caseros para conservar las muestras en condiciones adecuadas para su posterior análisis laboratorial.

4.4 Recepción y organización de las muestras

Una vez que los paquetes de muestreo llegaron al laboratorio, se registraron de forma correlativa en un libro de registro siguiendo el orden de llegada. A cada una de las bolsas y del material que contenía en su interior (abejas adultas, cría, polen, miel, cera y encuesta epidemiológica) y que procedía de la misma colmena, se le asignó el mismo número de registro.

Todas aquellas incidencias en la recepción del material biológico, como la falta de alguna de las muestras o la falta de los datos en la encuesta, quedaron reflejados tanto en el libro de registro como en la base de datos informática.

Cada muestra se dividió en las correspondientes submuestras (abejas adultas, cría, polen, miel y cera) y se identificaron con su codificación. A continuación, cada una de ellas se procesó y almacenó, como se detalla a continuación:

1.- Abejas adultas: Cada muestra constaba de unas 200 abejas adultas, mayoritariamente obreras, aunque en ocasiones incluían otras castas (zánganos o reinas). De todas ellas se hizo un primer examen macroscópico para evaluar la morfología externa del insecto (tamaño, color, presencia de alteraciones anatómicas), además de la presencia o ausencia de ectoparásitos (*V. destructor*, *B. coeca*, *Tropilaelaps* spp). En aquellas ocasiones en las que se recibieron reinas, éstas se almacenaron independientemente en viales de 1.5 mL a -20°C. El resto de abejas (y zánganos) se guardó en tubos de plástico de 30 mL del siguiente modo:

- Alrededor de 100 abejas a -20°C para los análisis de presencia de *V. destructor*, *Nosema* spp. y *Acarapis* spp en el CA.
- Alrededor de 100 abejas a -80°C para los análisis de presencia de virus.
- Unas 50 abejas a -20°C en el CA como referencia para contrastar o ampliar técnicas.

Cuando se detectó *V. destructor*, tras la primera inspección macroscópica, las varroas se recogieron individualmente mediante la ayuda de un pincel y se almacenaron en viales de 1,5 mL en etanol (100%), para posteriores análisis (haplotipo) identificándose correspondientemente.

En el caso de detectar *B. coeca*, el procesamiento fue similar al caso anteriormente descrito.

2.- Cría: Sobre ésta se realizó un primer examen macroscópico para evaluar el estado de los opérculos (en la cría operculada durante la fase de metamorfosis) y de la propia cría (tamaño, forma, así como presencia de *V. destructor*). A continuación se congeló a -20°C para posteriormente y con ayuda de pinzas estériles, extraer una a una, tanto larvas como pupas, evitando de este modo la descomposición de las mismas. Para su almacenamiento se utilizó el mismo tipo de tubos que para las abejas adultas y se mantuvo a una temperatura de -20°C.

3.- Polen de reserva o pan de abejas: el polen almacenado en las celdillas del trozo de panal recibido, se extrajo asépticamente con la ayuda de espátulas estériles, guardándose y almacenándose en oscuridad del mismo modo que la cría. Se subdividió de la siguiente forma:

- Alrededor de 100 g para la determinación de residuos de pesticidas.
- De cinco a diez g para el análisis palinológico.
- Una pequeña porción se conservó en el laboratorio de Patología Apícola del CA como referencia.

Después de la extracción del polen del trozo de panal, se obtuvo cera que se almacenó del mismo modo que la cría.

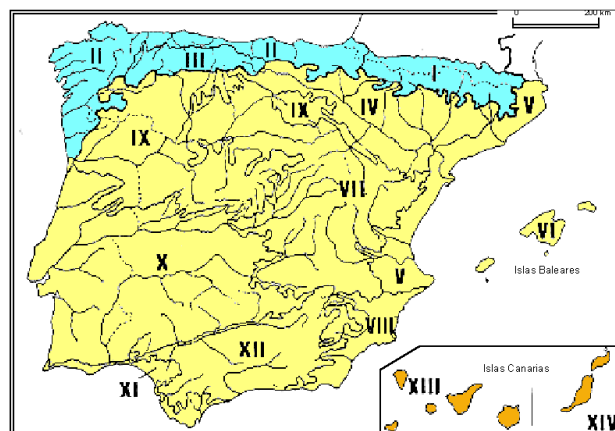
4.- Miel: En la mayoría de las ocasiones la miel que se recibió era directamente de panal, pero en otras era miel ya extraída. En ambos casos, se almacenó en oscuridad a -20°C.

5.- Encuesta Epidemiológica: La encuesta original cumplimentada, se guardó en un archivo en las oficinas del CA. Previamente se hizo una copia de la misma que se adjuntó a las hojas de laboratorio en las que se registraban los resultados obtenidos en los análisis de las diferentes matrices que componen la muestra (Anexo I).

4.5 Clasificación climática de España

Para el estudio de la posible relación entre la presencia de agentes nosógenos y las características climáticas de España, se utilizó la clasificación de los pisos bioclimáticos descritos por Rivas-Martínez (1987). En la clasificación y mapas elaborados por dicho autor 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. De esta forma, en cada región o grupo de regiones españolas afines existen unos peculiares pisos bioclimáticos con unos valores e intervalos que le son propios (Rivas-Martínez, 1983). Así, en España se consideran 3 regiones diferentes (Fig. 9): I. Eurosiberiana, II. Mediterránea y III. Macaronésica. Las dos primeras se encuentran separadas entre sí por las cordilleras Pirenaica y Cantábrica, situándose la Eurosiberiana al norte de ellas y la Mediterránea al sur incluyendo las Islas Baleares. La principal diferencia entre estas dos regiones es el ombroclima, ya que en la segunda existe siempre un período más o menos largo de aridez o sequía estival independientemente de la cantidad de precipitación media anual. Por otro lado, la región Eurosiberiana presenta características climáticas propias de la Europa Occidental con inviernos suaves, veranos frescos, aire húmedo, abundante nubosidad y lluvias frecuentes en todas las estaciones. Por último, la zona Macaronésica que engloba a las Islas Canarias presenta clima subtropical.

Figura 9. Clasificación climática de España. **Región Eurosiberiana.** I: Pirenaica. II: Cántabro-atlántica. III: Orocantábrica. **Región Mediterránea.** IV: Aragonesa. V: Catalano-Valenciano-Provenzal. VI: Balear. VII: Castellano-Maestrazgo-Manchega. VIII: Murciano-Almeriense. IX: Carpetano-Ibérico-Leonesa. X: Luso-Extremadurenses. XI: Gaditano-Onubo-Algarviense. XII: Bética. **Región Macaronésica.** XIII: Canaria Occidental. XIV: Canaria Oriental (Según Rivas-Martínez, 1987).



En los mapas elaborados por Rivas-Martínez (1987), que se encuentran disponibles en la página web del MARM, se han descrito dentro de estas tres regiones corológicas trece pisos bioclimáticos (Tabla 6), cuyos principales índices e intervalos termoclimáticos de diagnóstico son los siguientes:

Tabla 6. Clasificación climática de España según Rivas-Martínez (1987)

Piso	Definición Piso	Clima Piso
A	Piso alpino	T < 3°, m < -8°, M < 0°, It < -50, H 1-12
B	Piso subalpino	T 6 a 3°, m -4 a -8°, M 3 a 0°, It 50 a -50, H 1-12
C	Piso montano	T 12 a 6°, m 2 a -4°, M 10 a 3°, It 240 a 50, H 9-6
D	Piso colino	T > 12°, m > 2°, M > 10°, It > 240, H 11-4
E	Piso crioromediterráneo	T < 4° m < -7°, M < 0, It < -30, H 1-12
F	Piso oromediterráneo	T 8 a 4°, m -4 a -7°, M 2 a 0°, It 60 a -30, H 1-12
G	Piso supramediterráneo	T 13 a 8°, m -1 a -4°, M 9 a 2°, It 210 a 60, H 9-6
H	Piso mesomediterráneo	T 17 a 13°, m 4 a -1°, M 14 a 9°, It 350 a 210, H 10-4
I	Piso termomediterráneo	T 19 a 17°, m 10 a 4°, M 18 a 14°, It 470 a 350, H 12-2
K	Piso orocanario	T < 6°, m < -2°, M < 4°, It < 80, H 9-6
L	Piso supracanario	T 11 a 6°, m 2 a -2°, M 9 a 4°, It 220 a 80, H 9-5
M	Piso mesocanario	T 15 a 11°, m 6 a 2°, M 13 a 9°, It 340 a 220, H 12-2
N	Piso termocanario	T 19 a 15°, m 11 a 6°, M 18 a 13°, It 480 a 340, H O
O	Piso infracanario	T > 19°, m > 11°, M > 18°, It > 480, H O

T: temperatura media anual (°C); m: temperatura media de las mínimas del mes más frío (°C); M: temperatura media de las máximas del mes más frío; It: índice de termicidad (T+m+M) x 10 H: meses en los que, estadísticamente, son posibles las heladas.

5 Diseño del estudio regional

El estudio regional se llevó a cabo en la comunidad autónoma de Galicia y su diseño fue prácticamente igual al estudio nacional anteriormente descrito. Se tomó especial cuidado en la respuesta de la encuesta sobre el término despoblamiento o pérdida de colmenas, por la experiencia previa del estudio nacional ya que la inexactitud de respuesta invalidó el análisis estadístico posterior.

En este caso, se tomó como población de referencia el censo apícola de la región (según los datos aportados por el Centro de Investigaciones agrarias de Mabegondo de la Xunta de Galicia) y se tuvo en cuenta una prevalencia esperada de la pérdida de colonias del 67% (Higes y col., 2010a), un error aceptado del 10% y un nivel de confianza del 95%.

La toma de muestras se llevó a cabo desde mayo hasta julio de 2008 y para minimizar los errores, un veterinario fue el encargado de recogerlas. La recolección de las muestras se hizo de forma aleatoria simple, distribuidas en proporción a los apicultores en cada provincia.

El tipo de muestras, el material utilizado para su recolección, así como la recepción de las mismas y la definición del caso PC es igual al descrito en el apartado tal con la salvedad de que en el estudio regional se diferenciaron entre abejas adultas de interior y de exterior de colmena.

6 Encuesta epidemiológica

Para la obtención de datos de carácter ambiental, zootécnico y sanitario se diseñó una encuesta epidemiológica (Anexo I) que debía ser cumplimentada en cada una de las explotaciones muestreadas. La encuesta estaba constituida por diferentes apartados (Tabla 7) para recabar la máxima información de la explotación apícola origen de la muestra recogida.

Tabla 7. Variables incluídas en la encuesta epidemiológica y en el estudio.

Datos generales relacionados con las instalaciones (n = 7)
Localización, coordenadas geográficas (UTM), número de apiarios, número de colonias da abejas, tipos de colmenas, tipo de producción apícola y actividad transhumante
Información sanitaria relacionada con el año anterior (n = 4)
Control de varroosis, productos aplicados, número de tratamientos/año, duración de tratamientos (semanas) y dosis empleada
Lista de agentes nosógenos bióticos testados (n = 14)
<i>V. destructor</i> , <i>A. woodi</i> , <i>N. apis</i> , <i>N. ceranae</i> , <i>A. Apis</i> , <i>P. larvae</i> , <i>M. Plutonius</i> , VRN, VK, VIPA, VCS, VAD, VPA, VPC.
Lista de agentes nosógenos abióticos testados en polen almacenado (pesticidas) (n = 40)
α -Endosulfán, δ -HCH, 4.4'-DDE, 4.4'-DDT, 4.4'-TDE, Acrinatrina, Alaclor, Amitraz, Atrazina, Benzo (g.h.i) perileno, Bromopropilato, Clorpirifós, Cumafós, Dibenzo (a.h) anthrac, Endosulfán sulfato, Fenitrotion, Fipronil, Flampropm-isopropyl, Flumetrina 1, Flumetrina 2, Fluvalinato 1, Fluvalinato 2, Hexaclorobenzeno, Imazametabenz-met, Imidacloprida, Indene (1.2.3-c.d) pyr. Lindano, Malation, Metalaxyl, Paration, Pendimetalina, Procimidona, Simazina, β -HCH Tetradifón, Tifluralina, z-clorfenvinfós y β -Endosulfán.
Lista de tipos de polen testado en el polen almacenado (n = 89)
<i>Alnus</i> , <i>Anarrhinum</i> , <i>Anthyllist</i> , <i>Apiaceae</i> , <i>Arbutus</i> , <i>Artemisia</i> , <i>Asteroideae</i> , <i>Betula</i> , <i>Boraginaceae</i> , <i>Calamintha</i> , <i>Calluna</i> , <i>Campanulaceae</i> , <i>Carduus</i> , <i>Caryophyllaceae</i> , <i>Castanea</i> , <i>Celtis</i> , <i>Centaurea</i> , <i>Cerealía</i> , <i>Cichorioideae</i> , <i>Cirsium</i> , <i>Cistaceae</i> , <i>Cistusladanifer</i> , <i>Convolvulaceae</i> , <i>Corylus</i> , <i>Crataegust</i> , <i>Cruciferae</i> , <i>Cucurbitaceae</i> , <i>Cyperaceae</i> , <i>Cytisust</i> , <i>Chenopodium</i> , <i>Dorycnium</i> , <i>Droseraceae</i> , <i>Echium</i> , <i>Ericaceae</i> , <i>Eucalyptus</i> , <i>Euphorbiaceae</i> , <i>Fraxinus</i> , <i>Fumariaceae</i> , <i>Hederahelix</i> , <i>Helianthus</i> , <i>Juglans</i> , <i>Juniperus</i> , <i>Labiatae</i> , <i>Lamiun</i> , <i>Lavandulala tifolia</i> , <i>Lavandula stoechas</i> , <i>Leguminosae</i> , <i>Liliaceae</i> , <i>Lotust</i> , <i>Lythrum</i> , <i>Marrubiun</i> , <i>Medicagot</i> , <i>Mentha</i> , <i>Olea</i> , <i>Onobrychist</i> , <i>Ononisrepenst</i> , <i>Ornithopus oxalis</i> , <i>Papaver</i> , <i>Plantago</i> , <i>Poaceae</i> , <i>Polygonum persicaria</i> , <i>Populus</i> , <i>Prunust</i> , <i>Quercus caducifolio</i> , <i>Quercus ilex</i> , <i>Ranunculaceae</i> , <i>Retama</i> , <i>Rhamnaceae</i> , <i>Rosaceae</i> , <i>Rosmarinus</i> , <i>Rubus</i> , <i>Rumex</i> , <i>Rutaceae</i> , <i>Salix</i> , <i>Salvia</i> , <i>Sanguisorba</i> , <i>Saxifragaceae</i> , <i>Scrophulariaceae</i> , <i>Solanaceae</i> , <i>Spergularia</i> , <i>Teucrium</i> , <i>Thymus</i> , <i>Tilia</i> , <i>Trifoliumt</i> , <i>Ulmus</i> , <i>Viciat</i> , <i>Viscum</i> y <i>Zea mays</i> .

Por un lado, se solicitaron los datos del apicultor, de carácter voluntario. Y por otro, los datos del asentamiento: ubicación del colmenar, número de colmenas que lo integran, tipo de colmenas utilizadas, tipo de producción, tipo de flora que rodea al colmenar, etc. Y ya para finalizar, los datos sanitarios del colmenar: enfermedades padecidas a lo largo del último año, la realización de tratamientos y posología de los mismos, así como si habían sufrido despoblamiento de las colmenas o una mortalidad elevada de las colonias.

7 Detección de patógenos

7.1 Patógenos de las abejas adultas

7.1.1 *Varroa destructor*

La presencia/ausencia de *Varroa* está basado en el método recomendado por la OIE (2004) con ciertas modificaciones. En concreto, las muestras llegadas al laboratorio se examinaban individualmente alrededor de 100-150 abejas adultas por muestra, tanto de interior como de exterior. Dado que las hembras adultas de *Varroa* muertas se desprendían con facilidad de las abejas congeladas y se visualizaban fácilmente sobre el fondo blanco, se realizaba el recuento y se almacenaban tal como se explica en el apartado 4.4.

7.1.1.1 Determinación haplotipo

Para determinar el halotipo de los ácaros detectados, se seleccionaron aleatoriamente un total de 570 hembras de *Varroa*. La determinación se realizó el método de PCR-RFLP descrito por Anderson y Fuchs (1998).

7.1.1.1.1 Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de los ácidos nucleicos de los ácaros se realizó en 570 muestras de *Varroa* siguiendo un método con Chelex (Walsh y col., 1991) modificado.

Brevemente, con unas pinzas esterilizadas se cogieron los ácaros de los viales donde estaban guardados y se depositaron cada uno en un pocillo de una placa estéril de 96 (Eppendorf, Cat. Nº 0030 128 648). En cada uno de los pocillos a su vez, se añadieron 100 µL de Chelex 5% y 5 µL de proteinasa K 20 mg/ mL y se incubaron 1 h a 55°C, 15 min a 99°C, 1 min a 37°C y 15 min a 99°C (BIORAD PTC 100).

7.1.1.1.2 PCR-RFLP

Los extractos de ADN se analizaron siguiendo el método molecular descrito por Anderson y Fuchs (1998). Brevemente, consiste en amplificar un fragmento del gen COI y someterlo a una digestión con las enzimas de restricción *XhoI* y *SacI*. Los productos resultantes se visualizaron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio al 1,5% bajo luz UV.

El test realizado con la enzima *XhoI* sobre el fragmento COI permanecería sin digerir en el caso de que el ácaro correspondiese al haplotipo coreano, mientras que si pertenecía al haplotipo japonés/thailandés, se generarían dos fragmentos. Para confirmar los resultados de este primer test, se realizaba una segunda digestión con la enzima *SacI* bajo las mismas condiciones descritas en la digestión con *XhoI*. Si se generaba un producto de PCR digerido

se correspondería con el haplotipo japonés/thailandés y por el contrario, si el fragmento permanece sin digerir correspondería al haplotipo coreano.

7.1.2 *Acarapis woodi*

Las técnicas recomendadas por la OIE (2004) se basan en la disección individual de la abeja y la observación de las tráqueas bajo lupa o microscopio óptico. El gran consumo de tiempo de este tipo de técnicas, sobre todo para el procesamiento de un número tan elevado de muestras, junto con el carácter subjetivo del resultado ya que depende de la habilidad y experiencia del operario, hizo que se descartasen este tipo de métodos en este estudio y nos obligase a la búsqueda de técnicas más rápidas, específicas y objetivas.

7.1.2.1 Nuevas aportaciones técnicas

En busca de una nueva metodología que solventase los problemas de las técnicas tradicionales, nos planteamos el desarrollo de una técnica de PCR para la detección de *A. woodi*, para la cual se utilizaron como testigos positivos, abejas procedentes de colonias fuertemente infestadas por dicho ácaro (Dr. John McMullan -Departamento de Zoología, Escuela de Ciencias Naturales, Trinity College, Dublín- y Dr. José Villa -USDA-ARS Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción de la abeja melífera, Los Ángeles). Estos testigos positivos se procesaron mediante el método de disección recomendado por la OIE (2004) para *A. woodi* en abeja individual: extracción del tronco protorácico para la exposición del segundo par de tráqueas torácicas y observación bajo lupa de los ácaros en las tráqueas de la abeja. Una vez confirmada la infestación, se tomaron los tórax de 30 abejas y se introdujeron cada una en un vial estéril de 1,5 mL (*Eppendorf*, Cat. Nº 0030 120 086) junto con un mL de H₂O Milli-Q, para posteriormente triturarlas con micropistilos estériles (*Eppendorf*, Cat. Nº 0030 120 973). El macerado resultante se volvió a observar al microscopio para comprobar la presencia del parásito o de sus huevos.

7.1.2.1.1 Extracción de ácidos nucleicos

Con el objetivo de triturar completamente los ácaros y facilitar la extracción de los ácidos nucleicos, se tomaron 600 µL de cada macerado en un vial estéril con perlas de cerámica (*MagNA Lyser Green Beads, Roche Diagnostic*, Cat. Nº 03 358 941 001) y se introdujeron en un equipo *MagNA Lyser (Roche)* a 9,500 rpm durante 95 s.

La extracción del ADN propiamente dicha, se llevó a cabo con el kit comercial *MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation (Roche Diagnostic)* Cat. Nº 03 730 964 001) utilizando el robot de extracción automática *MagNA Pure Compact (Roche Diagnostic)* Cat. Nº 03 731 146 001) basado en la tecnología *MagnAtract*[®] (unión del ácido nucleico a esferas magnéticas). El sistema se utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante, siendo el volumen de partida de la muestra 400 µL. El ADN se eluyó finalmente en 100 µL. En cada ciclo de extracción de ADN se incluyó un testigo negativo (H₂O Milli-Q) para controlar la eficacia del sistema.

7.1.2.1.2 Diseño de cebadores

El diseño de cebadores que se emplearían en la técnica PCR se realizó siguiendo los pasos que se describen a continuación.

En primer lugar, se buscaron y recopilaron secuencias nucleotídicas disponibles de *A. woodi* en el *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). En la fecha de consulta (Febrero, 2008), sólo se encontró una secuencia (EU190886) que correspondía al gen COI.

Diseño de cebadores. Utilizando el programa Primer3 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) se seleccionaron los cebadores, teniendo en cuenta tanto las temperaturas de fusión (T_m) (programa IDT OligoAnalyzer program (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>) y el contenido en guanina (G) y citosina (C).

Test de idoneidad de los cebadores. La idoneidad de los cebadores (contenido en G/C y T_m) se controló con los programas IDT Oligo-Analyzer (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) y Oligonucleotide Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). Con la finalidad de aumentar e igualar las T_m de ambos cebadores y mejorar su especificidad, se añadieron colas G o de GC en el extremo 5'. El producto amplificado esperado se correspondía con un fragmento de ADN de 162 pares de bases (pb).

Se realizaron tests de complementariedad (auto-dímeros, homo- dímeros y hetero-dímeros) utilizando el programa AutoDimer (<http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase//AutoDimerHomepage/AutoDimerProgramHomepage.htm>) y de especificidad mediante BLAST para comprobar que los cebadores no anillaban entre ellos ni con otros organismos.

Reproducibilidad y especificidad de los cebadores. Se realizó un gradiente de temperatura (58-74 +/- 5°C) para determinar las temperaturas de anillamiento del par de cebadores seleccionados. Asimismo, se realizaron pruebas con varias concentraciones de cebadores (0,2-0,6 +/- 0,05 µM).

La reproducibilidad se comprobó por repetición de todo el proceso (desde la extracción hasta la electroforesis en agarosa) en 3 muestras 3 veces.

7.1.2.1.3 Condiciones PCR

Todos los análisis de PCR se realizaron con un termociclador *Mastercycler ep gradient S (Eppendorf)* y las condiciones de PCR para un volumen final de 50 µL fueron: 25 µL de Fast Star PCR Master, (*Roche Diagnostic*, Cat. Nº 04 710 452 001), 0,3 µM de cada cebador (AcarFOR/AcarREV), 0,4 mM de cada deoxinucleosido trifosfato (DNTP), 3mM Cl_2Mg , 0,2mg/mL seroalbúmina bovina (SAB), 0.1% Triton X-100 y 5 µL de muestra. El programa del termociclador consistió en 95°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a

59°C, y 45 s a 72°C, y una extensión final a 72°C durante 7 min. Se utilizaron testigos positivos y negativos (H₂O) para cada reacción.

Los fragmentos amplificados se analizaron en un gel de agarosa al 2% (*Egel^R EtBr*, *Invitrogen*) y una *EbaseTM* (*Invitrogen*), y visualizaron bajo luz UV.

7.1.2.1.4 Secuenciación

El ADN amplificado de cada una de las muestras, se purificó con el *kit* comercial *Qiaquick PCR Purification* (Cat. N^o 28104, *Qiagen*). Posteriormente se secuenció bidireccionalmente en el servicio de secuenciación de la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid mediante un secuenciador *ABI 3730 DNA Analyzer* (*Applied Biosystem*) usando los mismos cebadores que en la PCR (*AcarFOR* y *AcarREV*).

El análisis de las secuencias se llevó a cabo mediante el programa informático *Chromas 1.43* y los resultados de secuenciación se compararon con las secuencias depositadas en *GenBank* usando el programa *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

7.1.2.1.5 Análisis filogenético

Para el análisis filogenético, se utilizaron todas las secuencias de COI disponibles en la base de datos *GenBank* (Febrero, 2011). Las secuencias se sometieron a alineamiento múltiple usando el programa *Bioedit* (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Sin embargo, para analizar el máximo número de sitios, se excluyeron dos secuencias de *A. woodi* (EU190886.1, FJ603295.1) del alineamiento final debido a su corta longitud.

Para estimar la divergencia sinónima nucleotídica entre secuencias (K_s) y la generación de un árbol *Neighbor-Joining* se utilizó el programa *MEGA v4.0* (Tamura y col., 2007) que aplica el método *Nei-Gojobori* con corrección *Jukes-Cantor* (Nei and Gojobori, 1986). La evaluación de la consistencia del árbol filogenético resultante, se realizó el test *bootstrap* (2000 réplicas).

7.1.3 Género *Nosema*

En este estudio se desarrolló una nueva técnica molecular cuyo objetivo era incluir un control interno en la PCR ya desarrollada en nuestro laboratorio (Martín-Hernández y col., 2007) y que en la actualidad es el método molecular para el diagnóstico de las nosemosis recomendado por la OIE (2008). Con él, se pretendía mejorar la técnica par poder identificar aquellos resultados negativos de las reacciones que pudiesen ser debidos a algún tipo de fallo químico o instrumental (falsos negativos) ya que ADN de *A. mellifera* siempre es co-extraído de las muestras (infectadas o no).

7.1.3.1 Nuevas aportaciones técnicas

Para el desarrollo de la nueva PCR múltiple, se utilizaron como testigos positivos abejas infectadas por *N. apis* y *N. ceranae* procedentes de los colmenares propios que previamente habían sido identificados como positivos a *N. apis* y *N. ceranae* mediante PCR (Higes y col., 2006) y secuenciación.

Para la puesta punto del control interno de la PCR se tomaron los abdómenes de 15 abejas infectadas por *N. apis* y otras 15 por *N. ceranae*. Se introdujo cada abdomen en un vial estéril de 1,5 mL junto con un mL de H₂O Milli-Q y a continuación se trituraron con micropistilos estériles para observar el macerado resultante bajo microscopio óptico.

7.1.3.1.1 Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de los ácidos nucleicos se realizó tal como se describirá posteriormente en el apartado 8.2, con la excepción de que en lugar de tórax, se trituró el abdomen de la abeja adulta.

7.1.3.1.2 Diseño de cebadores

Para el diseño de cebadores se siguieron los mismos pasos descritos en el apartado 7.1.2.1.2, con las siguientes salvedades:

Se encontraron un total de 38 secuencias de *Apis mellifera ligustica*. Con el fin de identificar posibles polimorfismos entre individuos diferentes, la búsqueda se centró en aquellos genes más representados en la base de datos. Ocho de las 38 secuencias correspondían al gen COI y otras ocho a la subunidad II del gen de la deshidrogenasa NADH (ND2).

Se seleccionaron ocho secuencias de la COI con una longitud de 1426 pb (AY114452, AY114453, AY114454, AY114455, AY114456, AY114457, AY114458, AY114460) y las ocho secuencias ND2 de 589 pb de longitud (AY114484, AY114485, AY114486, AY114487, AY114488, AY114489, AY114490, AY114491). Se alinearon las secuencias de cada gen con la finalidad de identificar los polimorfismos intra-específicos y así evitar el diseño de los cebadores en ellos. Esto permite que la amplificación sea eficaz en el mayor número de individuos posible. Se obtuvieron dos secuencias consenso obtenidas para cada gen (con sitios variables, nombrándolas con el código IUB).

Para determinar la estructura secundaria y evitar amplicones con baja eficiencia se utilizó el programa Mfold (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold-simple.html>).

Diseño de cebadores. La secuencia consenso del gen COI y del gen ND2 se introdujeron en la página principal Primer3 (v. 0.4.0) (<http://frodo.wi.mit.edu/>) ajustando los siguientes parámetros: (i) el tamaño del producto amplificado requerido para que pudiera usarse en una PCR múltiple con los cebadores 321-APIS y 218-MITOC (Martín-Hernández y col., 2007)

debía oscilar entre los 100 y 200 pb; (ii) una Temperatura de melting (T_m) óptima del cebador de 60°C y (iii) un contenido de guanina (G) y citosina (C) óptimo del cebador del 60%. Los cebadores obtenidos en la secuencia consenso del gen COI se ajustaban mejor a los parámetros seleccionados que los obtenidos con la secuencia consenso del gen ND2, razón por la cual se seleccionó la secuencia COI para incorporarse al ensayo de la técnica PCR.

Test de idoneidad de los cebadores. Se testó la idoneidad de los cebadores y mediante la adición de colas de G o GC al extremo 5' de ambos cebadores se ajustaron las T_m de los mismos. Los tests de complementariedad se realizaron para comprobar que los cebadores no anillaban entre sí ni con los cebadores de la PCR de Martín-Hernández y col. (2007) (321-APIS para *N. apis* y 218-MITOC para *N. ceranae*).

Debido a que la sensibilidad de los cebadores de *Nosema* spp. (321-APIS para *N. apis* y 218-MITOC para *N. ceranae*) y las condiciones de PCR se habían testado previamente, en este trabajo se testó únicamente la concentración de los cebadores COI entre 0,4-0,01 µM en PCR triplex.

Especificidad de los cebadores. La especificidad de los cebadores COI se testó frente a diferentes especies del género *Apis* (*A. cerana*, *A. florea* y *A. koschevnikovi*) y *Bombus* (*B. atratus*, *B. morio* y *B. bellicosus*), y dentro de *A. mellifera*, frente a diferentes subespecies (*A. m. ligustica*, *A. m. mellifera*, *A. m. carnica* y *A. m. ibérica*).

7.1.3.1.3 Condiciones de PCR

Para la realización de los análisis de PCR y visualización de los fragmentos amplificados se emplearon los equipos mencionados en el apartado 7.1.2.1.3.

El volumen final para la PCR fue de 50 µL distribuidos de la siguiente manera: 25 µL de High Fidelity PCR Master (*Roche Diagnostic* Cat. Nº 12 140 314 001), 0,4 µM de los cebadores 218MITOC-FOR/218MITOC-REV y 321APIS-FOR/321APIS-REV, 0,03 µM de los cebadores COI-F/COI-R, 0,4 mM de cada DNTP, 3mM Cl₂Mg, 0,2mg/mL de SAB, 0,1% Triton X-100 y 5 µL de muestra. El programa del termociclador consistió en 94°C durante 2 min, seguido de 10 ciclos de 15 s a 94°C, 30 s a 59°C, y 45 s a 72°C, 20 ciclos de 15 s a 94°C, 30 s a 59°C, y 50 s a 72°C más 5 s de elongación por cada ciclo sucesivo, y una extensión final a 72°C durante 7 min. Se utilizaron testigos positivos y negativos (H₂O) para cada reacción.

7.1.3.1.4 Secuenciación

La confirmación final de la especificidad de la amplificación obtenida por la PCR se realizó a través de la secuenciación de los fragmentos amplificados por los cebadores COI-F/COI-R, realizando el análisis de las secuencias tal como se describe en el apartado 7.1.2.1.4.

7.1.4 *Braula coeca*

La presencia/ausencia de *B. coeca* se determinó sobre las muestras de abejas adultas haciendo un diagnóstico diferencial con *V. destructor* tal como recomienda la OIE (2004).

Se realizó la observación al igual que para los adultos de *Varroa* en las mismas 100-150 abejas adultas. Al igual que ocurría en el caso de *Varroa*, los dípteros muertos se desprendieron con facilidad de las abejas congeladas y se pudieron identificar fácilmente sobre un papel blanco.

7.1.5 Virus

Por motivos estructurales y económicos, los análisis para la detección de virus sólo se realizaron en el estudio regional y se llevaron a cabo en la Agencia para la Investigación Alimentaria y del Medio Ambiente de York, Inglaterra (*Food and Environment Research Agency*, Sand Hutton, York, YO41 1LZ, Reino Unido).

Se analizaron las muestras de abejas adultas para detectar la presencia del VRN, VK, VIPA, VCS, VAD, VPA y VPC.

7.1.5.1 Extracción de los ácidos nucleicos, degradación del ADN y retrotranscripción

En el procesamiento de las muestras en el laboratorio para la extracción de ARN se empleó una solución al 50% del tampón AL (*Qiagen*, Cat. Nº 1014604) junto con VX Carrier RNA (*Qiagen*, Cat. Nº 950280).

Todas las reacciones se realizaron en placas de 96 pocillos. Un total de 400 µl del sobrenadante se incubó con proteasa (*Qiagen*) a 70°C durante 15 min. Posteriormente se realizó la extracción de ácidos nucleicos mediante el kit *Biosprint 96 DNA Blood* (*Qiagen*) y en el robot *BioSprint* (*Qiagen*), utilizando el programa de Tejidos.

Los ácidos nucleicos obtenidos se sometieron a una digestión con DNasa (*DNase I*, *Qiagen*) para eliminar el ADN genómico. El ARN total así obtenido se utilizó inmediatamente para generar el ADN-copia (ADNc) utilizando el *Quantitec Reverse Transcription Kit* (*Qiagen*, Cat. Nº 05081955001), según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubaron 5 µL de ARN con *gDNA wipeout* durante 2 min a 42°C. A continuación, se añadieron la enzima retrotranscriptasa inversa y los cebadores (oligo-dTs y random primers) a la mezcla para incubarla durante 30 min. a 42°C y 3 min. a 95°C. El ADNc generado se congeló a -20°C hasta su posterior análisis por PCR.

En cada uno de los pasos (extracción de ácidos nucleicos y reacción de transcripción inversa), se procesaron en paralelo tanto controles negativos como positivos.

7.1.5.2 PCR a tiempo real

Se emplearon técnicas de PCR a tiempo real con la utilización de los cebadores y sondas que aparecen en la Tabla 8. Como control interno de la técnica, se utilizó el gen 18S del ARNr de *Apis mellifera*. De este modo, se evitaron resultados falsos negativos al confirmar la presencia del ácido nucleico de abeja en muestras que negativas a los virus.

Tabla 8. Cebadores y sondas empleadas en los análisis de virus por PCR a tiempo real

Objetivo	Nombre	Secuencia (5' a 3')
VRN ¹	BQCV 9195F (directo)	GGTGCGGGAGATGATATGGA
	BQCV 265R (reverso)	GCCGTCTGAGATGCATGAATAC
	BQCV 8217T (sonda)	TTCCATCTTTATCGGTACGCCGCC
VK ¹	KBV 83F (directo)	ACCAGGAAGTATCCCATGGTAAG
	KBV 161R (reverso)	TGGAGCTATGGTTCCGTTTCAG
	KBV 109T (sonda)	CCGCAGATAACTTAGGACCAGATCAATCACA
VPIA ²	IAPV B4S0427_R130M (directo)	RCRTCAGTCGTCTCCAGGT
	IAPV B4S0427_L17M (reverso)	CGAACTTGGTGACTTGARGG
	IAPV Probe (sonda)	TTGCGGCAATCCAGCCGTGAAAC
VCS ¹	SBV 311F (directo)	AAGTTGGAGGCGGyAATTG
	SBV 380R (reverso)	CAAATGTCTTCTTACdAGAGGyAAGGATTG
	SBV 331T (sonda)	CGGAGTGAAAGAT
VAD ¹	DWV 9587F (directo)	CCTGGACAAGGTCTCGGTAGAA
	DWV 9711R (reverso)	ATTCAGGACCCACCCAAAT
	DWV 9627T (sonda)	CATGCTCGAGGATTGGGTGCTCGT
VPA ²	APV 95F (directo)	TCCTATATCGACGACGAAAGACAA
	APV 159R (reverso)	GCGCTTAATTCCATCCAATTGA
	APV 121T (sonda)	TTTCCCCGGACTTGAC
VPC ²	CPV 304F (directo)	TCTGGCTCTGTCTTCGCAA
	CPV 371R (reverso)	GATACCGTCGTACCCTCATG
	CPV 325T (sonda)	TGCCACCAATAGTTGGCAGTCTGC
18S ²	Bee 18S F (directo)	TGTTTTCCCTGGCCGAAAG
	Bee 18S R (reverso)	CCCCAATCCCTAGCACGAA
	Bee 18S Probe (sonda)	CCCGGTAACCCGCTGAACCTC

¹ Chantawannakul y col., 2006

² Perkins K, Budge G y Boonham N, datos sin publicar.

7.2 Patógenos de la cría

La determinación de los patógenos de la cría comenzó con un examen macroscópico de cada muestra recibida para evaluar el estado de los opérculos de la cría y la morfología de la misma, en busca de los signos clínicos patognomónicos que provocan.

A continuación, se realizaron diferentes análisis en función del agente que se quería determinar.

7.2.1 *Varroa destructor*

Al igual que en el caso de las abejas adultas, la presencia/ausencia del parásito *Varroa* sobre la muestra de cría se determinó siguiendo el método recomendado por la OIE

(2004). Para ello, se examinó la cría disponible (mayoritariamente de obreras). Se eliminaron los opérculos de cera de las celdillas con unos escalpelos y posteriormente se extrajeron las larvas con unas pinzas dejando a la luz las varroas adultas.

Los ácaros identificados se almacenaron tal como se explica en el apartado 4.4.

7.2.1.1 Determinación haplotipo

La determinación del haplotipo de las varroas procedentes de la cría de abeja se realizó tal como se explica en el apartado 7.1.1.1.

7.2.2 *Ascosphaera apis*

Las muestras de cría que macroscópicamente resultaron sospechosas, debido a la presencia de momias (blancas y/o negras), se sometieron a un análisis microbiológico que sirvió como confirmación de la presencia del hongo, sin embargo sobre aquellas muestras de apariencia normal, sólo se realizó un análisis molecular.

7.2.2.1 Análisis microbiológico (confirmación casos clínicos)

Las momias se sembraron directamente en una placa con el medio de cultivo MY20 y se mantuvieron en aerobiosis a 30°C durante 7 días (Raper y Fennell, 1965).

7.2.2.2 Nuevas aportaciones técnicas

Para el desarrollo de un método molecular para la determinación de *A. apis* se utilizaron dos tipos de testigos positivos para obtener ADN específico que se utilizaría posteriormente en las técnicas de PCR. Por un lado, las muestras de la cría de abeja infectada procedente de los colmenares, analizada y confirmada microbiológicamente en el laboratorio de Patología Apícola del CA. Y por otro, la cepa patrón 38506TM procedente del banco de cepas ATCC (*American Type Culture Collection*).

La cepa patrón liofilizada de *A. apis* se reconstituyó siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se sembró en caldo de patata dextrosa, en aerobiosis a 18°C durante 48-72 h para posteriormente re-sembrarla en medio MY-20 con las condiciones descritas en el apartado anterior.

7.2.2.2.1 Extracción de ácidos nucleicos

Una vez que se consiguió el crecimiento fúngico, se tomo una muestra del micelo de la cepa patrón a partir de colonias aisladas del medio de cultivo y se introdujo en un vial estéril de 1,5 mL (*Eppendorf*) junto con un mL de H₂O Milli-Q.

La extracción de los ácidos nucleicos se realizó igual que en el apartado 7.1.2.1.1.

7.2.2.2.2 Diseño de cebadores

El diseño de cebadores se realizó siguiendo los mismos pasos descritos en el apartado 7.1.2.1.2 para el diseño de cebadores de *Acarapis*, con las siguientes excepciones:

Se hallaron un total de 789 secuencias de *A. apis* disponibles en *GenBank* (Diciembre, 2007), muchas de las cuales correspondían a fragmentos de ADN del proyecto de secuenciación del hongo (*database WGS sequences*; tax 392613 proyecto de secuenciación) que todavía no habían sido ensamblados. Además, se realizó una búsqueda de secuencias de especies próximas a *A. apis* con el fin de poder diseñar cebadores que sólo anillaran con el ADN del organismo de interés.

Se seleccionó el gen 5.8S del ARNr con dos secuencias disponibles (U68313 y U18362) ya que se comprobó que este fragmento era la diana más representada en la base de datos del género *Ascosphaera*. Sin embargo, tras el alineamiento de las secuencias se comprobó que existía una discrepancia considerable en los inicios de ambas, por lo que no fue posible obtener una secuencia consenso. Para comprobar cual de las dos secuencias era la correcta, se alinearon cada una de ellas con los datos del borrador de la secuenciación completa del genoma de *A. apis* [Qin y col. (2006); <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/microbial>]. La mayor similitud se obtuvo con la secuencia U68313.

Con la ayuda del programa ClustalW, se realizó un nuevo alineamiento de esta secuencia (U68313) con las 19 restantes de otras especies de *Ascosphaera* (Tabla 9) y se comprobó que *A. apis* tenía una zona diferente al resto, como ya habían descrito James y Skinner (2005).

Tabla 9. Secuencias genéticas de *Ascosphaera* spp. utilizadas en el diseño de cebadores

<i>Ascosphaera</i> spp.	Secuencia	<i>Ascosphaera</i> spp.	Secuencia
<i>A. duoformis</i>	U68316	<i>A. major</i>	U68315
<i>A. atra</i>	U68314	<i>A. larvas</i>	U68330
<i>A. xerophila</i>	U68326	<i>A. flava</i>	U68332
<i>A. variegata</i>	U68319	<i>A. fusiformis</i>	U68324
<i>A. subcuticulata</i>	U68331	<i>A. celerrima</i>	U68325
<i>A. solina</i>	U68328	<i>A. colubrina</i>	U68320
<i>A. pollenicola</i>	U68329	<i>A. aggregata</i>	U68323
<i>A. proliperda</i>	U68318	<i>A. asterophora</i>	U68322
<i>A. osmophila</i>	U68317	<i>A. acerosa</i>	U68321
<i>A. naganensis</i>	U68327		

Diseño de cebadores y test de idoneidad. La secuencia consenso se introdujo en el programa Primer3 para el diseño de los cebadores.

Sobre los cebadores generados, AscorFor y AscorRev, se realizaron tests de complementariedad para comprobar que no anillaban entre ellos ni con otro fragmento que no interesase.

Reproducibilidad y especificidad. La reproducibilidad se comprobó por repetición de todo el proceso (desde la extracción hasta la electroforesis en gel de agarosa) en 5 muestras 3 veces. Asimismo, se realizaron test de especificidad enfrentándolos a especies bacterianas que comúnmente se encuentran en las muestras de la colmena: *B. laterosporus* (ATCC 64), *P. alvei* (ATCC 6344) y *P. I. pulvifaciens* (ATCC 49843).

7.2.3 *Melissococcus plutonius*

Si bien existe un medio selectivo para cultivar *M. pluton* (OIE, 2004), el crecimiento de esta bacteria es complicado y todavía más el aislamiento debido a la competición con otras bacterias. Además, aún siendo aislada, es difícil identificarla por su naturaleza pleomórfica.

7.2.3.1 Nuevas aportaciones técnicas

Para la identificación de *M. plutonius* se optó también por el desarrollo de un método molecular. Para ello, se emplearon como testigos positivos la cepa patrón ATCC 35311 y varias muestras de larvas infectadas procedentes de colmenares suizos. Estas muestras, además de ADN de *M. plutonius* fueron remitidas por Alexandra Roetschi de Berna, Suiza (*Département fédéral de l'économie DFE, Station de recherche Agroscope Liebefeld-Posieux ALP, Schwarzenburgstr. 161*).

La cepa patrón liofilizada de *M. plutonius* se reactivó siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se sembró en caldo *M. plutonius medium* (ATCC 1430 Broth) en anerobiosis a 30°C durante 48-72 h y se re-sembró posteriormente en el medio de cultivo específico recomendado por la OIE (2004).

7.2.3.1.1 Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de los ácidos nucleicos se realizó igual que en el apartado 7.1.2.1.1.

7.2.3.1.2 Diseño de cebadores

El diseño de cebadores se realizó siguiendo los mismos pasos descritos en el apartado 7.1.2.1.2 para el diseño de cebadores de *Acarapis*, con las siguientes salvedades:

En el momento de la búsqueda (Noviembre, 2007) había disponibles en el *GenBank* cinco secuencias del ARNr, cuatro correspondían al gen 16S (AY862507, AJ301842, X75752 y

X75751) y una al gen 23S (AJ295317). Se alinearon las secuencias del gen 16S para conseguir una secuencia consenso sobre la que hacer el diseño de los cebadores

Las cuatro secuencias seleccionadas mostraron una alta similitud después de su alineamiento usando ClustalW, mostrando solo un punto de polimorfismos que se evitó como zona de diseño de los cebadores. Ninguna otra región genética del género *Melissococcus* estaba disponible en *Genbank* y por eso no se pudieron hacer alineamientos con otras especies.

Diseño de cebadores. La elección de los cebadores debía cumplir varios requisitos ya que el objetivo final de este diseño era combinarlos en PCR múltiple con los cebadores utilizados para la identificación de los otros agentes de la cría (*A. apis* y *P. larvae*). La T_m debía por tanto ser parecida para todas las parejas de cebadores y el tamaño del fragmento amplificado de *M. plutonius* debía ser fácilmente diferenciable de los otros en un gel de agarosa.

Test de idoneidad, reproducibilidad y especificidad de los cebadores. Se realizaron tests de complementariedad y de especificidad sobre los cebadores MeliFor y MeliRev tal como se explicó en el caso del diseño de los cebadores anteriores.

7.2.4 *Paenibacillus larvae*

Al igual que en el caso de *A. apis*, aquellas muestras que macroscópicamente resultaron sospechosas, se sometieron a análisis microbiológicos y bioquímicos (API 50 CHB, *bioMérieux*), que sirvieron como confirmación de lo que americana, sin embargo sobre aquellas muestras de apariencia normal, sólo se realizó un análisis molecular.

7.2.4.1 Análisis microbiológicos (confirmación casos clínicos)

Las larvas se sembraron directamente en placas con agar sangre (*Oxoid*, Cat. Nº PB0115) y se mantuvieron en condiciones de anaerobiosis (*Oxoid* Cat. Nº AN0025) a 37°C durante 48-72 h (OIE, 2004).

7.2.4.2 Análisis molecular

Para la identificación molecular de *P. larvae* se utilizaron los cebadores propuestos por Govan y col. (1999) (Tabla 10). Se utilizaron como testigos positivos las muestras infectadas procedentes de los colmenares del CA además de la cepa patrón ATCC 9545 (reactivación en caldo infusión cerebro-corazón en anaerobiosis a 37°C durante 48-72 h y posterior re-siembra en agar sangre tal como se describe en el apartado 7.2.4.1).

Tabla 10. Cebadores seleccionados para la detección de *P. larvae* (Govan y col., 2009)

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño producto PCR	Especificidad
Primer 1 (directo)	AAGTCGAGCGGACCTTGTGTTTC	973 pb	<i>P. larvae</i>
Primer 2 (reverso)	TCTATCTCAAACCGGTCAGAGG		

7.2.4.2.1 Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de los ácidos nucleicos se realizó igual que en el apartado 7.1.2.1.1.

7.2.5 PCR múltiple de los patógenos infecciosos de la cría

7.2.5.1 Diseño de la PCR múltiple

El método de diagnóstico elegido para detección de los principales agentes infecciosos de la cría (*A. apis*, *M. plutonius* y *P. larvae*) fue una PCR multiplex. El diseño de este tipo de PCR requiere la puesta a punto de tres reacciones individuales con similares condiciones, para que una vez puestos los tres pares de cebadores en la misma reacción, éstos no pierdan ni eficacia ni sensibilidad. Para ello, se han utilizado las parejas de cebadores descritas en los apartados 7.2.2.2.2, 7.2.3.1.2 y 7.2.4.2.

Se realizó un gradiente de temperatura (58-74 +/- 5°C) para determinar empíricamente las temperaturas de anillamiento de cada pareja de cebadores seleccionados. Asimismo, se realizaron pruebas con varias concentraciones de cebadores (0,08-0,6 µM +/- 0,02 µM).

7.2.5.2 Condiciones de la PCR

Los análisis de PCR se realizaron bajo las mismas condiciones descritas en el apartado 7.1.2.1.3, a excepción de que en esta ocasión se emplearon tres parejas de cebadores empleados: AscFor/AscRev, MeliFor/MeliRev y Primer1/2 a las concentraciones de 0,09, 0,6 y 0,05 µM respectivamente.

7.2.5.3 Secuenciación

La secuenciación de cada uno de los fragmentos amplificados y el análisis de las secuencias se llevaron a cabo tal como se describe en el apartado 7.1.2.1.4.

7.2.6 Virus

El análisis de virus para cría de abejas se realizó tal como se describe en el apartado 7.1.5 para las abejas adultas con la excepción de que se utilizó el tampón AL al 40% para compensar el líquido secretado por las propias muestras.

8 Adaptaciones para un elevado tamaño muestral

Debido al elevado número de muestras analizadas en este estudio (1957 de abejas adultas y 1679 de cría), fue imprescindible adaptar el procesamiento y análisis de las mismas sin perder la eficacia ni sensibilidad en los métodos empleados. Para ello se utilizaron los equipos que se describen a continuación.

8.1 Maceración de la muestra

8.1.1 Fase 1: Utilización de bolsas con filtro

La maceración de las muestras se realizó en una primera fase en bolsas con filtro (*Stomacher 80® Biomaster strainer bags Seward*, Cat. Nº BA6040/STR) y la selección de muestras fue la siguiente:

- 100 abdómenes de abeja adulta en el caso del género *Nosema*.
- 100 tórax de abeja adulta en el caso de *A. woodi*.
- 5 g de cría en el caso de *A. apis*, *P. larvae* y *M. plutonius*.

Se introdujeron las partes de las abejas necesarias en cada caso en bolsas de plástico estériles con filtro junto con 25 mL de H₂O Milli-Q. Las bolsas se pusieron en el interior del masticador mecánico *Stomacher 80® Biomaster (Seward)* a alta velocidad durante 2 min. El filtro retuvo el material grosero, facilitando el paso del macerado a tubos estériles de 50 mL. Posteriormente, se añadieron nuevamente 25 mL de H₂O Milli-Q y se repitió el proceso mecánico. La suspensión obtenida se centrifugó a 1200 rpm durante 6 min, descartándose el sobrenadante y reconstituyendo el sedimento en cinco mL de H₂O Milli-Q.

8.1.2 Fase 2: Utilización de placas de 96 pocillos

Una vez obtenido el macerado correspondiente, se distribuyeron 500 µL de cada uno de los concentrados obtenidos en el apartado anterior, en placas de 96 microtubos (*Collection Microtube Racked, Qiagen*, Cat. Nº 19560) con perlas de vidrio de dos mm. Estas placas se sometieron a una agitación de 30 Hz durante 6 min en un triturador mecánico (*TissueLyser, Qiagen*) con el fin de romper los componentes de los diferentes agentes patógenos y facilitar la liberación del material genético.

8.2 Extracción de los ácidos nucleicos

Para la extracción del ADN y la posterior PCR en la misma placa se añadieron 30 μL de tampón ATL (*Qiagen*, Cat. Nº 19076) y 20 μL de Proteinasa K (*Qiagen*, Cat. Nº 19131) por muestra y se incubaron en las placas a 56°C durante 12 h.

Para la determinación de *Nosema*, la extracción de los ácidos nucleicos se realizó utilizando el *kit* comercial *DNeasy Blood & Tissue* (*Qiagen*, Cat. Nº 69581) que consiste en una placa con 96 columnas de purificación. En cambio, para la identificación de *A. woodi* y de los principales agentes infecciosos que afectan a la cría (*A. apis*, *M. plutonius* y *P. larvae*), se empleó el *kit* comercial *DNeasy Universal Tissue* (*Qiagen*, Cat. Nº 69581), basado en la unión del ácido nucleico a esferas magnéticas, utilizando además el robot de extracción automática *BioSprint 96* (*Qiagen*) según las instrucciones del fabricante (programa “BS96 DNA Tissue”).

Tanto en un caso como en el otro, el volumen de partida de la muestra fue de 200 μL y el ADN se eluyó finalmente en 100 μL . En cada placa (96 muestras) de extracción de ADN se incluyó agua como testigo negativo (H_2O Milli-Q) para controlar la eficacia del sistema.

8.3 Electroforesis capilar

Una vez realizada la PCR, los fragmentos obtenidos se analizaron en el equipo de electroforesis capilar *QIAxcel System* (*Qiagen*) usando el *kit* comercial *QIAxcel DNA Screening* (*Qiagen*, Cat. Nº 929004).

9 Detección de pesticidas en polen

Para la detección de pesticidas se analizó el polen de reserva (100 g por muestras) almacenado según se indica en el apartado 4.4.3, de un total de 1021 colmenas representativas de toda la geografía española. El estudio se realizó mediante un análisis multi-residuos diseñado y puesto a punto por el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Valladolid por cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas o cromatografía de líquidos con detector de espectrometría de masas; se emplearon métodos específicos para el fipronil y la imidacloprida (Bonmartin y col., 2003).

10 Determinaciones palinológicas

La determinación del tipo de flores visitadas por las abejas y el posible contacto con plantas cultivadas en las que se pudieron haber aplicado pesticidas, se realizó en el laboratorio de miel del CA. Para ello, se aislaron e identificaron granos de polen de cada muestra, se limpiaron siguiendo el método Erdtman (Erdtman, 1969), se montó la preparación sobre una gelatina de glicerina para observar bajo microscopio óptico y se

identificó la especie de un mínimo de 100 granos con la ayuda de un atlas fotográfico (Valdés, 1987; Faegri y Iversen, 1989) y de la colección de referencia propia del CA.

11 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 SIGPAC (<http://sigpac.mapa.es/fega/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 χ^2 de Pearson (χ^2).

Los datos obtenidos mediante la encuesta epidemiológica junto con los datos del laboratorio se grabaron en una base de datos a través de la aplicación de *Epi-Info*TM habilitada para tal efecto.

Se realizó un estudio en dos fases para evaluar la relación entre cada variable explicativa y el evento. En la primera fase se realizó un descriptivo de cada una de las variables con el objeto de identificar las variables con un alto porcentaje de valores perdidos o con baja heterogeneidad de las respuestas. Posteriormente se realizó un análisis univariado (*Test* χ^2 de Pearson o *ANOVA/Kruskal-Wallis test*) entre cada variable explicativa y el evento (PC). Las variables asociadas al evento con una significación de $p < 0.30$ fueron preseleccionadas para el modelo de regresión multivariante (Mickey y Greenland, 1989). Se analizaron todas las relaciones bilaterales entre las variables explicativas mediante la prueba de probabilidad exacta de Fisher o de χ^2 de Pearson.

En una segunda fase se emplearon 3 tipos de regresión apropiadas para los estudios transversales: regresión logística, regresión log-binomial y regresión de Poisson con varianza robusta (Barros y Hirakata, 2003). La mejor estimación se obtuvo con la regresión de Poisson con varianza en la que el estimador de riesgo fue la Razón de Prevalencias (RP), resolviendo así los problemas de convergencia detectados con la regresión log-binomial y la imposibilidad de calcular Odd Ratio en regresión logística, debida a la presencia de recuentos igual a "0" en algunas de las principales variables explicativas. El modelo final se obtuvo con los factores significativos $p < 0.05$ (2-colas). Algunas variables de especial interés biológico fueron forzadas al modelo de regresión.

El criterio para retener en el modelo final una variable introducida fue bien que mejorara la bondad del ajuste $>10\%$ o que modificara el estimador de riesgo RP $>25\%$ (Dohoo y col., 2003). La bondad del ajuste se midió a partir de las devianzas de los modelos. Todos los análisis se realizaron con STATA v.9.

En el estudio regional el evento prioritario a estudiar fue el colmenar afectado por la pérdida de colmenas (PC). Se consideró PC aquella colmena que experimentó muerte de

abejas superior a las normales (que podría cifrarse en 5-10% como normal) en el periodo del muestreo o en el otoño/invierno posterior a éste. Se calculó la prevalencia del evento PC con el correspondiente intervalo de confianza (IC) al 95%. Asimismo, y dado el interés no solo del evento a medir sino también de la frecuencia de aparición de determinados patógenos se calcularon las prevalencias e IC para todos ellos. Posteriormente se realizó un análisis de correlaciones bivariada entre los distintos patógenos.

Se realizó un estudio espacial donde se emplearon diversas metodologías de autocorrelación espacial del programa ArcGIS Desktop v. 9.2 para representar las colmenas muestreadas. El índice I de Moran (Global Moran's I) permite obtener una visión global de los procesos de interrelación espacial y se utilizó para medir la correlación entre las observaciones, identificar los patrones y los niveles de agrupamiento espacial entre los puntos de muestreo. El método Local Getis-Ord, se utilizó para probar la significación estadística de las agrupaciones locales, que mide la concentración de casos distribuidos espacialmente (Getis y Ord, 1992; Ord y Getis, 1995). En estudios anteriores, se había propuesto un área de alimentación de 13 km para paisajes desérticos (Eckert, 1933), sin embargo, en base a la orografía de Galicia, se aplicó una distancia máxima de 5 km para definir el área de alimentación, como ya habían descrito otros autores (Gary, 1975; Colin y col., 2004).

Análisis de los pesticidas

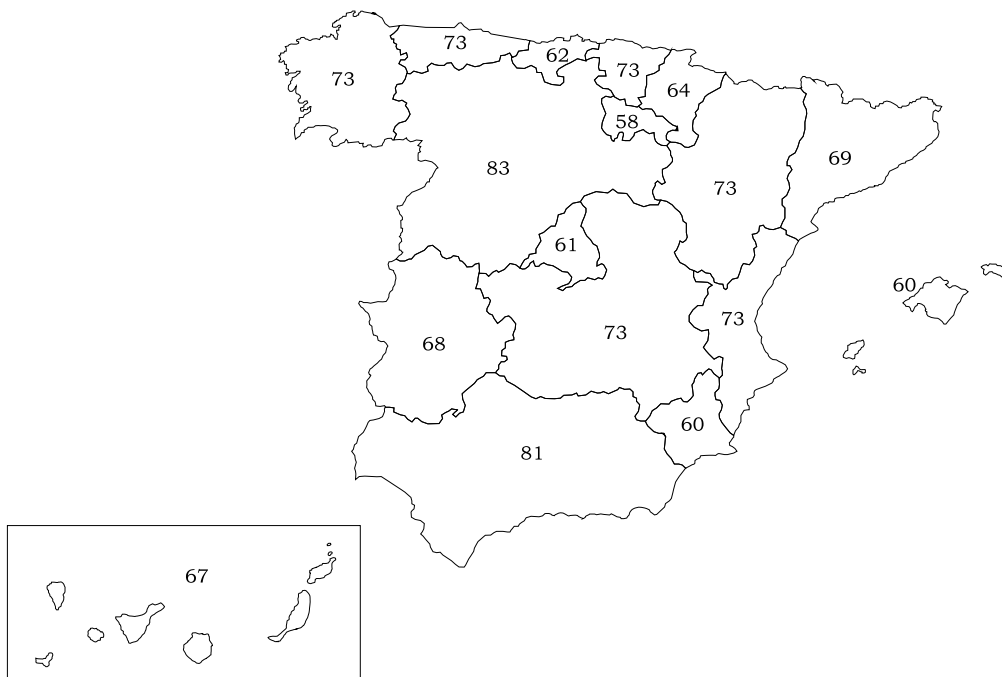
El tratamiento estadístico de los datos en los que respecta a muestras positivas a pesticidas (valores medios y sus intervalos de confianza) se llevaron a cabo usando un paquete estadístico, *Sttgrphics Centurion XV*, de *Statpoint Technologies, Inc.* (Warrenton, VA, EE. UU.).

RESULTADOS

12 Estudio nacional

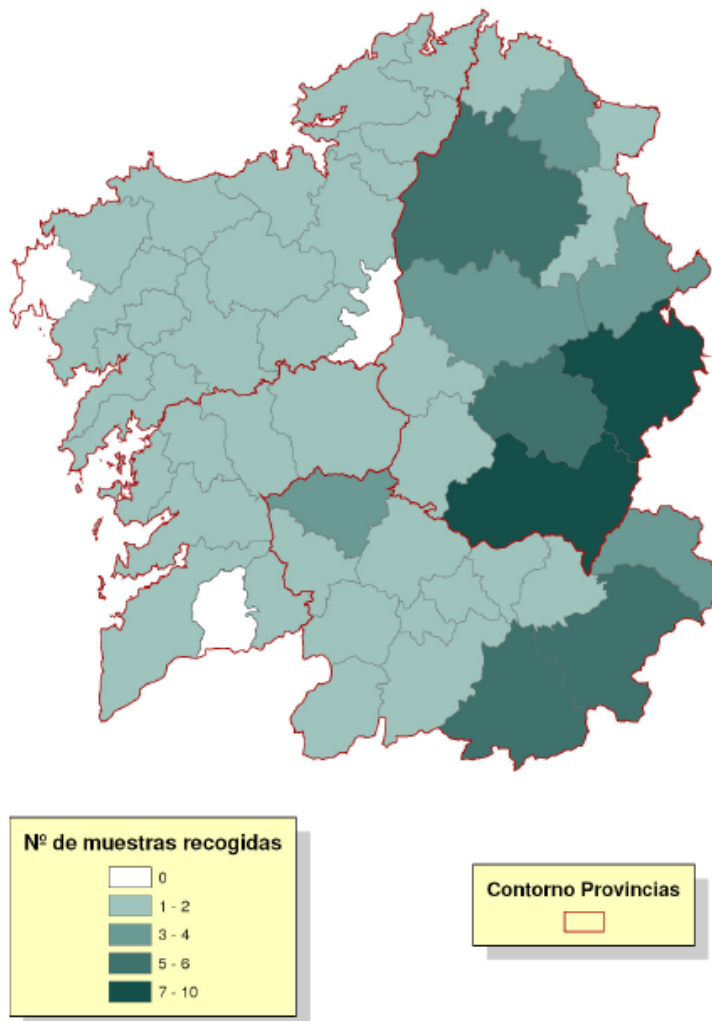
El número total de muestras solicitadas por muestreo fue de 1171 colmenas que siguieron la distribución espacial que se muestra en la Fig. 10.

Figura 10. Número de muestras esperadas por Comunidad Autónoma y por muestreo



13 Estudio regional

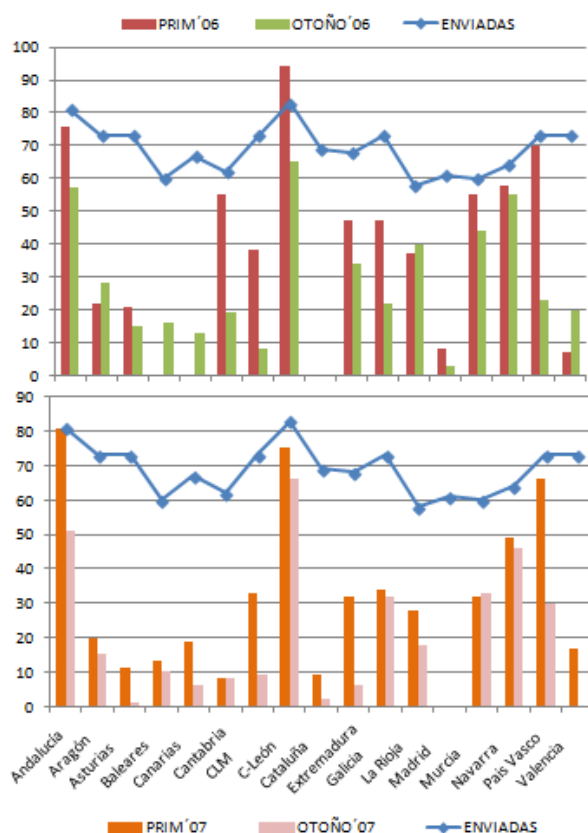
La distribución espacial de las 99 muestras en función de la comarca de origen fue la que se muestra en la Fig. 11.

Figura 11. Distribución espacial del número de muestras recogidas por comarca

14 Encuesta epidemiológica

14.1 Estudio nacional

El número total de paquetes recibidos (entendido éste como la encuesta más las muestras de abejas adultas, cría, polen, miel y cera) fue de 1957 entre los años 2006 y 2007, distribuidas como se representa en la Fig. 12. En primavera del primer año se recibieron un total de 634 y en otoño 462. El segundo año, el número disminuyó ligeramente siendo 528 las muestras recibidas en primavera y 333 en otoño.

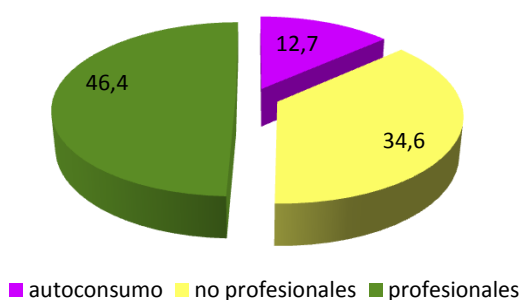
Figura 12. Número de muestras solicitadas y recibidas por Comunidad Autónoma y por muestreo

Aunque todas las comunidades autónomas participaron en al menos dos muestreos, algunas regiones sólo lo hicieron en uno de los dos años de estudio, como se puede observar en los casos de Madrid (en el año 2006) y Cataluña (en el año 2007). En otras comunidades como Canarias y Baleares, el estudio empezó más tarde, faltando así el primero de los muestreos. Asimismo, varias de las colmenas participantes en el primer muestreo (primavera 2006) no continuaron en alguno de los siguientes.

Por otro lado, dado que la toma de muestras no la realizó directamente nuestro equipo, no tenemos la seguridad de que la colmena inicialmente identificada como “centinela” fuese la misma que en el resto de muestreos ya que a pesar de que algunos apicultores lo comunicaron a través de las encuestas, otros muchos no lo hicieron. Por lo tanto, el objetivo inicial del proyecto de hacer un seguimiento de cada colonia en los cuatro muestreos no se pudo llevar a cabo y por ende, a partir de ahora los muestreos se considerarán independientes entre sí, dando así una fotografía de la situación en cada uno de los cuatro momentos. Consecuentemente, en los siguientes apartados de este trabajo, se compararán de forma global (por comunidad autónoma) las prevalencias para cada uno de los agentes nosógenos.

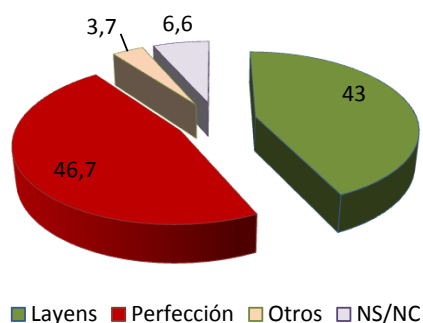
La mayor proporción de los apicultores participantes en este estudio eran profesionales (46,4%), situándose principalmente en Andalucía, Aragón, Comunidad Valenciana, Extremadura y Murcia. No obstante, el porcentaje de apicultores no profesionales (16-149 colmenas) es amplio (34,6%) destacando en las comunidades de Canarias, Cantabria, Galicia, Madrid, Navarra y País Vasco. El 19% restante poseía explotaciones de autoconsumo (<16 colmenas) y en regiones como Asturias la proporción de este tipo de apicultores alcanzó el 52% de los encuestados (Fig. 13).

Figura 13. Tipo de explotaciones (%)

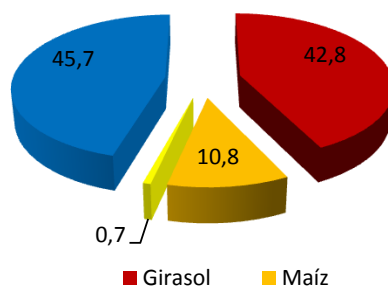


La mayor parte de las colmenas muestreadas correspondían al tipo Perfección (46,7%) o Layens (43%) (Fig. 14). A nivel de comunidad autónoma se observa que predominaban las colmenas tipo Layens en Andalucía, Aragón, Comunidad Valenciana, Extremadura y Murcia, mientras que las Perfección abundan en Asturias, Canarias, Cantabria, Galicia, Madrid, Navarra y País Vasco. En el resto de regiones se distribuían de forma homogénea entre ambos tipos.

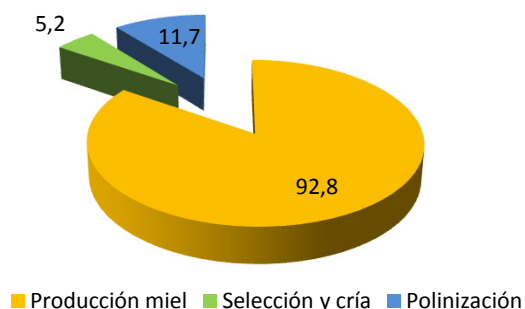
Figura 14. Tipo de colmenas (%)



Con respecto a la trashumancia, es una práctica realizada por el 44,7% de los apicultores encuestados, concentrándose en las comunidades de Aragón, Andalucía, Comunidad Valenciana, Extremadura y Murcia, en las que más del 65% manifiesta haberla realizado y siendo el girasol, el cultivo más aprovechado (45,7%) (Fig. 15).

Figura 15. Realización de trashumancia (%)

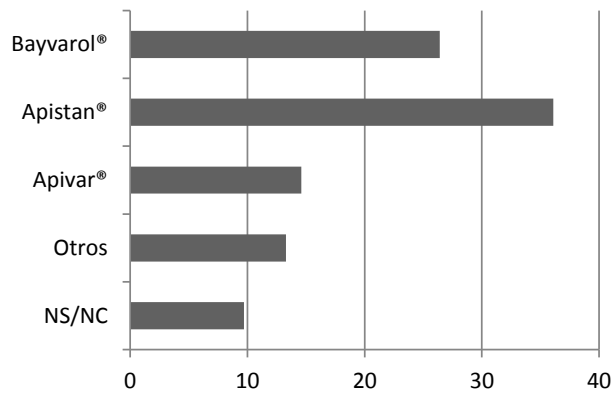
En cuanto a la clasificación zootécnica de las explotaciones la mayoría se dedicaban a la producción de miel (92,8%) y el resto de orientaciones productivas era minoritaria en todas las CC. AA. (Fig. 16) a excepción de Aragón, Cataluña y Castilla León en las que la polinización representa un porcentaje relativamente importante (28,2%, 54,5% y 28,3%, respectivamente).

Figura 16. Clasificación zootécnica de las explotaciones (%)

En cuanto a los tratamientos de *Varroa*, el 90% de los apicultores encuestados manifestó haber aplicado uno o dos tratamientos al año durante el periodo de estudio.

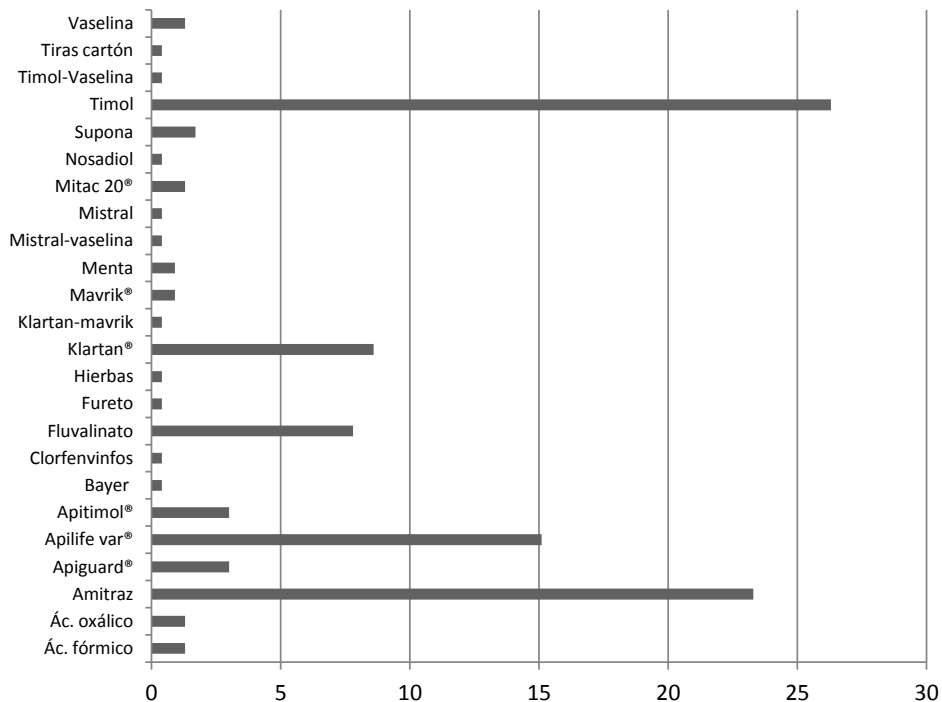
En relación al primer tratamiento, el producto veterinario más empleado fue Apistan® (Fluvalinato, 36,1%) seguido de Bayvarol® (Flumetrina, 26,4%) y de Apivar® (Amitraz, 14,6%) (Fig. 17). Estos porcentajes de utilización de productos se mantuvieron relativamente estables en los cuatro muestreos en los que se dividió el estudio.

Figura 17. Productos mayoritarios empleados en el primer tratamiento frente a *V. destructor*



Del 13% de los apicultores que emplearon productos distintos a los habituales, tanto comerciales como artesanales, se contabilizaron un total de 22 productos diferentes, algunos de ellos usados en combinación (Fig. 18). Los más habituales para el periodo de estudio total, fueron amitraz (23,3%; principio activo del Apivar®) y timol (32,3%) en sus diferentes presentaciones (Apiguard® y Apitimidol®). Por otro lado, un 2,1% de los apicultores declara haber utilizado clorfenvinfós (Supona®).

Figura 18. Productos minoritarios empleados en el primer tratamiento frente a *V. destructor*



La forma de aplicación de los productos mayoritarios (Apistan®, Bayvarol® y Apivar®) es a través de la colocación de tiras de plástico impregnadas con el principio

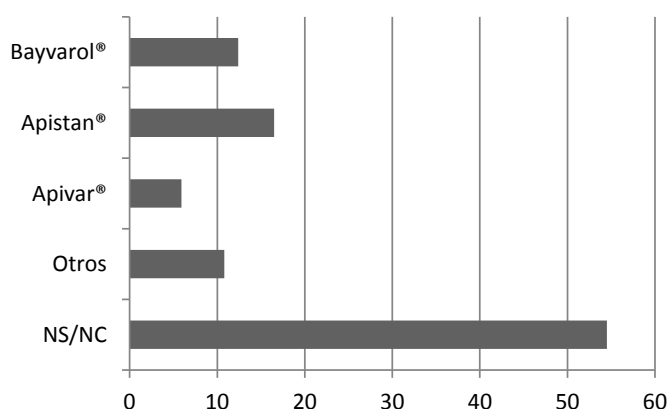
activo. Estas tiras deben colocarse en el interior de las colmenas en un número determinado y durante un período de tiempo concreto. Considerando que el uso correcto en cuanto a número de tiras de producto por colmena es de 2, para Apistan® y Apivar® y 4, en el caso del Bayvarol®; y que el número de semanas correctos es de 6 a 8 semanas para el Apistan® y Bayvarol® y de 6 a 10 semanas para el Apivar® se puede extraer que tan solo un 52.9% de los apicultores participantes en el estudio realizó correctamente el primer tratamiento frente a *Varroa*. De ellos, el 61,5% de los que utilizaron Apistan® y el 42,2% de los que emplearon Bayvarol® lo hicieron de una forma correcta (Tabla 11).

Tabla 11. Uso correcto del primer tratamiento frente a *V. destructor* teniendo en cuenta el número de tiras y número de semanas.

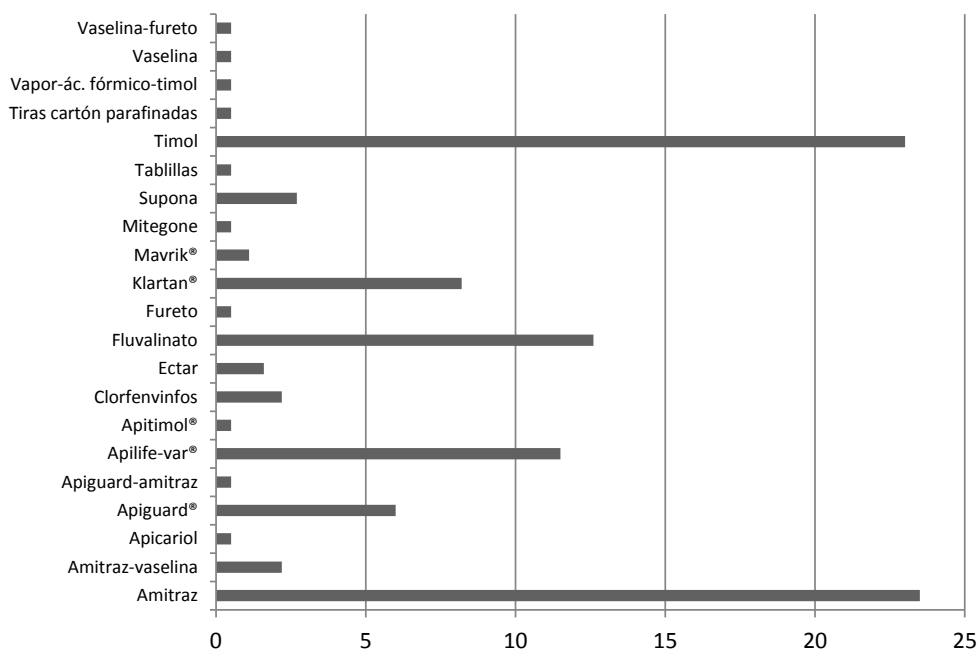
Producto	Nº tiras correcto	Nº semanas correcto	Ambas correctas	%
Apistan®	2	6 a 8	434	61,5
Apivar®	2	6 a 10	145	50,7
Bayvarol®	4	6 a 8	218	42,2
Total	-	-	797	52,9

Tan solo el 46,8% de los apicultores aplicó un segundo tratamiento y tal como ocurría con los que aplicaron el primero, la mayoría empleó Apistan® (16,5%) o Bayvarol® (12,4%) (Fig. 19).

Figura 19. Productos mayoritarios empleados en el segundo tratamiento frente a *V. destructor*



Casi el 11% de los encuestados emplearon otro tipo de producto (Fig. 20), entre los que destacan el amitraz (23,5%) y el timol en sus diversas modalidades (29,5%). Al igual que ocurrió en el primer tratamiento, un porcentaje pequeño de apicultores (4,9%) declaró haber utilizado clorfenvinfós.

Figura 20. Productos minoritarios empleados en el segundo tratamiento frente a *V. destructor*

El porcentaje de apicultores que trató correctamente a la colonia de abejas atendiendo a número de tiras por colmena y número de semanas de tratamiento fue muy parecido al del primer tratamiento, situándose en torno al 52% (Tabla 12).

Tabla 12. Uso correcto del segundo tratamiento frente a *V. destructor* teniendo en cuenta el número de tiras y número de semanas.

Producto	Nº tiras correcto	Nº semanas correcto	Ambas correctas	%
Apistan®	2	6 a 8	219	68,0
Apivar®	2	6 a 10	54	47,0
Bayvarol®	4	6 a 8	79	32,5
Total	-	-	352	51,8

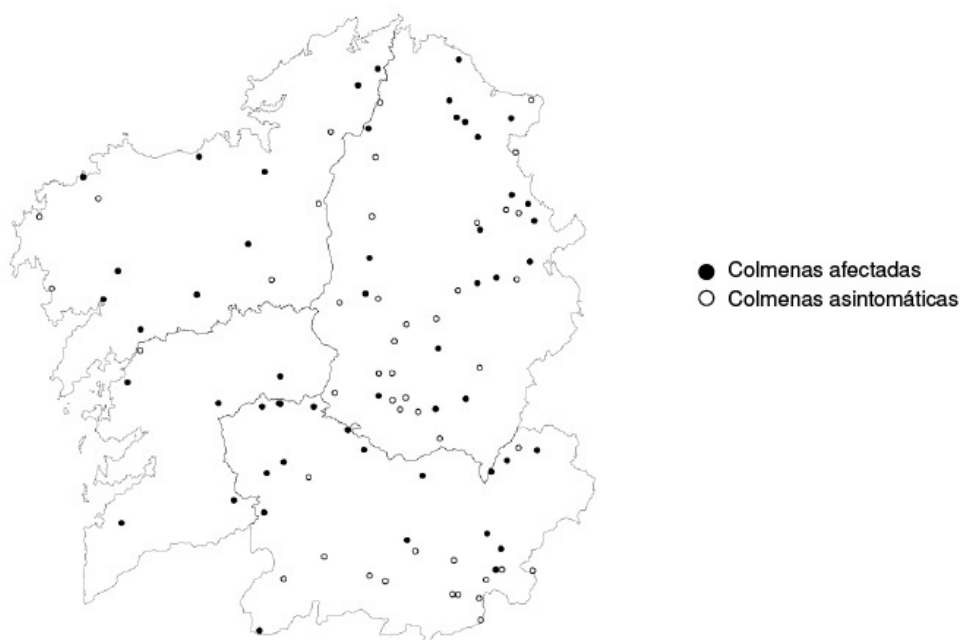
En cuanto a los tratamientos frente a las nosemosis, sólo el 15,5% apicultores manifestó haber realizado alguno, siendo el Fumidil B® (cuyo principio activo es la fumagilina) el producto veterinario principalmente empleado (98,3%). No obstante, al comprobar la pauta posológica recomendada en el prospecto, se observó que el 100% de los que lo emplearon, lo hizo de un modo insuficiente bien en la dosis empleada y/o en el número de tratamientos aplicados. El 1,3% empleó algún antibiótico no autorizado para el control de *Nosema* (paramomicina y terramicina) y el 0,3% (un apicultor) algún producto homeopático no especificado.

Finalmente, sólo el 4,3% de los apicultores encuestados manifestaron haber tratado sus colonias frente a loque americana. Y a pesar de que se declararon una amplia variedad de productos (Amoxicilina, Apiciclina, Apitimol, Fumagilina, Oxitetraciclina, Sulfamida, Sulfatiazol, Terramicina, Tetraciclina) ningún apicultor aplicó un tratamiento veterinario adecuado para esta enfermedad.

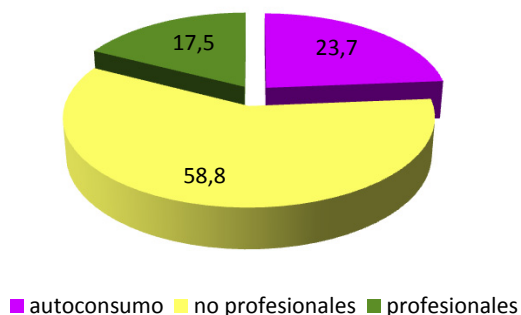
14.2 Estudio regional

Un total de 53 de 99 colmenares muestreados fueron clasificados como positivas a la pérdida de colmenas (PC) durante el año 2008, lo que representa una prevalencia de 53,5% ($IC_{95\%} = 43,2-63,9$; $p < 0,0001$). La distribución espacial se muestra en la Fig. 21. Aunque la prevalencia observada de PC fue menor de lo esperado, no fue estadísticamente significativo (67% ; $\chi^2 = 2,90$, $p = 0,087$).

Figura 21. Distribución de colmenas afectadas por pérdida de colonias (PC) y asintomáticas



Los datos recogidos en esta encuesta regional están en consonancia con los recavados previamente en la encuesta nacional. La mayoría de los apicultores de esta región son no profesionales (58,8%, Fig. 22), utilizan colmenas de tipo Langstroth o Perfección (95,9%), están orientadas a la producción de miel (98,9%) y no practican trashumancia (95%).

Figura 22. Tipo de explotaciones (%)

Con respecto a los tratamientos contra *Varroa*, sólo el 2% de los apicultores declaró no utilizar producto alguno para su control, mientras que el 50,5% aplicó dos tratamientos al año. El producto comercial más frecuentemente aplicado fue Apistan® (70%) y un 6,1% hizo tratamiento de forma artesanal con fórmulas caseras (p. ej. fluvalinato). El 37,1% de los apicultores aplicó los productos comerciales de forma adecuada, siendo Apistan® el producto con la posología más correcta (41,4%, Tabla 13).

Tabla 13. Tratamientos para el control de *Varroa*. Posología correcta de cada producto. Frecuencia y grado de cumplimiento declarado por los apicultores para cada producto.

Producto	Posología correcta		Nº respuestas (%)	Grado cumplimiento n (%)		
	Nº tiras	Nº semanas		Nº tiras	Nº semanas	Ambos
Apistan®	2	6 a 8	70 (70.7)	63 (90)	32 (45.7)	29 (41.4)
Apistan®/Bayvarol®	2 ó 4	6 a 10	3 (3.0)	3 (100)	3 (100)	3 (100)
Apivar®	2	6 a 10	4 (4.1)	2 (50)	1 (7)	0 (0)
Bayvarol®	4	6 a 8	14 (14.1)	7 (50)	8 (57.1)	4 (28.6)
Artesanales	-	-	6 (6.1)	-	-	-
Sin respuesta	-	-	2 (2.0)	-	-	-

Con respecto a los tratamiento frente a *Nosema* spp., la mayoría de los apicultores (98%) no usaron fumagilina.

Tal como se puede observar en la Tabla 14, la prevalencia obtenida para *V. destructor* en el año 2007 fue significativamente superior a la del año anterior ($\chi^2=7,98$; $p=0,005$). 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 2006 $\chi^2=72,8$; $p=0,0001$; prim/ot 2007 $\chi^2=59,2$; $p=0,0001$).

Tabla 14. 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 (Fig. 24). La prevalencia fue significativamente superior en los pisos montañosos y supramediterráneos (Tabla 15), 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 y más caliente que en las zonas septentrionales.

Tabla 15. Distribución de *V. destructor* en los pisos climáticos de acuerdo a la clasificación de Rivas-Martínez (1987)

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).

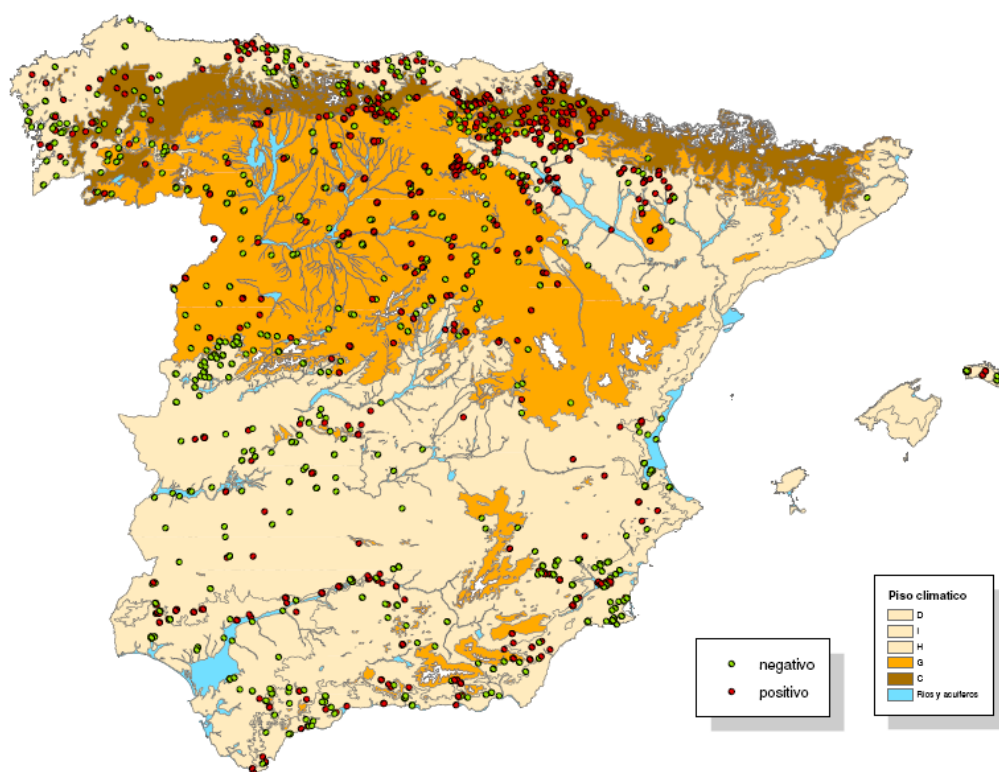
*** Prevalencia de *V. destructor* en el piso climático Supramediterráneo (G) comparado con Colino (D).

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

Los datos en negrita representan diferencias significativas

La distribución de *V. destructor* en función del tamaño de las explotaciones parece seguir una tendencia negativa, de forma que al aumentar el tamaño de la explotación se reduce significativamente la presencia del patógeno ($\chi^2=22,47345$; gl 2; Sig. (bilateral) $1,32 \times 10^{-5}$).

Figura 24. Mapa mostrando la distribución de las muestras positivas de *V. destructor* en España, de acuerdo a los pisos climáticos de Rivas-Martínez (1987): Montano (C), Colino (D), Supramediterráneo (G), Mesomediterráneo (H), Termomediterráneo (I)



Por otro lado, si se tiene en cuenta la distribución de *V. destructor* atendiendo al tipo de colmena, se observa que la mayor prevalencia se produce precisamente en el 6,6% de los apicultores que no contestaron a esta pregunta. Obviando este dato, la mayor prevalencia se produjo en las colmenas tipo Perfección ($\chi^2=48,57$; gl 3; Sig. (bilateral) 10^3).

Con respecto a la trashumancia, la prevalencia de *V. destructor* fue mayor en aquellas explotaciones en las que no se realizó dicha actividad ($\chi^2=43,34816$; gl 1; Sig. (bilateral) $4,58 \times 10^{11}$).

15.1.3 Prevalencia regional

El agente nosógeno biótico más frecuente fue el parásito *V. destructor* en abejas adultas de interior (49,5%, $IC_{95\%} = 39,1-59,9$) seguido de las de abejas de exterior (39,4%, $IC_{95\%} = 29,3-49,5$) y de la cría (35,4%, $IC_{95\%} = 25,4-45,3$).

15.2 *Acarapis woodi*

15.2.1 Nuevas aportaciones técnicas

El método de detección de *A. woodi* desarrollado en esta tesis implicó el diseño de una pareja de cebadores que amplificaban un fragmento de 162 pb para el gen COI de *Acarapis* spp (Tabla 16). Después de contrastar las secuencias obtenidas con las de la base de datos del *GenBank*, se obtuvo un porcentaje de identidad y cobertura del 100% con las secuencias disponibles de *A. woodi* de este mismo gen.

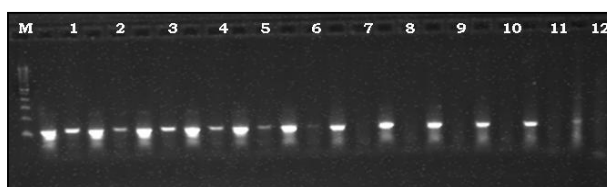
Tabla 16. Cebadores seleccionados para la detección del género *Acarapis*.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño producto PCR	Especificidad
AcarFOR (directo)	<u>CGGG</u> CCCGAGCTTATTTACTGCTG	162 pb	<i>Género Acarapis</i>
AcarREV (reverso)	<u>GCG</u> CCTGTCAATCCACCTACAGAAA		

Las colas GC añadidas a los cebadores aparecen subrayadas

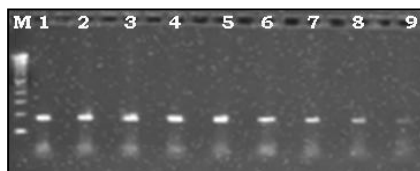
Los mejores productos amplificados (amplicones) se obtuvieron cuando la temperatura era de 59°C (Fig. 25). Esta es la temperatura más alta a la cual los amplicones se pueden ver claramente y esto, consecuentemente reduce el riesgo de amplificación inespecífica.

Figura 25. Gradiente de temperaturas (°C) de cebadores. M. Marcador (100 pb); **1.** 58,1; **2.** 58,5; **3.** 59,6; **4.** 61,1; **5.** 63,1; **6.** 65,2; **7.** 67,4; **8.** 69,5; **9.** 71,4; **10.** 72,8; **11.** 73,4; **12.** 74.



En las pruebas realizadas para determinar la concentración de cebadores más adecuada, el mejor resultado se obtuvo a 0,3 μM (Fig. 26). Esta concentración es la óptima para detectar las mínimas cantidades del patógeno y para evitar la formación de auto-dímeros y hetero-dímeros que podrían influir en el proceso de PCR, disminuyendo su eficacia. Todos los testigos positivos dieron el tamaño de amplicón y las secuencias esperadas.

Figura 26. Gradiente de concentración (μM) de cebadores. M. Marcador (100 pb); **1.** 0,6; **2.** 0,55; **3.** 0,5; **4.** 0,45; **5.** 0,4; **6.** 0,35; **7.** 0,3; **8.** 0,25; **9.** 0,2.



Cuando se estudió la reproducibilidad de esta técnica mostraron los mismos resultados, lo que demuestra la alta fiabilidad del método. Además, las abejas infectadas (testigos positivos) de diferentes países (Irlanda y EE.UU.) también se analizaron mediante el uso de nuestro diseño y se obtuvieron los amplicones esperados en todos los casos.

15.2.2 Prevalencia nacional

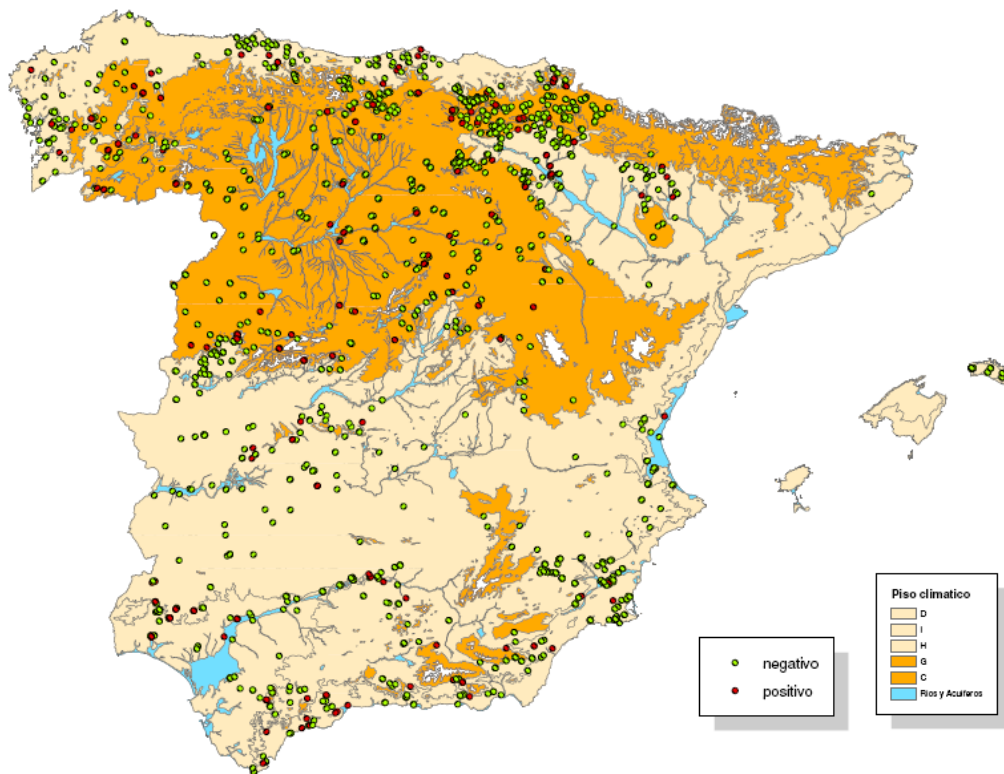
La presencia de *A. woodi* se detectó en 274 muestras de un total de 1943 colmenas muestreadas durante los años 2006 (13%) y 2007 (15,5%), no encontrándose diferencias significativas entre los dos años de muestreo ($\chi^2=2,31$; $p=0,13$).

Tabla 17. 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 evaluar la prevalencia estacional, se detectó que la prevalencia de otoño de cada año (Tabla 17) fue significativamente más alta en comparación la primavera del año correspondiente (prim/ot 2006 $\chi^2=5,86$; $p=0,015$; prim/ot 2007 $\chi^2=7,57$; $p=0,006$).

Figura 27. Mapa mostrando la distribución de las muestras positivas de *A. woodi* en España, de acuerdo a los pisos climáticos de Rivas-Martínez (1987)



Al igual que sucedió con *V. destructor*, *A. woodi* se detectó al menos una vez en todas las regiones incluidas en el estudio (Fig. 27) siendo la prevalencia significativamente superior en las regiones más frías de España (pisos montañosos y supramediterráneos) (Tabla 18), aunque también se detectó en zonas más calientes del país.

Tabla 18. Distribución de *A. woodi* en los pisos climáticos de acuerdo a la clasificación de Rivas-Martínez (1987)

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

Todos los fragmentos amplificados obtenidos se emparejaron con la secuencia de COI de *A. woodi* y no a otras especies del género *Acarapis*. Dos ejemplos de estas secuencias se enviaron a *GenBank* con número de acceso: HM213853 y HM213854.

En cuanto a la distribución de *A. woodi* en función del tamaño de las explotaciones no se producen diferencias significativas en la prevalencia, se detecta de forma homogénea (entre el 13-15,5%) en todos los tamaño de explotación ($\chi^2=1,511225$; gl 2; Sig. (bilateral) 0,469723). La misma falta de significancia se puede observar si se tiene en cuenta la distribución de *A. woodi* atendiendo al tipo de colmena (14% colmenas Layens vs. 15,4% colmenas perfección) ($\chi^2=7,15$; gl 3; Sig. (bilateral) 0,07).

Con respecto a la trashumancia, la prevalencia de *A. woodi* fue ligeramente mayor en aquellas explotaciones en las que no se realizó (16,1% vs. 12,1) ($\chi^2=5,930461$; gl 1; Sig. (bilateral) 0,014881).

15.2.3 Prevalencia regional

La prevalencia de *A. woodi* observada fue mayor de lo esperado en las abejas de exterior (16,2%, $IC_{95\%} = 8,4$ a 23,9). Las abejas de interior no se analizaron.

15.2.4 Idoneidad de las secuencias del COI del *GenBank*

Los análisis de los patrones de diferenciación genética basados en las secuencias obtenidas plantean serias dudas sobre la clasificación de las especies actuales de estos organismos (Tabla 19). La evidencia más clara de esto es el nivel de divergencia sinónimos (K_s) que se encuentra entre las secuencias atribuidas a la misma especie que, en ocasiones, es superior al observado entre las secuencias asignadas a especies diferentes. Por ejemplo, los valores de K_s para dos secuencias del COI de *A. dorsalis* (GQ916568.1 y GQ916567.1) y dos de *A. externus* (HQ243442.1 y GQ916566.1) fueron 23% y 30% respectivamente. Estos valores fueron mayores que los valores de K_s entre *A. externus* (GQ916566.1) y alguna de las tres secuencias de *A. woodi* (22%).

Tabla 19. Sinónimo de divergencia entre las secuencias depositadas en el *GenBank Acarapis* calcula utilizando el método de Nei-Gojobori con corrección Jukes-Cantor

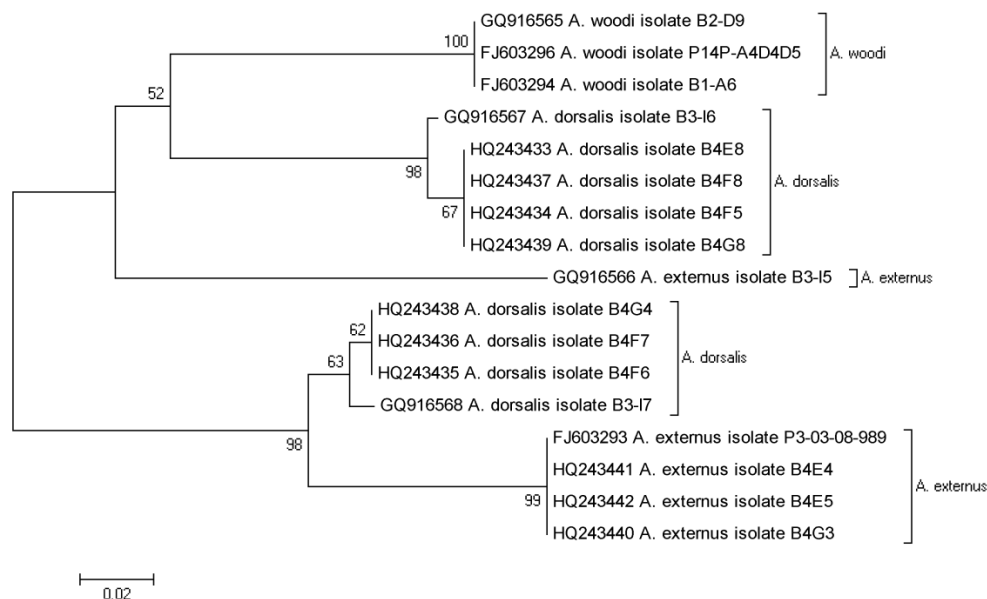
	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]	[15]	[16]
[1]																
[2]	0.000															
[3]	0.000	0.000														
[4]	0.167	0.167	0.167													
[5]	0.249	0.249	0.249	0.215												
[6]	0.231	0.231	0.231	0.231	0.013											
[7]	0.151	0.151	0.151	0.013	0.231	0.215										
[8]	0.151	0.151	0.151	0.013	0.231	0.215	0.000									
[9]	0.249	0.249	0.249	0.215	0.000	0.013	0.231	0.231								
[10]	0.249	0.249	0.249	0.215	0.000	0.013	0.231	0.231	0.000							
[11]	0.151	0.151	0.151	0.013	0.231	0.215	0.000	0.000	0.231	0.231						
[12]	0.151	0.151	0.151	0.013	0.231	0.215	0.000	0.000	0.231	0.231	0.000					
[13]	0.249	0.249	0.249	0.249	0.079	0.093	0.266	0.266	0.079	0.079	0.266	0.266				
[14]	0.249	0.249	0.249	0.249	0.079	0.093	0.266	0.266	0.079	0.079	0.266	0.266	0.000			
[15]	0.249	0.249	0.249	0.249	0.079	0.093	0.266	0.266	0.079	0.079	0.266	0.266	0.000	0.000		
[16]	0.249	0.249	0.249	0.249	0.079	0.093	0.266	0.266	0.079	0.079	0.266	0.266	0.000	0.000	0.000	
[17]	0.216	0.216	0.216	0.216	0.233	0.216	0.199	0.199	0.233	0.233	0.199	0.199	0.304	0.304	0.304	0.304

[1] FJ603294.1 (*A. woodi*) [2] FJ603296.1 (*A. woodi*) [3] GQ916565.1 (*A. woodi*) [4] GQ916567.1 (*A. dorsalis*) [5] HQ243438.1 (*A. dorsalis*) [6] GQ916568.1 (*A. dorsalis*) [7] HQ243439.1 (*A. dorsalis*) [8] HQ243437.1 (*A. dorsalis*) [9] HQ243436.1 (*A. dorsalis*) [10] HQ243435.1 (*A. dorsalis*) [11] HQ243434.1 (*A. dorsalis*) [12] HQ243433.1 (*A. dorsalis*) [13] HQ243442.1 (*A. externus*) [14] HQ243441.1 (*A. externus*) [15] HQ243440.1 (*A. externus*) [16] FJ603293.1 (*A. externus*) [17] GQ916566.1 (*A. externus*)

A diferencia de la conflictiva clasificación del conjunto de secuencias de *A. dorsalis* y *A. externus*, las secuencias del *GenBank* de *A. woodi* (EU190886.1, FJ603296.1, FJ603295.1, FJ603294.1) se agruparon de una forma fiable, sin divergencia alguna ($K_s=0,0$) y fueron idénticas a aquellas obtenidas en este estudio.

El árbol filogenético que se observa en la Fig. 28 ilustra esto último. En él se representa tanto la consistencia del clado *A. woodi* mostrando secuencias idénticas, así como la incongruencia en la asignación las especies restantes. Se pueden diferenciar dos grupos muy divergentes de *A. externus* y *A. dorsalis* indicando la existencia de al menos cuatro linajes diferentes representados por cuatro clados (HQ243433.1, GQ916566.1, HQ243435.1 and FJ603293.1). A pesar de que las secuencias GQ916567.1 y GQ916568.1 son ligeramente diferentes del resto de las secuencias de los clados HQ243433.1 y HQ243435.1 respectivamente, el nivel de divergencia ($K_s= 1.3\%$) entre cada uno de ellos y sus respectivos grupos es compatible con estas secuencias pertenecientes a estos agrupamientos. Aunque tampoco en este caso se puede descartar la posibilidad de que se correspondan a entidades distintas.

Figura 28. Árbol *Neighbor-Joining* de las secuencias de *Acarapis* depositadas en *GenBank*, usando el método Nei-Gojobori con corrección Jukes-Cantor. Los números en las ramas indican valores *bootstrap*.



15.3 Género *Nosema*

15.3.1 Nuevas aportaciones técnicas

La técnica desarrollada en esta tesis supone una mejora a la PCR doble descrita por Martín-Hernández y col. (2007) al incluir un control interno. La nueva pareja de cebadores diseñados amplifica una secuencia del gen COI de *Apis* spp. (Tabla 20) que actúa como control. Al igual que se sucedía para los cebadores AcarFOR y AcarREV, se le añadieron colas GC para aumentar la temperatura de anillamiento y mejorar su especificidad.

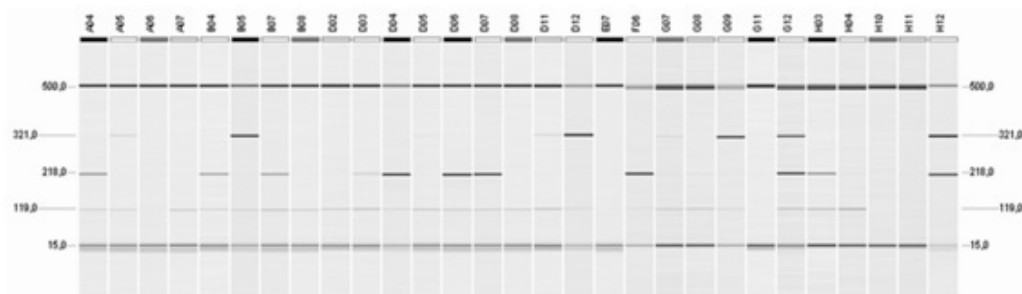
Tabla 20. Cebadores seleccionados para la detección de *A. mellifera*

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño producto PCR	Especificidad
COI-FOR (directo)	<u>GGG</u> TCCAAGACCAGGAAGCTGGAT	119 pb	<i>Apis mellifera</i>
COI-REV (reverso)	GCGC <u>GGAAATTCCTGATATATGAAGAGAAAA</u>		

Las colas GC añadidas a los cebadores aparecen subrayadas

Las secuencias y concentraciones de cebadores óptimas son esenciales para una máxima especificidad y eficiencia en la técnica de PCR. Por eso, la concentración seleccionada de los cebadores COI para usarse en una PCR múltiple con los cebadores 321-APIS y 218-MITOC, fue de 0,02 μ M. Se obtuvo una única banda claramente visible (aunque a baja resolución) que no redujo la sensibilidad de las otras dos parejas de cebadores, así no varió la sensibilidad de *Nosema* spp. en la PCR múltiple (Fig. 29). Además, se hizo un gradiente de temperaturas y observando que los cebadores funcionaban sin problema a un alto rango de temperaturas (de 57,1°C a 66,1°C), se seleccionó la temperatura de 61,8°C que se había elegido previamente para los anillamientos de los cebadores 321-APIS y 218-MITOC.

Figura 29. Electroforesis capilar de fragmentos amplificados por la PCR múltiple para los análisis de *Nosema* spp. Tamaño del fragmento COI 119 pb, Marcador 15-500 pb. Líneas positivas de *N. apis* (321 bp): A05, B05, D11, D12, G07, G09; Líneas positivas de *N. ceranae* (218-219 pb): A04, B04, B07, D03, D04, D06, D07, F06, H03, G08; Líneas positivas a la infección mixta (*N. apis* + *N. ceranae*): G12, H12; Líneas negativas de *Nosema* spp.: A07, B08, D02, D05, D08, H04; Espacios en blanco (incluyendo controles negativos de extracción y PCR): A06, E07, G11, H10, H11.



En los tests de especificidad se observó que el fragmento amplificado sólo se unía con secuencias del gen COI de subespecies de *A. mellifera* (*A. m. ligustica*, *A. m. mellifera*, *A. m. carnica* y *A. m. iberica*).

15.3.2 Prevalencia nacional

La especie de microsporidios que más frecuentemente infectó a las abejas melíferas en España durante 2006-2007 fue *N. ceranae* (Tabla 21). 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 21. 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 22). 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 , $p > 0,05$) en áreas más calientes de España (en los pisos mesomediterráneo y termomediterráneo) que los cálidos o más fríos. Por el contrario, *N. apis* parece seguir un gradiente decreciente de la prevalencia en otoño de ambos años (χ^2 , $p > 0,05$).

Tabla 22. 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

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 23. Distribución de *N. ceranae* en los pisos climáticos de acuerdo a la clasificación de Rivas-Martínez (1987)

Piso climático	n	positivos	Prevalencia (%)	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)

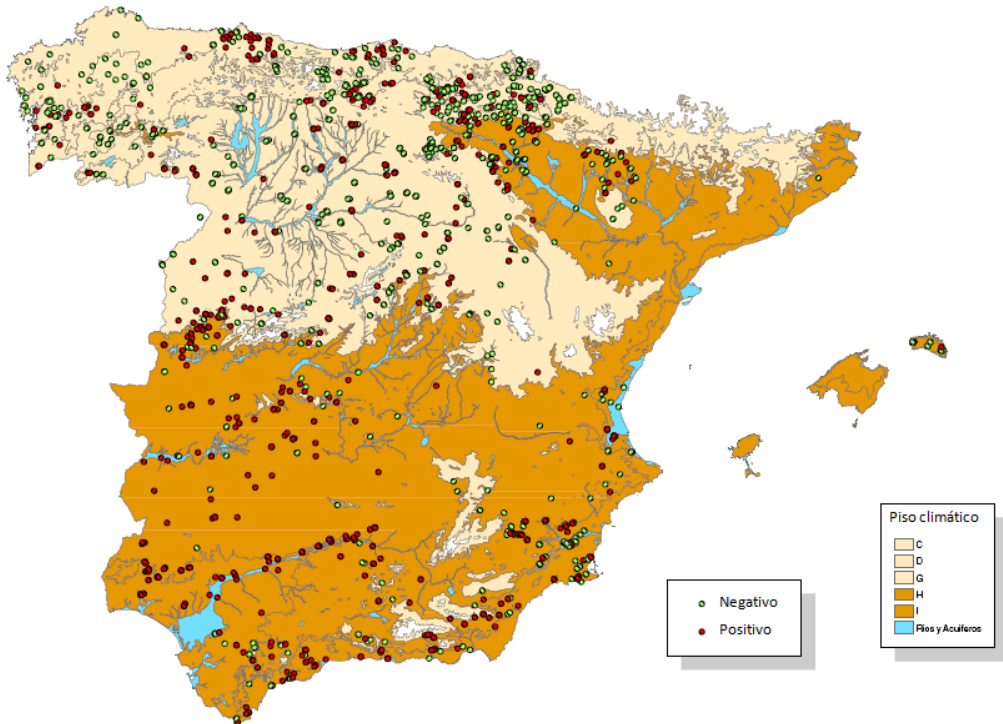
** Prevalencia de *N. ceranae* en el piso climático D comparado con el piso climático G

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

Los datos en negrita representan diferencias significativas

En cuanto a la distribución de *Nosema* spp. en España, la prevalencia de *N. ceranae* fue significativamente mayor (χ^2 , $p < 0,05$) en áreas más calientes (en los pisos mesomediterráneo y termomediterráneo) que en los más fríos (Tabla 23 y Fig. 30).

Figura 30. Mapa mostrando la distribución de las muestras positivas de *N. ceranae* en España, de acuerdo a los pisos climáticos de Rivas-Martínez (1987)



Por el contrario, *N. apis* parece seguir un gradiente decreciente de la prevalencia y la menor presencia se encuentra en las áreas meso- y termomediterráneas que se corresponden con zonas con menor número de meses con heladas (alrededor de 3 meses por año). La prevalencia aumenta en aquellas áreas más frías (pisos montaños y supramediterráneos), donde la época de heladas es mayor (Tabla 24 y Fig. 31).

Tabla 24. Distribución de *N. apis* en los pisos climáticos de acuerdo a la clasificación de Rivas-Martínez (1987)

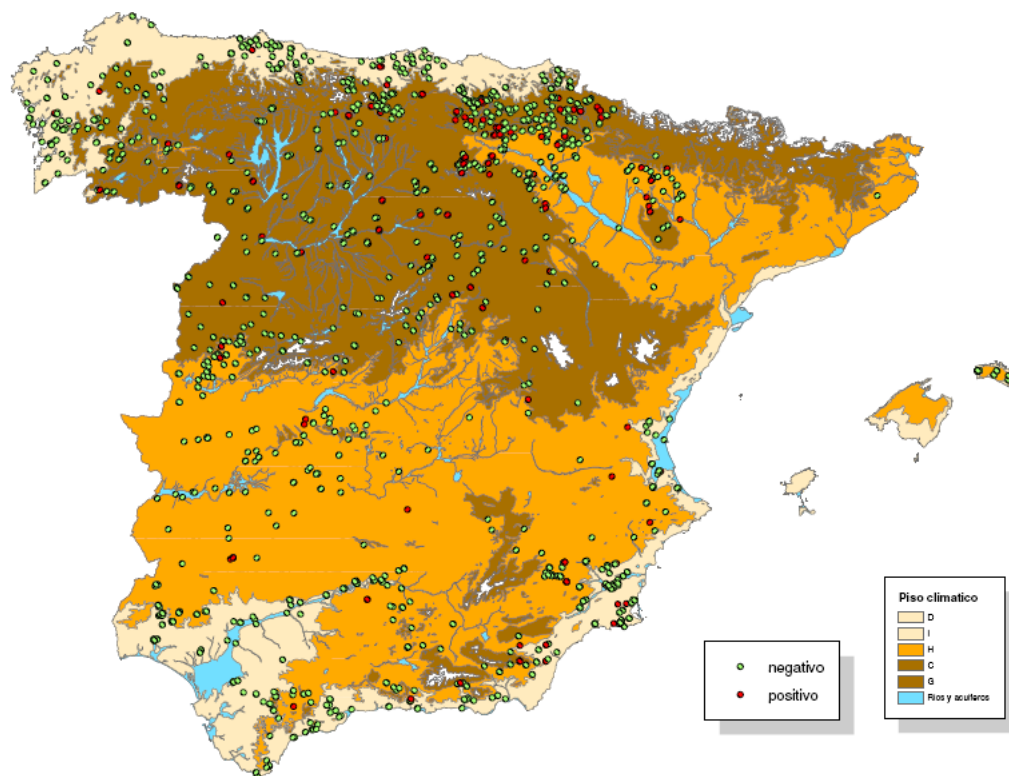
Piso climático	n	positivos	Prevalencia (%)	χ^2	p	χ^2	p
Mesomediterráneo (H)	191	6	3,14	-	-		
Termomediterráneo (I)	256	16	6,25	2,26	0,1328*	-	-
Colino (D)	492	48	9,76	8,27	0,0040*		
Montano (C)	301	47	15,61	18,91	0,0001*	-	-
Supramediterráneo(G)	454	79	17,40	23,89	0,0000*	0,42	0,5192**

* 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

Figura 31. Mapa mostrando la distribución de las muestras positivas de *N. apis* en España, de acuerdo a los pisos climáticos de Rivas-Martínez (1987).



La distribución de los microsporidios en función del tipo de explotación, colmena y realización de trashumancia, podemos afirmar que la prevalencia de *N. apis* fue ligeramente superior en las explotaciones de autoconsumo (15,6%) (χ^2 6,095539; gl 2; Sig. (bilat) 0,47465), en colmenas Perfección (13,8%) (χ^2 12,61; gl 3; Sig. (bilateral) 0,01), y en las explotaciones no trashumantes (12,4%) (χ^2 3,2742; gl 1; Sig. (bilateral) 0,0703). Por el contrario, en el caso de *N. ceranae*, la prevalencia fue mayor en las explotaciones profesionales (52,3%) (χ^2 34,18365; gl 2; Sig. (bilateral) $3,78 \times 10^{-8}$), en las colmenas Layens (56,9%) (χ^2 87,39; gl 3; Sig. (bilateral) 0,00), y en aquellas explotaciones que realizan trashumancia (58,4%) (χ^2 104,2293; gl 1; Sig. (bilateral) $1,8 \times 10^{-24}$). Sin embargo, la prevalencia en la infección mixta no se vio afectada por ninguno de estos factores.

15.3.3 Prevalencia regional

Después de analizar sólo las abejas de exterior, la prevalencia de *N. ceranae* observada fue de 38,4% (IC_{95%} = 28,3 a 48,5), habiéndose detectado *N. apis* en raras ocasiones (4,0, IC_{95%} = 1,1 a 10,0).

15.4 *Braula coeca*

La presencia de *B. coeca* en abejas melíferas en España durante los años que duró el muestreo, tan sólo se detectó en la isla de La Palma (Comunidad Canaria) en el otoño del año 2006. La prevalencia en esa zona geográfica en ese momento fue del 53,8% (sobre 13 muestras analizadas), lo que a nivel nacional representa el 1,5% (IC_{95%}; 0,3-2,7).

Tabla 25. Prevalencia de *B. coeca* en las estaciones muestreadas (primavera y otoño) de los años 2006 y 2007

Año	n	Prevalencia Anual (%)	IC _{95%}		Prevalencia Estacional (%)	IC _{95%}		
			Inf	Sup		Inf	Sup	
2006	1097	0,6	0,1	1,1	Primavera	0,0	0,0	0,6
					Otoño	1,5	0,3	2,7
2007	860	0,0	0,0	0,4	Primavera	0,0	0,0	0,7
					Otoño	0,0	0,0	1,1

Pese a que la prevalencia fue similar ambos años (Tabla 25), la significación estadística está en el límite que se usa habitualmente ($p=0,05$). Por tanto, tan solo se puede decir que en el año 2007, la prevalencia de *B. coeca* fue más baja pero que no se alcanza significación estadística (χ^2 Yates correction=3,8; $p=0,05$).

15.5 *Ascosphaera apis*

15.5.1 Análisis microbiológico

El análisis microbiológico se realizó para confirmar 45 casos clínicos de ascosferosis (2,4%) detectados macroscópicamente a la hora de hacer el examen visual de la muestra de cría.

15.5.2 Nuevas aportaciones técnicas

La pareja de cebadores diseñada amplifican un fragmento de 136 pb para el gen 5.8S del ARNr (Tabla 26).

Tabla 26. Cebadores seleccionados para la detección de *A. apis*

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño producto PCR	Especificidad
AscFOR (directo)	TGTGTCTGTGCGGCTAGGTG	136 pb	<i>A. apis</i>
AscREV (reverso)	GCTAGCCAGGGGGAACTAA		

Se hizo un gradiente de temperaturas y se observó que los cebadores funcionaban sin problemas a un alto rango de temperaturas (58°C a 68°C). Asimismo, después de hacer un gradiente de concentración, se observó que los cebadores funcionaban desde 0,6 µM a 0,05 µM.

Cuando se estudió la reproducibilidad de esta técnica mostraron los mismos resultados, lo que demuestra la alta fiabilidad del método.

15.6 *Melissococcus plutonius*

15.6.1 Nuevas aportaciones técnicas

Los cebadores obtenidos se muestran en la tabla 27 y de acuerdo a lo esperado amplificaron un fragmento de ADN de 281 pb del gen COI.

Tabla 27. Cebadores seleccionados para la detección *M. plutonius*

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño producto PCR	Especificidad
MeliFOR (directo)	GTAAAAAGGCGCTTTCGGGT	281 pb	<i>M. plutonius</i>
MeliREV (reverso)	GAGGAAAACAGTTACTCTTCCCCTA		

Al igual que en el diseño de los cebadores anteriores, se hizo un gradiente de temperaturas y se observó que éstos funcionaban desde 58°C a 60°C. Asimismo, después de hacer un gradiente de concentración, se observó que los cebadores funcionaban en un amplio rango (0,6 µM a 0,25 µM).

Al igual que en el caso anterior, cuando se estudió la reproducibilidad de esta técnica mostraron los mismos resultados, lo que demuestra la alta fiabilidad del método.

15.7 *Paenibacillus larvae*

15.7.1 Análisis microbiológico

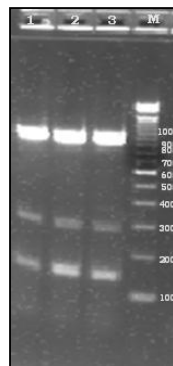
El análisis microbiológico se realizó para confirmar 9 casos clínicos de loque americana (0,5%) detectados macroscópicamente a la hora de hacer el examen visual de la muestra de cría.

15.8 PCR múltiple de los patógenos infecciosos de la cría

15.8.1 Nuevas aportaciones técnicas

Como se ha dicho anteriormente, las secuencias y concentraciones de cebadores óptimas son esenciales para una máxima especificidad y eficiencia en la técnica de PCR, especialmente en reacciones múltiples. Por eso, la concentración seleccionada de los cebadores Ascós, Meli y Primer (Govan y col., 1999) para usarse en una PCR múltiple fue de 0,09 μ M para *A. apis*, 0,6 μ M para *M. plutonius* y 0,05 μ M para *P. larvae*, respectivamente. Además, dado que los cebadores funcionaban en un amplio rango de temperaturas, se seleccionó la temperatura de 59°C ya que era la óptima para las tres parejas en la PCR múltiple, obteniéndose tres bandas claramente visibles como se puede observar en la Fig. 32.

Figura 32. Gel de agarosa con tres fragmentos amplificados: *A. apis* (136 pb), *M. plutonius* (281 pb) y *P. larvae* (973 pb)



15.8.2 Prevalencia nacional

Los datos obtenidos en este estudio muestran que 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 28. 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

Como se puede observar en la tabla 28, la prevalencia de *A. apis* en el año 2007 se redujo significativamente al compararla con la del año anterior ($\chi^2=7,48$; $p=0,001$)

ya que los dos muestreos del 2006 resultaron de mayor prevalencia que los del año 2007 (prim'06/prim'07 $\chi^2=7,3$; $p=0,007$; ot'06/ot'07 $\chi^2=0,9$; $p=0,352$). Sin embargo, en ninguno de los dos años se encuentra diferencia entre los muestreos de primavera y otoño (prim/ot 2006 $\chi^2=0,6$; $p=0,423$; prim/ot 2007 $\chi^2=0,2$; $p=0,632$).

Tabla 29. Distribución de *A. apis* en los pisos climáticos de acuerdo a la clasificación de Rivas-Martínez (1987)

Piso climático	n	positivos	Prevalencia (%)	χ^2	p	χ^2	p
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**

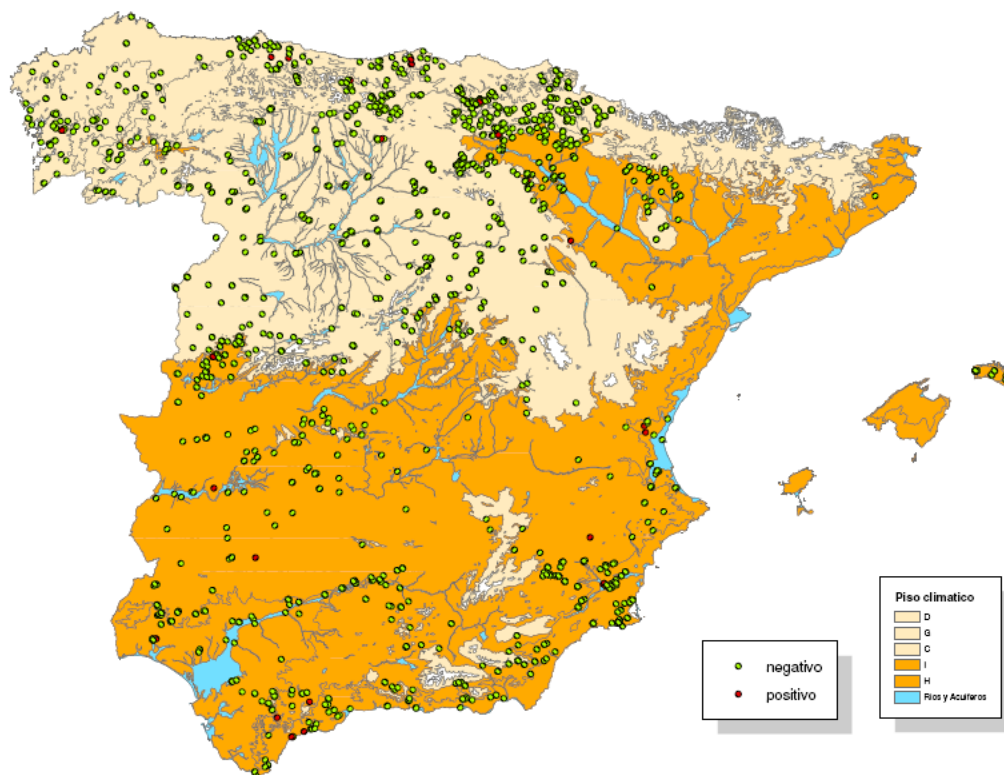
* Prevalencia de *A. apis* en cada piso climático comparado con el nivel más bajo (piso climático G)

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

Los datos en negrita representan diferencias significativas

Como se puede observar en la Tabla 29 y Fig. 33, la presencia de *A. apis* fue más frecuente en las áreas más calientes (pisos meso- y termomediterráneo).

Figura 33. Mapa mostrando la distribución de las muestras positivas de *A. apis* en España, de acuerdo a los pisos climáticos de Rivas-Martínez (1987).



Por otro lado, la prevalencia de *P. larvae* en el año 2007 fue estadísticamente superior a la de 2006 ($\chi^2=7,92$; $p=0,005$) (Tabla 30). El muestreo de primavera de ese año resultó de mayor prevalencia que el del 2006 (prim'06/prim'07 $\chi^2=6,3$; $p=0,012$) mientras que los dos muestreos de otoño resultaron similares (ot'06/ot'07 $\chi^2=1,7$; $p=0,199$).

Tabla 30. 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

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 $\chi^2=0,00$; $p=0,9851$; prim/ot 2007 $\chi^2=0,4$; $p=0,525$).

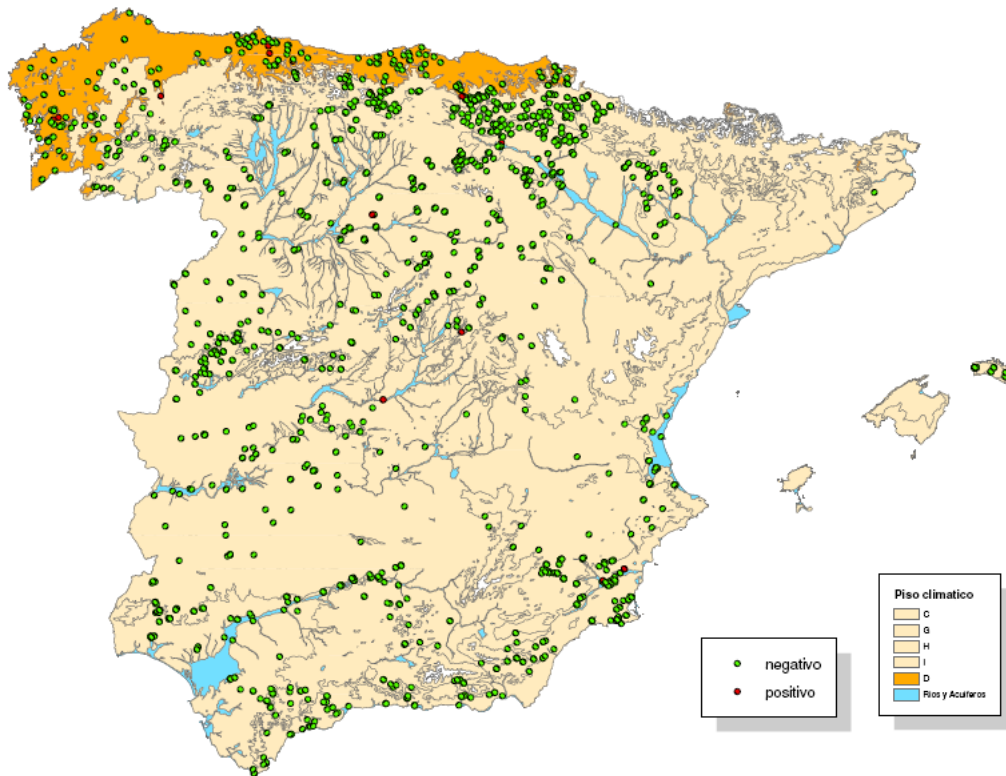
Tabla 31. Distribución de *P. larvae* en los pisos climáticos de acuerdo a la clasificación de Rivas-Martínez (1987)

Piso climático	n	positivos	Prevalencia (%)	χ^2	p	χ^2	p
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

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 31 y Fig. 34).

Figura 34. Mapa mostrando la distribución de las muestras positivas de *P. larvae* en España, de acuerdo a los pisos climáticos de Rivas-Martínez (1987)



En cuanto a la distribución de *P. larvae* en función del tipo de explotación (profesionales, no profesionales y autoconsumo), la prevalencia es significativamente más elevada en las explotaciones de autoconsumo (4,8%; χ^2 8,11248; gl 2; Sig. (bilateral) 0,017314). Asimismo, *P. larvae* está más distribuido en colmenas de tipo perfección (3,3%, χ^2 9,43; gl 3; Sig. (bilateral) 0,02), y cuando no se realiza trashumancia (2,5%) (χ^2 1,699209; gl 1 Sig. (bilateral) 0,192391).

En cuanto a la bacteria *M. plutonius*, a pesar de ser la primera detección realizada en nuestro país, la prevalencia no alcanzó en ningún momento el 1%, siendo las prevalencias similares en ambos años ($\chi^2=1,34$; $p=0,2471$) (Tabla 32).

Tabla 32. Prevalencia de *M. plutonius* en los años 2006 y 2007

Año	n	Prevalencia Anual (%)	IC _{95%}			Prevalencia Estacional (%)	IC _{95%}	
			Inf	Sup			Inf	Sup
2006	900	0,4	0,1	1,1	Primavera	0,5	0,1	1,5
					Otoño	0,3	0,0	1,7
2007	759	0,1	0,0	0,7	Primavera	0,2	0,0	1,1
					Otoño	0,0	0,0	1,4

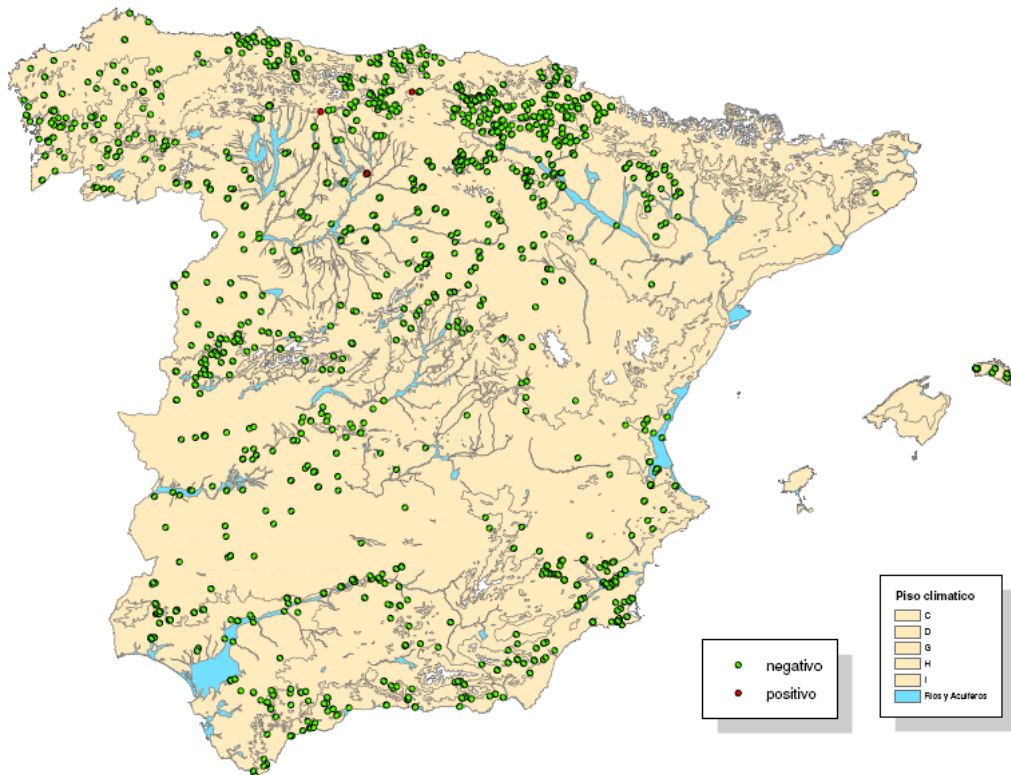
Las prevalencias detectadas en primavera y otoño del año 2006 fueron similares entre sí (prim/ot 2006 $\chi^2=0,2$; $p=0,662$), así como las del año siguiente (prim/ot 2007 $\chi^2=0,5$; $p=0,471$). De igual forma, tanto las primaveras como los otoños de ambos años fueron similares entre sí (prim'06/prim'07 $\chi^2=0,7$; $p=0,393$; ot'06/ot'07 $\chi^2=0,8$; $p=0,367$).

Tabla 33. Distribución de *M. plutonius* en los pisos climáticos de acuerdo a la clasificación de Rivas-Martínez (1987)

Piso climático	n	positivos	Prevalencia (%)	χ^2	p	χ^2	p
Montano (C)	228	0	0,0				
Colino (D)	169	0	0,0				
Termomediterráneo (I)	173	0	0,0				
Mesomediterráneo (H)	338	1	0,3	-	-		
Supramediterráneo (G)	263	2	0,8	0,1	0,7151		

En cuanto a la distribución de *M. plutonius* en función de las zonas climáticas en las que está dividida España, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 33 y Fig. 35).

Figura 35. Mapa mostrando la distribución de las muestras positivas de *M. plutonius* en España, de acuerdo a los pisos climáticos de Rivas-Martínez (1987)



Si bien siempre hemos hablado de patógenos porque siempre se ha detectado el ADN de los mismos, podemos decir que un 18,2% y un 14,7% de las muestras fueron positivas a ascosferosis y a loque americana respectivamente en base a los signos clínicos y al cultivo microbiológico, aunque resultaron negativas a la detección del ADN por PCR.

Finalmente, después de seleccionar aleatoriamente 84 colmenares repartidos por toda la geografía española y analizar por PCR las abejas adultas y la cría de la misma colmena, se comprobó que la prevalencia de *A. apis* era similar para ambos tipos de muestra (alrededor del 17%), sin embargo en el caso de *M. plutonius* y *P. larvae* era dos veces mayor en abejas adultas (3,5% y 71,8%, respectivamente) que en la cría (1,2 y 33,1%, respectivamente).

15.8.3 Prevalencia regional

Se observó una baja prevalencia de *P. larvae* (6,1%, IC_{95%} = 0,9-11,3). Asimismo, no se detectaron muestras con *A. apis* y *M. plutonius*.

15.9 Virus

En el estudio regional, los patógenos más frecuentes en todas las muestras fueron VRN y VAD en abejas adultas (94,9%, IC_{95%} = 88,6-98,3) y VAD en la cría (81,8%, IC_{95%} = 73,7 a 89,9). Asimismo, tal como se puede observar en la Tabla 34, el VK sólo se detectó en abejas adultas (5,1%, IC_{95%} = 1,7-11,4) y el VCS, se encontraron en raras ocasiones tanto en abejas adultas como en la cría (2%, IC_{95%} = 0,2-7,1), mientras que el VIPA, VPA y VPC no se detectaron en ninguna de las muestras analizadas.

Tabla 34. Virus detectados*

	Virus	n	Prevalencia (%)	IC (95%)	
				Inf	Sup
VRN	abejas adultas	94	94,9	88,6	98,3
	cría	53	53,5	43,2	63,9
VAD	abejas adultas	94	94,9	88,6	98,3
	cría	81	81,8	73,7	89,9
VK	abejas adultas	5	5,1	1,7	11,4
VCS	abejas adultas	2	2,0	0,2	7,1
	cría	2	2,0	0,2	7,1

* VIPA, VPA y VPC no se detectaron.

15.10 Pesticidas

15.10.1 Prevalencia nacional

Los resultados obtenidos de las muestras recogidas se resumen en la Tabla 35.

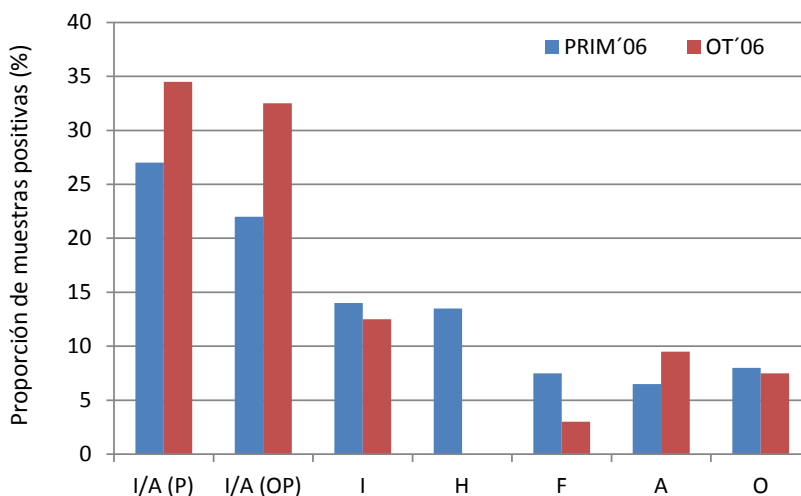
Tabla 35. Compuestos detectados (%) en el polen almacenado en el estudio nacional

Compuesto	2006	2007	Compuesto	2006	2007
	Prevalencia (%)	Prevalencia (%)		Prevalencia (%)	Prevalencia (%)
Primavera					
Fluvalinato	29,9	31,5	Endrina	0,7	1
Clorfenvinfós	23,4	24,4	Cipermetrina	0,7	1
Trifuralina	10,5	8,8	Malatión	0,4	0,5
Tetradifón	4,2	4,3	PCB 101	0,4	0,5
Bromopropilato	3,8	4	Miclobutanil	0,4	0,8
Fipronil	3,6	3,8	PCB180	0,4	0,5
4-4'-TDE	3,1	3,3	Pendimetalina	0,4	0,8
Atrazina	2,9	3	Vinclozolina	0,4	0,8
Endosulfán-sulfato	2,9	2,5	Clorotalonil	0,4	0,8
4-4'-DDE	2,7	2,5	Etil-Paratión	0,4	0,3
Clorpirifós	2,2	2,5	Propiconazol	0,4	0,5
Simazina	2	1,8	Metiocarb sulfóxido	0,4	0,3
Procimidona	1,8	1,8	Cialotrina	0,4	0,5
Acrinatrina	1,8	2,3	Azoxistrobina	0,4	0,3
Cumafós	1,8	6,5	Heptacloro	0,4	0,5
Hexaclorobenzeno	1,6	1,5	Diazinon	0,4	0,5
Metalaxil	1,6	1,3	Dieldrín	0,2	0,3
Amitraz(met)	1,6	1,3	Fenitrotión	0,2	0,3
4-4'-DDT	1,3	0,8	Imazametabenz- metil	0,2	0,5
Lindano	0,9	0,8	Carbofurán	0,2	0,3
Carbaril	0,9	0,8	Iprodiona	0,2	0
Beta-endosulfán	0,9	0,8	Flusilazol	0,2	0
Deltametrín	0,9	1,3	Dicofol	0,2	0
Difenoconazol	0,9	1	Metil-Azinfós	0,2	0,3
Aldicarb	0,7	0,5	Rotenona	0,2	0
Oxamil	0,7	0,5	Clordano	0,2	0,3
Captan	0,7	1	Spiromesifen	0,2	0,3
Otoño					
Clorfenvinfós	19,6	17,9	Endosulfán-sulfato	3,3	3,6
Fluvalinato	16,3	15,5	Bromopropilato	2,2	2,4
Clorpirifós	6,5	4,8	Amitraz (met)	2,2	2,4
Tetradifón	4,3	2,4	Hexaclorobenzeno	1,1	1,2
Cipermetrina	4,3	6	4-4'-DDE	1,1	1,2
Acrinatrina	3,3	4,8	Vinclozolina	1,1	1,2
Cumafós	3,3	10,7	Fenitrotión	1,1	1,2

Los residuos de pesticidas se detectaron en un 42% de las muestras de polen almacenado recogidas en primavera, mientras que en las muestras de otoño, sólo se detectó en el 31%. En general, la mayoría de las muestras positivas tenían uno o dos compuestos; de hecho, en el 20% de las muestras se detectaron simultáneamente más de cinco compuestos, e incluso algunos de ellos con 10 o más. En relación al muestreo de primavera, no se encontraron grandes diferencias entre ambos años. Una situación similar se observó entre las muestras de otoño.

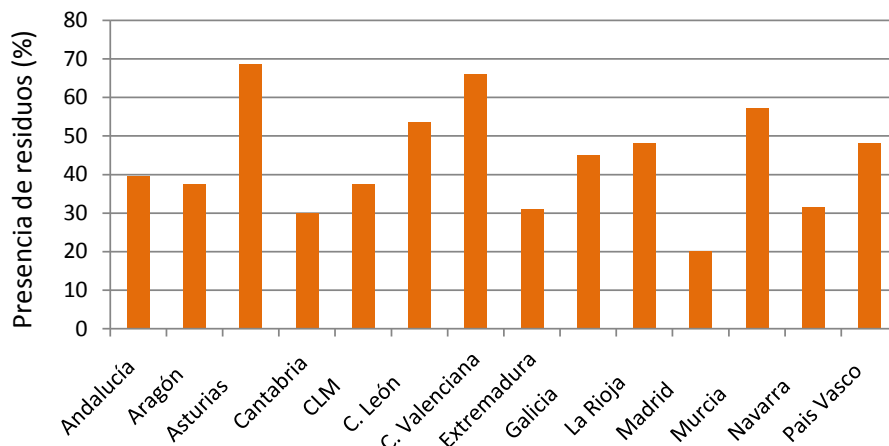
Si se comparan los resultados entre las muestras de primavera y otoño, y teniendo en cuenta que las de otoño son menores debido al estatus de las colmenas en Noviembre-Diciembre, se puede observar que en primavera se detectaron muchas más muestras con residuos así como un mayor número de compuestos. En otoño, hubo una mayor proporción de piretroides y organofosfatos, mientras que la proporción de residuos de herbicidas y fungicidas fue menor e incluso nula (Fig. 36).

Figura 36. Comparación de porcentajes, en relación al total de muestras positivas, de los pesticidas de las diferentes familias químicas detectadas en primavera y otoño de 2006. I/A (P): Insecticidas-acaricidas (piretroides); I/A (OP): Insecticidas-acaricidas (organofosfatos); Herbicidas; Fungicidas; A: Acaricidas; O: Otros.



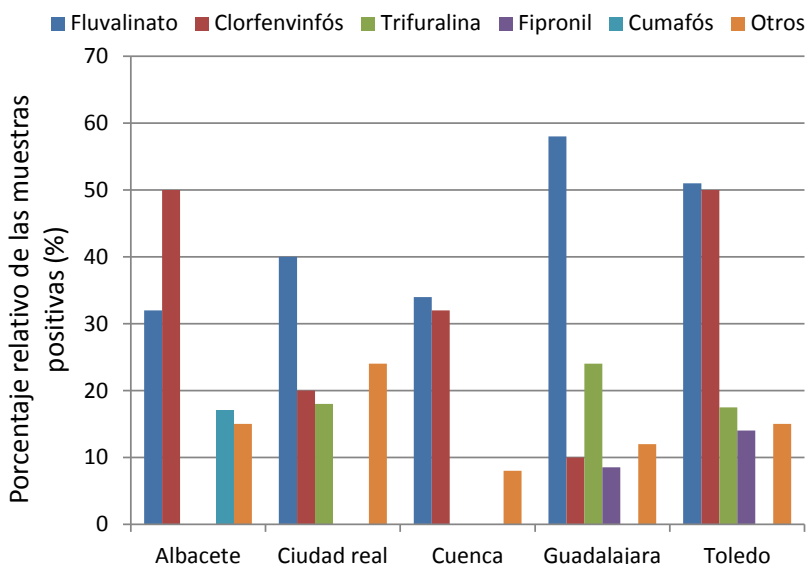
Se pueden observar algunas diferencias dependiendo de la región española (Fig. 37) que podrían ser debidas a la diferencia del clima y la localización que pueden condicionar los cultivos.

Figura 37. Porcentajes relativos de las muestras con residuos en relación al total de muestras positivas encontradas en las diferentes regiones de España estudiadas



Asimismo, es importante señalar que los cultivos de secano, sin una agricultura intensiva, son predominantes en el sur y centro de España. En la Fig. 38, se muestra un ejemplo de la proporción de los pesticidas más frecuentemente detectados en relación al número total de muestras positivas en la región de Castilla La Mancha. Sólo una provincia, Guadalajara produce maíz y las otras provincias tienen muchas zonas de girasol.

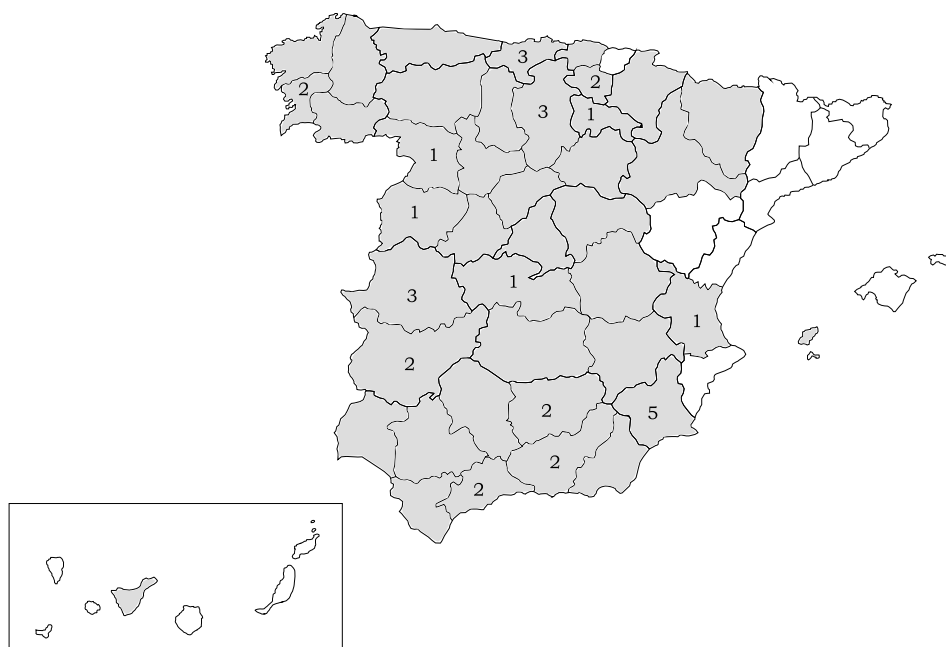
Figura 38. Porcentajes relativos de los compuestos más frecuentemente detectados en relación al número de positivos encontrados en las cinco provincias de Castilla La-Mancha



En relación a los compuestos observados, el fluvalinato y el clorfenvinfós fueron los residuos de pesticidas más frecuentemente detectados en las muestras analizadas (Tabla 35). En primavera, el fluvalinato fue el más predominante, en un 30,7% de las muestras analizadas. Sin embargo, sólo estuvo presente en el 15,9% de las muestras de otoño. El clorfenvinfós estaba presente en el 23,9% de las muestras de primavera y en otoño, fue el residuo más prevalente, habiéndose detectado el 18,7% de las muestras analizadas. La trifluralina fue el tercer residuo de pesticida más prevalente (9,7%). También se detectaron otros acaricidas como el bromopropilato, el cumafós, la acrinatrina o el tetradifón, pero con menor frecuencia (Tabla 35).

El fipronil se observó en el 3,7% de las muestras analizadas en primavera, pero nunca se detectó en otoño. La Fig. 39 muestra el número de muestras donde el fipronil fue detectado en cada provincia. Las concentraciones estuvieron normalmente cerca a los límites de detección, aunque en dos muestras apareció en cantidades $>300 \mu\text{g}/\text{Kg}$, ellos no han sido considerados en los análisis estadísticos. Por el contrario, la imidacloprida y el ácido cloronicótico no se detectaron en ninguna muestra.

Figura 39. Zonas muestreadas (grises). El número dentro del área de la provincia indica el número de muestras donde se detectaron los residuos de fipronil.



Otros residuos de pesticidas fueron solo detectados en las muestras de primavera, como la atrazina, simazina, procimidona, hexaclorobezeno, 4-4'TDE, 4-4'DDT, lindano, carbaril, deltametrina y difenoconazola, los cuales se presentaron en un rango del 2 al 4% en muy pocas muestras (representando $<2\%$ del total).

Al comparar, los colmenares estacionarios con los trashumantes, se observó que las muestras positivas a residuos de pesticidas fueron más alto en los migratorios (56%) que en las colonias estacionarias (44%) para muchos de los compuestos detectados.

15.10.2 Prevalencia regional

La detección de pesticidas en el polen almacenado fue raro (Tabla 36), siendo el fluvalinato el compuesto más comúnmente identificado (13%, IC_{95%} = 5,9-20,3). Ni fipronil, ni imidacloprida se detectaron en ninguna de las muestras analizadas.

Tabla 36. Pesticidas detectados en polen almacenado

Pesticidas	n	Prevalencia (%)	IC _{95%}	
			Inf	Sup
Bromopropilato	1	1.1	0.0	5.5
Clorpirifós	1	1.1	0.0	5.5
Fluvalinato	13	13.1	5.9	20.3
Clorfenvinfós	2	2.0	0.2	7.1

La presencia de pesticidas en polen fue anecdótica y no estuvo relacionada con la presencia de colmenas afectadas de PC.

15.11 Determinaciones palinológicas

15.11.1 Prevalencia nacional

Más del 47,8% de las muestras almacenadas de polen mostraron tipos diversos tipos de polen, correspondientes a vegetación silvestre y con polen no procedente de cultivos. En el restante 52,2% de las muestras se identificó polen de plantas cultivadas (principalmente en primavera) y en el 38,3% de las muestras de polen procedían de cultivos tipo *Eucaliptus*, *Prunus* t., *Citrus* y *Olea* spp. El polen de girasol se detectó solamente en un 10,4% de las muestras, aunque éste no fue el tipo de polen mayoritario en ninguna de las muestras. Además, el polen de *Medicago* t. fue evidente en 7,8% de las muestras y en las de cereales en un 9,5% (*Cerealia* y *Z. mays*), aunque este polen no fue el principal constituyente de las muestras analizadas.

15.11.2 Prevalencia regional

Diversidad de flora se detectó en forma de peine almacenan muestras de polen y los resultados palinológicos de muestras de polen muestran que un total de 76 tipos

de flora se han detectado en la cámara de cría, con el 94,3% (IC_{95%} = 88,6-98,3) clasificados como vegetación silvestre.

15.12 Asociaciones entre patógenos

15.12.1 Prevalencia nacional

Se aplicó un análisis de correlación parcial bivariada de *Spearman* para detectar posibles relaciones entre la presencia de distintos patógenos.

A pesar de que se encontraron asociaciones con significación estadística, hay que tener en cuenta que ninguna de las asociaciones presentó un coeficiente de correlación mayor de 0,07 (Tabla 37). El significado de estas correlaciones es que si bien efectivamente están asociadas, lo hacen con una magnitud muy baja.

Las únicas asociaciones moderadas o altas se encontraron, entre *N. ceranae* y la infección mixta de *Nosema* spp., y *N. apis* y la infección mixta.

Cabe destacar que entre *V. destructor* y *N. ceranae* se detectó una correlación inversa, como si una desplazara la otra. De todas formas, la asociación aunque es significativa, el índice de correlación es muy bajo.

Tabla 37. Asociación entre patógenos detectados en las muestras del estudio nacional

	<i>V. destructor</i>	<i>A. woodi</i>	<i>B. coeca</i>	<i>A. apis</i>	<i>P. larvae</i>	<i>M. plutonius</i>	<i>N. ceranae</i>	<i>N. apis</i>	Inf. Mixta (A+C)
<i>V. destructor</i>	1,00	0,061	-0,04	-0,01	-0,04	-0,01	-0,07	0,02	0,01
Correlación de Pearson									
Sig. (bilateral)		0,0069	0,087	0,6822	0,0737	0,7776	0,0038	0,476	0,6077
n	1957	1943	1957	1658	1657	1659	1938	1938	1938
<i>A. woodi</i>		1,00	0,05	-0,01	-0,02	-0,02	0,00	0,00	0,00
Correlación de Pearson									
Sig. (bilateral)			0,0285	0,5528	0,4105	0,3733	0,907	0,9956	0,9388
n		1943	1943	1646	1645	1647	1934	1934	1934
<i>B. coeca</i>			1,00	-0,01	-0,01	0,00	0,05	-0,02	-0,01
Correlación de Pearson									
Sig. (bilateral)				0,6236	0,6971	0,8842	0,0312	0,3444	0,5282
n			1957	1658	1657	1659	1938	1938	1938
<i>A. apis</i>				1,00	0,02	-0,01	0,03	-0,01	0,00
Correlación de Pearson									
Sig. (bilateral)					0,4086	0,6813	0,2855	0,7008	0,9761
n				1658	1657	1657	1641	1641	1641
<i>P. larvae</i>					1,00	0,07	-0,04	0,01	-0,02
Correlación de Pearson									
Sig. (bilateral)						0,0053	0,0751	0,8347	0,5024
n					1657	1657	1640	1640	1640
<i>M. plutonius</i>						1,00	0,01	-0,02	-0,01
Correlación de Pearson									
Sig. (bilateral)							0,5755	0,4395	0,5878
n						1659	1642	1642	1642
<i>N. ceranae</i>							1,00	0,02	0,26
Correlación de Pearson									
Sig. (bilateral)								0,4806	0,00
n							1938	1938	1938
<i>N. apis</i>								1,00	0,67
Correlación de Pearson									
Sig. (bilateral)									0,00
n								1938	1938
Inf. Mixta (A+C)									1,00
Correlación de Pearson									
Sig. (bilateral)									
n									1938

Las asociaciones moderadas se consideran desde un coeficiente de correlación de Pearson de 0,3.

15.12.2 Prevalencia regional

En el estudio regional se observó una correlación significativa entre la presencia de *V. destructor* en las abejas de interior y las de exterior (Pearson = 0,442, $p < 0,0001$), y entre las abejas de interior y de cría (Pearson = 0,282, $p < 0,01$). No se encontró correlación entre el uso correcto de los tratamientos de *Varroa* y la tasa de infestación de esta plaga. Curiosamente, existe una correlación negativa significativa entre el uso de tratamientos de *V. destructor* y la presencia de *A. woodi* (Pearson = -0,318, $p < 0,001$).

Por otro lado, se observó también una correlación entre la presencia de *V. destructor* en las abejas de exterior e interior y la presencia del VAD en las muestras de cría (Pearson = 0,273, $p < 0,01$ y Pearson = 0,310, $p < 0,01$, respectivamente). Además, la presencia de *V. destructor* en las muestras de cría también se correlacionó con la presencia de VRN en la cría (Pearson = 0,223, $p < 0,05$).

Finalmente, la presencia de *N. ceranae* y *N. apis* no se correlacionó con la presencia de cualquier otro agente patógeno.

15.13 Análisis de regresión en estudio regional

Todas las variables con poca variación en las respuestas se descartaron del modelo multivariado, y la distribución de la condición de PC de acuerdo a las diferentes variables incluidas en el estudio se muestra en las Tablas 38-40. Sólo una variable, la presencia de *N. ceranae*, difirió significativamente entre las muestras de las colonias de abejas no saludables frente las asintomáticos, lo que indica una posible relación con PC.

Las variables con un valor de $p < 0,3$ se incluyeron también en el modelo multivariado: el tamaño del colmenar, los más pequeños apiarios exhiben la menor prevalencia de PC; el uso correcto de los tratamientos de control de *Varroa*, los colmenares en los que se utiliza correctamente estos tratamientos tenían un menor porcentaje de PC; y la presencia de *A. woodi* y VK en las abejas adultas, los colmenares positivos a ambos patógenos tienen más posibilidad de sufrir PC.

Tabla 38. Distribución del estatus de PC de acuerdo a los patógenos detectados

Variable	Exposición	Exposición	PC sintomática		Asintomática		Test Fisher valor p
			n	%	n	%	
<i>A. woodi</i> ^a	AA Ext	Positivo	12	75	4	25	0,099
		Negativo	41	49,4	42	50,6	
VRN	AA Ext	Positivo	49	52,1	45	47,9	0,369
		Negativo	4	80,0	1	20,0	
	cría	Positivo	28	52,8	25	47,2	1,000
		Negativo	25	54,3	21	45,7	
VAD	AA Ext	Positivo	50	53,2	44	46,8	1,000
		Negativo	3	60,0	2	40,0	
	cría	Positivo	42	51,9	39	48,1	0,603
		Negativo	11	61,1	7	38,9	
VK	AA Ext	Positivo	5	100,0	0	0,0	0,059
		Negativo	48	51,1	46	48,9	
<i>N. apis</i>	AA Ext	Positivo	1	25,0	3	75	0,335
		Negativo	52	54,7	43	45,3	
<i>N. ceranae</i> ^a	AA Ext	Positivo	38	100	0	0,0	< 0,0001
		Negativo	15	24,6	46	75,4	
<i>P. larvae</i>	cría	Positivo	3	50,0	3	50,0	1,000
		Negativo	50	53,8	43	46,2	
VCS	AA Ext	Positivo	1	50,0	1	50,0	1,000
		Negativo	52	53,6	45	46,4	
	cría	Positivo	1	50,0	1	50,0	1,000
		Negativo	52	53,6	45	46,4	
<i>V. destructor</i>	AA Ext	Positivo	21	53,8	18	46,2	1,000
		Negativo	32	53,3	28	46,7	
	AA Int	Positivo	29	59,2	20	40,8	0,316
		Negativo	24	48,0	26	52,0	
	cría	Positivo	21	60,0	14	40,0	0,402
		Negativo	32	50,0	32	50,0	

AA Ext: Abejas adultas de exterior; AA Int: Abejas adultas de interior

^a Variables identificadas como significativamente asociadas ($p < 0.30$) por análisis univariado de factores de riesgo de PC.

La comparación de la tasa de infestación media de *Varroa* entre muestras sintomáticas y asintomáticas, tanto en abejas de interior [media-desviación estándar sintomáticas = 2,3-4,1 vs asintomáticos = 3,4-7,2, $p > 0,05$] como de exterior [media-desviación estándar sintomáticas = 0,9-2,3 vs asintomáticos = 1,4/2,6], no fue estadísticamente significativa. Por este motivo, la tasa de infestación media de *Varroa* no se incluyó en el modelo final.

Tabla 39. Distribución del estatus de PC de acuerdo a los pesticidas detectados en polen almacenado

Variable	Exposición	PC sintomática		Asintomática		Test Fisher valor <i>p</i>
		n	%	n	%	
Bromopropilato	positivo	0	0,0	1	100,0	0,465
	negativo	53	54,1	45	45,9	
Clorpirifós	positivo	1	100,0	0	0,0	1,000
	negativo	52	46,0	53,1	46,9	
Fluvalinato	positivo	8	61,5	5	38,5	0,568
	negativo	45	52,3	41	47,7	
Clorfenvinfós	positivo	1	50,0	1	50,0	1,000
	negativo	52	53,6	45,0	46,4	
Nº tratamientos/año	0	2	100	0	0,0	0,840
	1	27	54	23	46,0	
	2	24	51,1	23	48,9	
Tratamiento correcto ^a (dosis- duración/producto)	si	15	44,1	19	55,9	0,206
	no	38	58,5	27	41,5	

^a Variables identificadas como significativamente asociadas ($p < 0.30$) por análisis univariado de factores de riesgo de PC.

Tabla 40. Distribución del estatus de PC de acuerdo a las variables recogidas en la encuesta.

Variable	Exposición	PC sintomática		Asintomática		Test Fisher valor <i>p</i>
		n	%	n	%	
Características generales						
Tamaño colmenar ^a	0-15	9	39,1	14	60,9	0,252
	16-149	33	57,9	24	42,1	
	> 149	9	53,5	8	47,1	
Estudio palinológico	Vegetación silvestre	50	53,2	44	46,8	0,766
	Cultivos	3	60,0	2	40,0	
Tratamiento Varroa						
Apistan	si	41	56,2	32	43,8	0,493
	no	12	46,2	14	53,8	
Artesanal	si	4	66,7	2	33,3	0,683
	no	49	52,7	44	47,3	
Bayvarol	si	8	47,1	9	52,9	0,601
	no	45	54,9	37	37,1	
Nº tratamiento/año	0	2	100,0	0	0,0	0,840
	1	27	54,0	23	46,0	
	2	24	51,1	23	48,9	
Tratamiento correcto ^a (dosis-duración/producto)	yes	15	44,1	19	55,9	0,206
	no	38	58,5	27	41,5	

^a Variables identificadas como significativamente asociadas ($p < 0.30$) por análisis univariado de factores de riesgo de PC.

De las cinco variables incluidas inicialmente en el modelo multivariado, sólo la presencia de *N. ceranae* mantuvo la significación estadística. La introducción de las otras variables, una por una, no modifica la RP de *N. ceranae*, mientras que la RP de la

variable de reciente introducción disminuyó en significación y no aumentó la desviación. No se detectó ni efecto de confusión, ni interacción para ninguna variable. Por tanto, el único factor de riesgo para la presencia de PC fue la presencia de *N. ceranae* que aumenta cuatro veces el riesgo de aparición del evento (RP = 4,1, IC 95% = 2,6-6,3, $p < 0,0001$).

DISCUSIÓN



16 Estudio nacional

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. Lo más llamativo ha sido la ausencia de una sintomatología clara que pudiera orientar hacia cuál era el origen de este fenómeno y por lo tanto, resultaba extraordinariamente complicado aplicar medidas correctoras, ya que se desconocía la causa del mismo. 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. Si bien es cierto que en más de un medio de comunicación se 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) (Genersh, 2010). Los alimentos primarios (p. ej. trigo, maíz, arroz o patata) son polinizados a través del aire o auto-polinizados, lo que significa que su producción no aumenta con los polinizadores animales (Richards, 2001; Ghazoul 2005; Klein y col., 2007). A pesar de todo, la producción de muchas frutas, vegetales y cultivos que contribuyen a una dieta humana saludable dependen de la polinización animal. Por eso, aunque no está demostrada científicamente la afirmación anterior, la dieta humana se vería considerablemente empobrecida en el caso de que la población de abejas disminuyese o desapareciese (Steffan-Dewenter y col., 2005) y el equilibrio de muchos ecosistemas se vería seriamente amenazado. Hemos de tener presente que son muchas las zonas del planeta en la que las abejas son prácticamente el único polinizador que pervive al deterioro medioambiental, y por tanto, muchas de las plantas entomófilas de estas zonas podrían verse seriamente amenazadas.

Debido a que 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 (Genersh, 2010), nuestro equipo se planteó un estudio epidemiológico cuyo objetivo principal era identificar aquellos agentes nosógenos relacionados con las pérdidas de colonias de abejas melíferas (PC) en España. Para ello se desarrollaron nuevas técnicas moleculares de diagnóstico mucho más fiables, rentables, rápidas y sensibles que las clásicas, capaces de detectar uno (PCR) o varios agentes patógenos (PCR múltiple) en mono o co-infecciones aun cuando la enfermedad no manifieste sintomatología clínica. Asimismo se hicieron una serie de adaptaciones en los pasos previos a la amplificación como el proceso de maceración de las abejas, la extracción de los ácidos nucleicos (ADN y/o ARN) y la electroforesis capilar del producto amplificado, que permitieron la agilización de los análisis de un número elevado de muestras.

Tradicionalmente el diagnóstico de los agentes parasitarios que afectan a las abejas melíferas se ha limitado al examen macroscópico (*V. destructor* y *B. coeca*; OIE, 2008), a la disección de la abeja sospechosa de padecer la enfermedad (*A. woodi*; Ritter, 1996; Wilson y col., 1997) y a la observación microscópica de las esporas (*N. apis* y *N. ceranae*; OIE, 2008). Asimismo, la detección habitual de los agentes nosógenos de origen infeccioso (*A. apis*, *P. larvae* y *M. plutonius*), se hacía fundamentalmente en base a la detección de los signos clínicos de la enfermedad que producen en las larvas de abeja en diferentes estadios de desarrollo, seguido del aislamiento de la bacteria u hongo, en medios específicos (OIE, 2004, 2008). 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 desarrolladas en este trabajo somos capaces de 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 solo 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 nuestro país con un número tan elevado de muestras (abejas adultas, cría, polen y miel) con el fin de evaluar la presencia de los principales agentes nosógenos tanto de tipo biótico (agentes parasitarios e infecciosos) como biótico (pesticidas) que afectan a la cabaña apícola de nuestro país y aporta los primeros datos fiables sobre la prevalencia real de los mismos y su papel en el fenómeno de despoblamiento y muerte de colonias de abejas que en España viene produciéndose desde el otoño del año 2004 y que afectó a todo el territorio nacional en el momento de realizar el presente estudio. Con este fin se realizó un estudio transversal a nivel nacional durante los años 2006 y 2007 en el que se muestreó un número significativo de explotaciones apícolas de nuestro país. Si bien el nivel de participación fue satisfactorio, la falta de seguridad de que la colmena inicialmente identificada como “centinela” fuese la misma que en el resto de muestreos hizo que el objetivo inicial del proyecto de hacer un seguimiento de cada colonia en los cuatro muestreos no pudiese realizarse y por ende, los muestreos se consideraron independientes entre sí, dando así una fotografía de la situación en cada uno de los cuatro momentos. Además la ausencia de la respuesta a la pregunta de si habían sufrido despoblamiento de colonias el año anterior al muestreo hizo imposible el establecimiento de relaciones entre este el evento PC y la detección de cada uno de los agentes nosógenos. Posteriormente, para poder evaluar correctamente la relación entre los nosógenos y PC, planteamos un estudio regional, en el que se encuestó personalmente a los apicultores, para obtener una respuesta fiable acerca de si las colonias habían sufrido despoblamiento y PC, pudiéndose entonces realizar correctamente la correlación que se pretendió en el primer estudio nacional.

La mayoría de los apicultores que colaboraron en el estudio nacional eran profesionales (46,4%), lo que implica la gestión de explotaciones con un número superior a 150 colmenas. Los datos recogidos en nuestra encuesta concuerdan con los publicados por el REGA 01/05/2011 en el cual se informa que los apicultores profesionales se concentran en las comunidades del sur de España manejando fundamentalmente colmenas Layens. Este tipo de colmenas facilita los movimientos trashumantes con el objetivo de aprovechar las distintas floraciones de la Península Ibérica y obtener una mayor producción de miel. De hecho, la trashumancia es una práctica realizada por el 44,7% de los apicultores encuestados, concentrándose en las comunidades anteriormente mencionadas y el girasol, el cultivo más aprovechado (45,7%) No obstante, el porcentaje de apicultores no profesionales también es amplio (34,6%) destacando en las comunidades del norte de España.

En cuanto a los agentes nosógenos 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 (RD 617/2007; OIE, 2012).

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 (Çakmak y col., 2003; Al-Ghzawi y col., 2009), coinciden con el alto grado de parasitación de las abejas melíferas por *V. destructor*. Las altas prevalencias detectadas en Jordania (100%, Al-Ghzawi y col., 2009) y Turquía (90%, Çakmak y col., 2003), 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 (Finley y col., 1996).

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 verano las varroas adultas que se encuentran sobre la cría empiezan a poner huevos y construir su población (Ritter, 1981) aprovechando la cría de abejas de del final de verano que será la población de la colonia durante la invernada. Además, el mayor número de cría y abejas pecoreadoras en la época estival, conlleva inevitablemente a la existencia de pillaje entre colmenas, fenómeno que se ha descrito como uno de los factores principales de diseminación del ácaro entre colmenares (Nazzi y col., 1995).

Es llamativo que la mayor prevalencia de *Varroa* se detecte en el otoño, momento en que los apicultores realizan los tratamientos acaricidas contra este

parásito como indicamos con anterioridad, lo que puede indicar la necesidad de realizar otro tratamiento la siguiente primavera.

Aunque nuestros resultados indican una tendencia negativa entre la distribución de *Varroa* y el tamaño de la explotación, esta observación podría justificarse por la alta capacidad de diseminación del agente nosógeno en la explotación o por la baja representatividad de la muestra recogida ya que en las explotaciones más grandes, con una sola colmena muestreada, la probabilidad de detectar el patógeno se ve reducida.

Si bien la trashumancia siempre se ha considerado el factor determinante de la rápida distribución de *Varroa* en los países mediterráneos (Al-Ghzawi y col., 2009), nuestros resultados están en desacuerdo con este hecho siendo la prevalencia de *V. destructor* mayor en aquellas explotaciones en las que no se realiza trashumancia y en las que se utilizan colmenas de tipo perfección. Una posible explicación es que la transhumancia actué en las fases iniciales de colonización de un territorio pero no tenga el mismo papel difusor una vez distribuido por toda la zona de actuación.

Por otro lado, éste también es el primer trabajo fuera de Asia (Zhou y col., 2004 en China; Anderson y Trueman, 2000 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 hembras de *Varroa* analizadas, pertenecieron al haplotipo coreano, incluyendo muestras de las Islas Baleares y Canarias, lo que confirma la expansión mundial del haplotipo coreano como sugirieron en su estudio Anderson y Trueman (2000) y también la distribución cuasi-clonal de los tipos de *Varroa* debido a los eventos en cuello de botella durante el proceso de expansión (Solignac y col., 2003). Pese a que recientemente se ha sugerido (Navajas y col., 2010) que los actuales haplotipos de *V. destructor* son en realidad, dos haplogrupos con dos haplotipos a su vez cada uno (J1-5 y J1-6; K1-2 y K1-5), todavía no se ha aclarado si todos o solamente dos de ellos (J1-5 y K1-2) son capaces de reproducirse en *A. mellifera*. Por eso, y a pesar de que en este estudio no se realizaron análisis de microsatélites, los datos obtenidos apoyan la falta de variación molecular de la población de *Varroa* que infesta a la abeja europea. Además, dada la ausencia de haplotipo japonés, se puede considerar que la población de *Varroa* que infesta a las colonias de *A. m. iberienseis* en España, es haplotipo coreano puro.

A pesar de que hoy en día los apicultores usan un amplio rango de sustancias químicas para conservar las poblaciones de *V. destructor* bajo control y que reciben ayudas económicas a través del Programa Nacional Apícola para combatir la varroosis (RD 608/2006), sólo el 50% de los participantes en este estudio, reconoce haber utilizado los tratamientos veterinarios de un modo correcto (dosis/tiempo). Si además, se tiene en cuenta que en 2006 se vendieron medicamentos veterinarios para tratar el 57,1% de las colonias de abejas registradas ese año y en 2007, el 57,7% (<http://www.veterindustria.com/>), podemos concluir que solo se trataron

correctamente algo menos del 29% del censo apícola español en los dos años que duró el estudio. Esta realidad podría ser la explicación de las mayores prevalencias de *Varroa* detectadas durante el otoño, y pone de manifiesto la necesidad de mejorar la formación y concienciación de los apicultores sobre el correcto uso de los medicamentos veterinarios. Asimismo, recientemente se ha demostrado que la parasitación por *N. ceranae* influye de un modo negativo en la efectividad de medicamentos como Apivar® (cuyo principio activo es el fluvalinato) (Botías y col., 2011c). También es importante destacar que un bajo porcentaje de apicultores (<5%) declararon haber empleado productos no autorizados (p. ej. Supona®). Las consecuencias de estos hechos en relación a los efectos que pueden tener sobre las abejas (subletales o a largo plazo) no se han determinado convenientemente todavía (M'Diaye y Bounias, 1991). Sin embargo, el uso inadecuado de los tratamientos incrementa la aparición de residuos en la miel (principalmente fluvalinato) ya que el objetivo del 92,8% de las explotaciones aquí muestreadas es la producción de este producto natural. Por otro lado, se pueden generar resistencias en los parásitos como ya ha ocurrido en otros países (Milani, 1999; Mathieu y Faucon, 2000; Elzen y col., 2000; Spreafico y col., 2001; Rodríguez-Dehaibes y col., 2005). Esta circunstancia contribuye a la reaparición del ácaro y al aumento o mantenimiento de las altas prevalencias.

De hecho, *V. 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 (Faucon y Chauzat, 2008; Oldroyd, 2007; vanEngelsdorp y col., 2009; Guzmán-Novoa y col., 2010). Nguyen y col. (2009) 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 (Sammataro y col., 2000), causando otra de las enfermedades reguladas por la UE, la acarapisosis (RD 617/2007). 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, y su prevalencia se consideraba muy baja a pesar de la escasez de estudios sobre su incidencia real en la apicultura europea. Una de las principales causas de esta ausencia de datos, es la falta de rapidez de las técnicas de diagnóstico clásicas y la escasez de nuevos métodos moleculares.

Los cebadores descritos por Evans y col. (2007), por Kojima y col. (2011) y los diseñados en este trabajo coinciden perfectamente con las secuencias del COI de los individuos pertenecientes al género *Acarapis* (*A. woodi*, *A. dorsalis* y *A. externus*)

disponibles en *GenBank*. Esto podría comprometer tanto el estudio previo como nuestro propio diseño ya que no se puede diferenciar *A. woodi* de las otras dos especies, lo que podría dirigirnos a falsas conclusiones en los diagnósticos.

Precisamente por esto, uno de los retos al que nos enfrentamos era distinguir molecularmente *A. woodi* de *A. dorsalis* y *A. externus*, especies que aunque también pueden encontrarse sobre las abejas, no son patógenas (OIE, 2008). En Enero de 2012, había cinco secuencias del COI disponibles de *A. woodi* en el *GenBank* (EU190886.1, GQ916565.1, FJ603296.1, FJ603295.1, FJ603294.1), cinco de *A. externus* (GQ916566.1; FJ603293.1; HQ243440.1 to HQ243442.1) y nueve de *A. dorsalis* (GQ916568.1, GQ916567.1, HQ243433.1 to HQ243439.1). Pero además, curiosamente, había dos secuencias de *A. woodi* (HQ162656.1, HQ162657.1), una de *A. dorsalis* (HQ162656.1) y cuatro de *A. externus* (HQ162659.1 a HQ162662.1), todas ellas del COI, que no se solapaban con las anteriores.

En nuestro caso, la secuenciación de las muestras positivas obtenidas en la reacción de PCR, confirmó la infección por *A. woodi* y los resultados fueron idénticos a todas las secuencias del organismos depositadas en *GenBank*. Esta especie no mostró polimorfismos ($K_s = 0,0$) siendo además la única que ha sido clara y correctamente identificada por varios autores (Evans y col., 2007; Delmiglio y col., sin publicar). Por el contrario, las distancias genéticas entre secuencias atribuidas a *A. externus* (GQ916566.1- GQ916568.1 y FJ603293.1, Delmiglio y col., sin publicar) y *A. dorsalis* (HQ243433.1-HQ243442.1, Ward y col., sin publicar) eran mayores que las observadas entre las secuencias asignadas a diferentes especies. Este hecho revela que estas secuencias depositadas en *GenBank*, no pertenecen a las mismas especies, y que probablemente reflejen una secuencia consenso obtenida a partir de ADN de una o varias de ellas, o se debe a una mala clasificación morfológica de los ácaros, por lo que debería aclararse y asignar correctamente estas secuencias a las especies reales ya que casi con seguridad pertenecen a cuatro linajes diferentes.

El método propuesto en este trabajo además de ser rápido y sensible, puede llevarse a cabo en laboratorios que carecen de costosos equipos. Asimismo, permite identificar en cualquier fase de desarrollo del ácaro (huevos, larvas o adultos) siendo adecuado para hacer estudios epidemiológicos a gran escala con resultados fiables. El corto tamaño del fragmento amplificado permite la detección del *A. woodi* incluso si las muestras no están perfectamente conservadas (ADN degradado) y el límite de detección de nuestra técnica está cerca de los obtenidos por Evans y col. (2007) y Kojima y col. (2011).

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 climatológicamente y teóricamente no tan óptimas para el desarrollo de *A. woodi*.

Estos datos son muy diferentes a los obtenidos en estudios anteriores (Çakmak y col., 2003; Al-Ghzawi y col., 2009). La falta de detección de *A. woodi* en Turquía (Çakmak y col., 2003) y la baja prevalencia (2,7%, n=112) detectada en Jordania (Al-Ghzawi y col., 2009), 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 (2004) 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 periodos secos y calurosos (verano) como ya habían descrito Ruijter y Eijnde (1987), 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 (Pettis y Wilson, 1996).

Bacandritsos y Saitanis (2004) sugieren también, que la práctica de la trashumancia de las colmenas en Grecia, estimula el pecoreo prolongado de las abejas melíferas, lo que favorece que las abejas infestadas (las más viejas) se separen de las más susceptibles (jóvenes) y podría explicar, en último término, el bajo nivel de infestación de ácaros traqueales en ese país. Una hipótesis que concuerda con los datos obtenidos en nuestro estudio, los cuales revelan unas prevalencias ligeramente mayores cuando no se produce trashumancia.

El parasitismo de las abejas por ácaros traqueales continua produciendo problemas a los apicultores (Villa y Rinderer, 2008). Frecuentemente, colonias susceptibles se debilitan o mueren como consecuencia de una alta población de ácaros traqueales (Otis y Scott-Dupree, 1992; De Guzmán y col., 2006). De hecho, se ha asociado el aumento de la mortalidad invernal con altos niveles de infestación de ácaros traqueales en otoño (Furgala y col., 1989).

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 los parásitos están todavía presentes pero aparentemente no se detectan por los métodos de diagnóstico clásicos basados en la disección individual de la abeja y la observación de las tráqueas bajo microscopio óptico. 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. Ante la ausencia total de estudios fiables sobre la eficacia de los acaricidas habitualmente empleados en apicultura, parece probable que éstos sean lo suficientemente eficaces como para evitar los brotes clínicos ya que la prevalencia detectada en este estudio nunca excedió el 30%, considerado el nivel al cual se produce la pérdida de la colonia (Bailey, 1981).

Por lo tanto, no se puede subestimar la presencia de *A. woodi* como posible cofactor en el problema de las pérdidas de colonias, especialmente cuando el porcentaje de abejas parasitadas es alto (Villa, comunicación personal). De hecho, Downey y Wintson (2001) describieron que colonias parasitadas por *V. destructor* y *A. woodi* tienen una mortalidad considerablemente mayor durante los meses de invierno que aquellas colonias con una o ninguna especie de ácaro.

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*, claramente representado tanto por el número de proyectos relacionados en su investigación como por la escasez de publicación de nuevos datos. 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 en la cabaña apícola, las nosemosis son también en la actualidad enfermedades de declaración a la UE (RD 617/2007; OIE, 2012). Este hecho hace imprescindible un diagnóstico diferencial entre los dos agentes nosógenos, *N. apis* y *N. ceranae*, responsables de patologías distintas, nosemosis tipo A y tipo C respectivamente (COLOSS workshop, 2009). La similar morfología de las esporas de ambas especies de microsporidios, apenas distinguibles por microscopía óptica, obligó a la búsqueda de métodos de diagnóstico más específicos.

De hecho, nuestro equipo desarrolló el método molecular actualmente recomendado por la OIE (2008) para el diagnóstico de las nosemosis (Martín-Hernández y col., 2007). Se trata de una PCR doble que proporciona una mejora significativa a la técnica de PCR individual ya que incorpora dos parejas de cebadores (321-APIS y 218-MITOC) que amplifican simultáneamente, la región SSU del gen 16S del ARNr de los dos microsporidios (*N. apis* y *N. ceranae*).

A través de este estudio, se consiguió dar un paso más en el perfeccionamiento de la técnica de Martín-Hernández y col. (2007) al incluir una secuencia del gen COI de *Apis* spp. como control interno de la PCR. La incorporación de este control interno proporciona un sistema para validar las muestras negativas. De este modo, se puede distinguir entre los resultados negativos y las reacciones afectadas por la presencia de inhibidores de la PCR o un fallo químico y/o instrumental. Además, este sistema es capaz de dar un diagnóstico laboratorial fiable al introducir controles de calidad en los análisis (recomendados por los servicios de acreditación) y si el control interno no amplifica, se pueden tomar medidas para solucionar los problemas de la PCR.

El diseño de PCR múltiple y la optimización de la técnica son un reto mayor que el diseño simple de parejas de cebadores para PCR individual. Esto se debe a que el

anillamiento múltiple de cebadores ocurre únicamente si las condiciones de anillamiento son las mismas, sin interferencias entre ellos. Debido a que la compatibilidad de los cebadores es la clave del éxito de la PCR múltiple, el cuidadoso diseño de los mismos y el adecuado control de las condiciones de la reacción, son esenciales para asegurar que los cebadores funcionen bajo condiciones uniformes en la PCR y no interactúan desfavorablemente entre ellos.

Un estudio reciente llevado a cabo por Erler y col. (2011) sugiere la baja sensibilidad y especificidad usando los cebadores 218MITOC en PCR cuantitativa (q-PCR). Los cambios en la sensibilidad probablemente se deben a la diferencia en la eficiencia del método de extracción del ADN así como a la diferente metodología empleada, ya que los cebadores 218MITOC se diseñaron inicialmente para PCR convencional y no para q-PCR (optimizados para 61,8°C por Martín-Hernández y col., 2007 vs. los 58°C usados por Erler y col., 2011). Por otro lado, en relación a la especificidad de los cebadores 218MITOC, nuestros resultados están en desacuerdo con ellos ya que: (i) la especificidad de los cebadores 218MITOC se confirmó mediante secuenciación de los productos de PCR y las secuencias se emparejaron siempre con las de *N. ceranae* y nunca con las *N. apis* (Martín-Hernández y col., 2007); (ii) hay varias secuencias disponibles en *GenBank* obtenidas por diferentes equipos de investigación después de secuenciar los productos de PCR usando los cebadores 218MITOC y todos ellos se unieron única y exclusivamente con *N. ceranae* (número de acceso: JF276831.1; JF431546.1; JF431547.1; HM859896.1; HM859897.1; HM859898.1; HM859899.1; GU045468.2; GU045466.2; GU045467.2; GU205784.2; GU254027.2; FJ227957.1; FJ415326.1; FJ425736.1; FJ789801.1; FJ789800.1); (iii) si los cebadores 218MITOC amplificasen también *N. apis*, no se podría detectar en PCR doble y/o triple la infección única por este microsporidio ya que siempre se vería una doble banda (una correspondiente a los cebadores 321APIS y la otra a los 218MITOC). Sin embargo, este método (los tres pares de cebadores combinados) se ha utilizado ampliamente (hasta ahora más de 15.000 muestras analizadas en 5 años; datos no mostrados). Durante este tiempo, se han detectado muchas muestras de abejas infectadas por *N. apis* y nunca se ha observado un anillamiento inespecífico. Asimismo, la ausencia de secuenciación de los productos de PCR en el trabajo de Erler y col. (2011), no permite excluir que la falta de especificidad se debiese a algún tipo de contaminación durante el procedimiento.

La alta plasticidad de los cebadores aquí diseñados (alto rango de temperaturas de anillamiento y sensibilidad), los hace muy útiles para usarlos como control interno cuando se trabaja en PCR para la detección de diferentes agentes patógenos de las abejas.

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 50% (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 (Chauzat y col., 2007; vanEngelsdorp y col., 2009; Traver y Fell, 2011). Por el contrario, la detección de *N. apis* fue menor, presentándose alrededor del 20% de todas las muestras analizadas tal como se había descrito anteriormente (Pajuelo y Fernández Arroyo, 1979; Orantes y García, 1997). 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 (Martín-Hernández y col., 2007), aunque esta situación no es universal y estudios realizados en Alemania (Gisder y col., 2010) 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 (Chauzat y col., 2007; vanEngelsdorp y col., 2009; Bacandritsos y col., 2010; Chen y Huang, 2010; Tlak Gajger y col., 2010; Traver y Fell, 2011), 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 (Giersch y col., 2009; Gisder y col., 2010; Whitaker y col., 2010; Yoshiyama y Kimura, 2011). Esto podría ser debido a la reciente introducción de *N. ceranae* en el país en algún caso (Chen y Huang, 2010), a las diferentes condiciones climáticas (Giersch y col., 2009; Gisder y col., 2010) o al manejo de las abejas, así como a las diferencias en la patogenicidad del haplotipo (Williams y col., 2010), 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 (clasificadas como regiones Mediterráneas por Rivas-Martínez, 1987) 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*, Jara y col., 2012) 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* (Paxton y col., 2007; Klee y col., 2007; Chen y col., 2008; Giersch y col., 2009; Traver y col., 2011). Sin embargo, nuestros datos sugieren que la situación de *N. apis* en España es endémica con una prevalencia

esperable (Pajuelo y Fernández Arroyo, 1979; Orantes y García, 1997) 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% (Fries y col., 1996). 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 (Rosenkranz y col., 2010). No obstante, deben realizarse otros estudios que incluyan regiones más amplias del mundo que confirmen este patrón diferente de la distribución de *Nosema* spp.

En relación a *Braula coeca*, nuestros datos indican que la presencia de este díptero en las colonias de abejas melíferas españolas es un hecho puntual. Sólo se detectó en el otoño del año 2006 en una de las islas del Archipiélago Canario (La Palma), lo que nos permite afirmar que la Península Ibérica está libre de *B. coeca*. Esto puede ser debido a que la aplicación regular de los acaricidas empleados en los tratamientos frente a *V. destructor* favorece indirectamente el control de esta mosca.

Para la detección de los principales agentes nosógenos de origen infeccioso de la cría de abeja: *P. larvae*, *M. plutonius* y *A. apis*, se desarrolló una PCR múltiple que permite, en una única reacción, detectar los tres agentes etiológicos de la loque americana, la loque europea y la ascosferosis, respectivamente. Las dos primeras patologías, de origen bacteriano, están recogidas dentro del RD 617/2007 y la OIE (2012). Sin embargo, la ascosferosis, de origen fúngico, pese a que produce grandes pérdidas económicas, especialmente en combinación con otros agentes nosógenos como *N. apis* (Aydin y col., 2006) no está sometida a ningún tipo de regulación nacional ni europea.

Los ensayos de PCR múltiple realizados, confirmaron la idoneidad de nuestro diseño. Los cebadores específicos para *A. apis* y *M. plutonius* desarrollados en este trabajo junto con los diseñados por Govan y col. (1999), amplifican con éxito fragmentos de diferente tamaño (136, 281, 973 pb, respectivamente), fácilmente discriminables en un gel de agarosa. Asimismo, se confirmó la especificidad frente a especies bacterianas que habitualmente se encuentran en los colmenares (*P. alvei* y *B. laterosporus*) y especialmente se asocian al desarrollo de la loque europea (Alippi, 1991).

Nuestra técnica supera los inconvenientes de otros métodos moleculares descritos con anterioridad, los cuales precisaban el aislamiento y cultivo puro de *A. apis* (Murray y col., 2005; James y Skinner, 2005; Song y col., 2009) o *P. larvae* (Dobbelaere y col., 2001; Lauro y col., 2003), o la incubación previa de larvas enfermas por loque americana (Piccini y col., 2002) o europea (Govan y col., 1998). Asimismo, los

resultados obtenidos por algunas técnicas (Djordjevic y col., 1998) se consideran poco fiables debido a la posibilidad de generar falsos positivos.

En cuanto al estudio nacional, los resultados obtenidos indican una baja prevalencia para los agentes nosógenos 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 aunque es la primera detección de *M. plutonius* en nuestro país, 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%, Yoshiyama y Kimura, 2011), 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 (Flores y col., 1996; Borum y Ulgen, 2008) e incluso se ha demostrado que el calentamiento artificial de la colmena en primavera, disminuía la incidencia de la enfermedad (Pederson, 1976).

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 (Arostein y Murray, 2010) 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 (Genersh, 2010). 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 (Hansen y Brødsgaard, 1999; Genersh, 2010), 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.

En cuanto a la distribución de *P. larvae* en función del tipo de explotación, la prevalencia es significativamente más elevada en las explotaciones de autoconsumo. Este hecho, al igual que sucedía con *V. destructor*, se puede deber a la alta capacidad de dispersión del agente dentro del colmenar o a la limitada representatividad de la muestra. Asimismo, *P. larvae* está más distribuido en colmenas de tipo perfección y cuando no se realiza, lo que resulta sorprendente dado a la alta capacidad de contagio de esta patología (Hansen y Brødsgaard, 1999).

Como se ha dicho anteriormente, si bien esta es la primera detección oficial de *M. plutonius* en España, la prevalencia de esta bacteria se limita a hechos puntuales

localizados en las zonas más suaves (pisos meso- y supramediterráneo según Rivas-Martínez, 1987), con posibilidad de heladas durante una gran parte del año (6 a 10 meses al año), aunque sin significación estadística.

Diversos estudios realizados en otros países europeos como Suiza (Forsgren y col., 2005; Roetschi y col., 2008) y Gran Bretaña (Thompson y Brow, 2001; Wilkins y col., 2007; Budge y col., 2010) 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.

Hasta ahora hemos expuesto la detección de patógenos, sin embargo un 18,2% y un 14,7% de las muestras fueron positivas a ascosferosis y a loque americana respectivamente, en base a los signos clínicos y al cultivo microbiológico, aunque resultaron negativas a la detección del ADN por PCR. Esto probablemente sea debido a la elección de las larvas dentro de la sección de cuadro de cría enviado ya que en la mayoría de los casos, la cantidad recibida era muy pequeña. Este hallazgo expone la necesidad de tomar una muestra más representativa, no sólo dentro del colmenar si no también dentro del cuadro. Hemos verificado casos de colonias con severos síntomas de enfermedad, en los que la bacteria no está presente en todas las larvas como ya se demostró en el caso de *M. plutonius* (Forsgren y col., 2005) e incluso de otras patologías como la nosemosis tipo C (Botías y col., 2011b).

Por otro lado, se ha comprobado la presencia de *A. apis*, *P. larvae* y *M. plutonius* en las muestras de abejas adultas, incluso en el caso de las bacterias fue dos veces mayor que en la cría, lo que pone de manifiesto que aún en ausencia de manifestaciones clínicas de enfermedad, las obreras actúan como portadoras de los agentes dentro de la colonia (Belloy y col., 2007) e incluso entre colonias y colmenares (Roetschi y col., 2008). De hecho, se ha demostrado que las obreras, particularmente las de interior de la colmena, son más apropiadas que la cría para estudios epidemiológicos tanto de loque americana (Lindström y Fries, 2005) como de loque europea (Roetschi y col., 2008) en los que se demostró que las obreras de interior, en concreto aquellas que están sobre la cría, contenían 20 veces más carga bacteriana que aquellas que volaban en la piquera ya que están en contacto con la cría infectada y realizan labores de limpieza de las celdillas (Roetschi y col., 2008).

Asimismo, la detección de patógenos infecciosos en las muestras de cría sin síntomas de enfermedad demuestra claramente que éstos no solo están presentes en larvas con signos clínicos (Forsgren y col., 2005; Belloy y col., 2007). Se pueden detectar en pupas aparentemente saludables, apoyando la teoría de que larvas infectadas pueden sobrevivir, pupar y emerger como adultas mientras son portadoras de bacterias (Bailey y Ball, 1991). Además, la salud de la cría está directamente relacionada con el buen comportamiento higiénico de las obreras (Waite y col., 2003). 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 (Antúnez y col., 2009) que podría ser aprovechada por este tipo de agentes infecciosos.

Finalmente, en relación a los pesticidas, los resultados demuestran que en España, en los años 2006 y 2007, la aparición de este tipo de residuos en polen almacenado fue frecuente en las colonias, detectándose en el 42% de las muestras de primavera y el 31% de las muestras de otoño. Estos porcentajes son más bajos de lo esperado teniendo en cuenta que los pesticidas se han sugerido como la causa principal de la muerte de las abejas, especialmente si consideramos que el fluvalinato fue el pesticida más prevalente y es un compuesto químico clasificado como tóxico para las abejas.

Como se ha descrito a lo largo de este apartado, el fenómeno mundial de las pérdidas de colonias de abejas está probablemente provocado por diferentes causas que producen síntomas similares a través de acciones sinérgicas entre diferentes agentes nosógenos. 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 (Faucon y col., 2005; Chauzat y col., 2006; Nguyen y col., 2009). Se ha propuesto que las abejas entran en contacto con estos pesticidas a través del polen o néctar que consumen y consecuentemente, el polen almacenado podría ser una fuente crónica de tales toxinas (Faucon y col., 2005; Chauzat y col., 2006). La intoxicación de las abejas por estos pesticidas ocurriría principalmente en invierno ya que el polen almacenado es prácticamente la única fuente de proteína que las abejas consumen durante esta estación. Nuestros resultados indican que los acaricidas aplicados en los tratamientos para varroosis son los compuestos más frecuentemente detectados, destacando entre ellos el fluvalinato y el clorfenvinfós.

Como se ha comentado anteriormente, *V. destructor* es uno de los patógenos más importantes de las abejas (Anderson y Trueman, 2000) 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 (Boecking y Generesch, 2008; Rosenkranz y col., 2010). 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®). El que el fluvalinato y el clorfenvinfós sean los pesticidas más comúnmente encontrados es probablemente consecuencia del uso de estos acaricidas en fórmulas caseras para controlar *Varroa*.

Los pesticidas organofosforados como el clorfenvinfós se han detectado en productos apícolas en distintos lugares del mundo. Este pesticida inhibe la actividad de la acetil colinesterasa en el sistema nervioso central y periférico de los mamíferos (Savolaninen, 2001, Vidyasagar y col., 2004) y es considerado altamente tóxico para las abejas (Dauterman y O'Brien, 1964, Bendahou y col., 1997), por eso no se debe utilizar como acaricida para las abejas, ya que por otra parte, se trata de un tratamiento prohibido en esta especie. En España desde 2007, los medicamentos veterinarios cuyas materias activas son amitraz, fluvalinato, flumetrina, timol, ácido oxálico y cumafós, están autorizadas.

Los datos obtenidos relativos a la presencia de pesticidas en colonias de abejas están de acuerdo con los datos publicados por otros autores (Chauzat y col., 2006, 2009; Chauzat y Faucon, 2007; Belayiannis y Belayiannis, 2008) aunque el número de muestras contaminadas es más bajo que el observado en un reciente estudio realizado en Norteamérica (Mullin y col., 2010), en el que se comprobó que las fórmulas químicas caseras introducidas por los apicultores para el control de la varroosis eran a menudo las principales contaminantes de la colmena. Esta práctica está asociada con un alto riesgo en el desarrollo de poblaciones de ácaros resistente a drogas y con la contaminación de los productos apícolas (Wallner, 1999) también como representa un riesgo real para la seguridad de las abejas.

La toxicidad del fipronil en las abejas a una dosis subletal se ha demostrado en estudios de laboratorio pero no en condiciones de campo (El Hassani y col., 2005). Asimismo, en España su uso para girasol y otros cultivos se ha autorizado desde 2002, por lo que su aplicación a las semillas de girasol es reciente y limitada a áreas específicas en el centro y sur de España, explicando su detección en un pequeño número de muestras.

Por otro lado, en ninguna de las muestras analizadas se detectó imidacloprida. Este pesticida está autorizado en España para tratar cultivos de maíz, girasol, árboles frutales y cultivos de vegetales y a pesar de que existe una gran preocupación sobre su implicación en la desaparición de las abejas, varios (Chauzat y col., 2009; Nguyen y col., 2009) han demostrado la falta de asociación entre la aparición de la imidacloprida en polen y la mortalidad de la colonias. Además, el polen de maíz o girasol detectado en este trabajo fue del 9,4% y 10,4% respectivamente y nunca como el componente principal. Con estos resultados, podemos afirmar que en caso de que pesticidas como el fipronil o la imidacloprida, pudiesen producir problemas de intoxicación en colonias de abejas, serían eventos relativamente aislados y no un problema extendido en todo el país. Otros cultivos como el *Eucalyptus*, *Prunus t.*, *Citrus* y *Olea*, podrían ser una fuente de imidacloprida en polen almacenado y consecuentemente, fuente de toxinas para las abejas. Sin embargo, los resultados sugieren que estos cultivos no presentan un riesgo real como fuente de toxinas para las abejas bajo condiciones de campo en España.

En relación a la presencia de organoclorados, es de destacar que el lindano, dieldrin, hexaclorobenceno, β -endosulfán y los metabolitos del DDT estaban presentes en varias muestras y algunas de ellas en alta concentración. Es significativa la presencia de compuestos organofosforados, como el malatión que aparece en algunas muestras y el clorpirifós, considerado altamente tóxico para las abejas. La presencia de algunos de estos compuestos podrían explicar, en ciertos casos, la alta desaparición de abejas si hay una presencia simultánea de agentes patógenos (Alaux y col., 2010).

Nuestros resultados demuestran que la situación en España es bastante similar a las descritas en otros estudios (Chauzat y col., 2009), con la salvedad en la falta de residuos de imidacloprida.

En resumen, mientras que 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 (Suchail y col., 2000), nuevas enfermedades (Genersh y col., 2010; Higes y col., 2008; vanEngelsdorp y col., 2009; vanEngelsdorp y Meixner, 2010), 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 (Le Conte y Navajas, 2008). 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 nosógenos 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 (Martín-Hernández y col., 2007; Klee y col., 2007; Cornman y col., 2009) además de ser el agente etiológico de la enfermedad emergente de *A. mellifera*, Nosemosis tipo C (COLOSS workshop 2009, Higes y col., 2010a). Los datos obtenidos en nuestro estudio nos permiten afirmar que *N. ceranae* es un patógeno que actúa a corto plazo en los individuos de la colonia (Higes y col., 2007; Paxton y col., 2007; Chen y col., 2009) y a largo plazo para el conjunto de la colonia (Higes y col., 2008a, 2009a). 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 nosógenos, asociados a otros de menor importancia como *N. apis* y *A. woodi*, podrían aprovechar la deficiencia inmunitaria provocada por los primeros (Antúnez y col., 2009) 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 (principalmente acaricidas), 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.

17 Estudio regional

En el área de estudio están ubicadas aproximadamente el 4% del número total de las colonias de abejas muestreadas en España en el estudio nacional realizado durante los años 2006 y 2007, y es una de las regiones en las que más se ha discutido sobre el origen del fenómeno del despoblamiento de las colonias en una amplia gama de foros entre los que se encuentran asociaciones de apicultores, instituciones oficiales y científicas. Con este estudio regional, realizado en una zona muy afectada por el fenómeno de PC, quisimos determinar si alguno de los factores de riesgo detectados en el estudio nacional podrían ser relacionados epidemiológicamente con la muerte y despoblación de las colonias de abejas, extremo que no pudo ser determinado en el estudio nacional debido a que no se obtuvo una respuesta válida y fiable a la pregunta que abordaba este aspecto.

A pesar de que la pérdida de colonias es un fenómeno que se ha observado en todo el mundo, su impacto no se ha reflejado en los censos oficiales de ningún país (vanEngelsdorp y col., 2009; vanEngelsdorp y Meixner, 2010), debido principalmente a la rápida sustitución de las colonias por los apicultores. Así, antes de este estudio era difícil estimar el impacto real de la pérdida de colonias en el área de estudio, pese a que se utilizó como referencia una estimación anterior (Higes y col., 2010a). Durante el estudio, la prevalencia observada de PC en esta región fue de 53,5% (IC 95% = 43,2 a 63,9), un valor más bajo de lo previsto inicialmente (Higes y col., 2010a), aunque no de manera significativa ni con una distribución homogénea en toda el área de estudio. Esta diferencia puede reflejar diferentes estrategias de recogida de muestras empleadas en cada estudio. En la encuesta pasiva realizada en otoño de 2005 (Higes y col., 2010b), las muestras se seleccionaron de entre aquellas enviadas por los apicultores cuyas colonias de abejas sufrían algún proceso patológico que puede conducir a la sobreestimación de la extensión del fenómeno PC. En la encuesta activa

presente, se recogieron muestras de todo el censo gallego, lo que representa un análisis más completo y equilibrado de la situación general.

Al analizar los posibles factores de riesgo involucrados en el fenómeno de PC, encontramos que las variables como el tipo de colmena, la orientación o actividad transhumante fueron en gran medida homogéneas entre los apiarios y por tanto no pudo establecer ninguna correlación con la PC. Sólo el tamaño más pequeño de apiario, es decir aquellos dedicados al autoconsumo, se asociaron con una menor prevalencia de PC, aunque esta asociación no se puede establecer estadísticamente, probablemente debido al bajo número de colmenas de este tipo de explotaciones.

Varios patógenos se distribuyeron ampliamente entre los apiarios estudiados. La ubicuidad del VAD y del VRN, ambos con una prevalencia del 94,9% fue consistente en los estudios realizados en Francia (Tentcheva y col., 2004), EE. UU. (Chen y col., 2008) y Austria (Berényi y col., 2006). Como en estudios anteriores, también se observó correlación entre cada uno de estos dos virus con el ácaro *V. destructor*, anteriormente propuesto como un vector viral mecánico (Ball, 1989; Dandeu y col., 1991; Tentcheva y col., 2004) o como un desencadenante de la replicación viral a través de su actividad inmunosupresora (Yang y Cox-Foster, 2005). Las infecciones víricas de las abejas melíferas son generalmente latentes y su presencia se asocia con la de *V. destructor* y/o *N. ceranae* (Chen y Siede, 2007; Tentcheva y col., 2004). Otros virus como VPC, VCS, VIPA o VPC no se detectaron en el presente estudio. El VIPA se ha vinculado a pérdidas de colonias en EE. UU (Cox-Foster y col., 2007) y considerado un marcador importante del fenómeno de la desaparición de colonias, popularmente conocido como *Colony Collapse Disorder* (CCD). No obstante, de acuerdo con los resultados actuales, dicha asociación no se estableció entre este virus y las pérdidas severas en otros países europeos (Blanchard y col., 2008; Garrido-Bailón y col., 2010; Higes y col., 2008a; 2009a), lo que sugiere que otros agentes nosógenos tienen un papel importante en la PC. También se observó una baja prevalencia del VK, asociado con la pérdida de colonias en EE. UU. (Pettis, 2008), aunque la presencia de PC en apiarios positivos a este virus fue mayor que en colmenares no infectados. Aunque esta asociación no se pudo confirmar por la regresión multivariante, estos datos indican un posible papel en este proceso ya que el patógeno estaba presente en el 100% de los colmenares afectados de PC y en ninguno asintomático.

Después de los virus anteriormente descritos, *V. destructor* fue el agente nosógeno más común en el estudio regional. Esta alta prevalencia de *V. destructor*, ya fue detectada en el estudio nacional de los años 2006 y 2007, y puede estar relacionado con la sorprendente observación de la deficiente posología al aplicar los tratamientos acaricidas. Los análisis de estrategias de control de *V. destructor*, que determinan si las dosis y los tratamientos se aplicaron correctamente, revelaron una mayor proporción de PC en apiarios deficientemente tratados. Esta asociación, cercana a la significancia estadística, indica el pobre o mal control de *V. destructor* como un

posible factor de riesgo en el fenómeno de PC, extremo que también detectamos en el estudio nacional. El uso de métodos artesanales utilizados frente *V. destructor* en el 6% de los colmenares también es preocupante, ya que se trata de una práctica prohibida y que puede favorecer la aparición de residuos en los productos de la colmena o una selección de ácaros tolerantes a estos compuestos utilizados sin respetar la posología correcta y los preparados medicamentosos adecuados. Además, la identificación del fluvalinato en el 13,1% de las muestras de polen almacenado sugiere el uso no declarado de los productos hechos en casa por algunos apicultores. Hallazgos similares se han declarado en otros países (Nguyen y col., 2009) y estas observaciones son consistentes con las de Jonson y col., (2010), quienes sugirieron que los apicultores eran la principal fuente de residuos en las colonias de abejas, muy por encima de la otras fuentes de pesticidas o agrotóxicos (medioambiente, cultivos, etc.)

Nosema ceranae se identificó en el 38,4% de los colmenares muestreados, una prevalencia más baja que la declarada en otras regiones de España en 2005 (Higes y col., 2010b) y a la detectada en el estudio nacional llevado a cabo entre 2006 y 2007. Sin embargo, en base al criterio de Brooks (1979), esta prevalencia supondría que este microsporidio se encontraría a niveles epizooticos tanto a escala nacional como en la Comunidad Gallega. A pesar de que no se encontró asociación entre las dos especies de microsporidios y los virus antes mencionados, *N. apis* se ha asociado con varios virus. El más notable es el VRN (Chen y Siede, 2007), posiblemente debido a la facilidad de la infección viral transentérica a través de los efectos citopatogénicos de *N. apis*. La PC en apiarios positivos a *N. ceranae* fue significativamente mayor que en los libres de este agente nosógeno, con una prevalencia de *N. ceranae* del 100% en las colonias sintomáticas y asociado a un aumento de cuatro veces el riesgo de padecer PC. Este resultado concuerda con hallazgos anteriores en este país (Higes y col., 2010b).

La prevalencia observada por *A. woodi* (16,2%) fue superior a la esperada y significativamente mayor en los apiarios en los que los tratamiento frente a *Varroa* se aplicaron de un modo incorrecto. Este hecho enfatiza los peligros del control inadecuado de *V. destructor*. Son poco los estudios de los últimos 15 años en los que se ha investigado el papel de *A. woodi* en la mortalidad de las colonias de abejas en Europa, aunque McMullan y Brown (2009) hicieron un modelo cualitativo del efecto de la infestación de ácaros traqueales en la muerte de la colonia. En este estudio se estimó la prevalencia de este infravalorado agente nosógeno y podría ser un factor contribuyente al fenómeno de PC. De hecho, los colmenares positivos para este ácaro eran propensos a sufrir pérdidas. La asociación entre *V. destructor* y *A. woodi* descrito anteriormente (Downey y Winston, 2001) no se estableció en este estudio.

El análisis palinológico reveló que la flora de los alrededores de la colmenas muestreadas era diversa, pero sobre todo de origen silvestre, en lugar de cultivos. No se encontró asociación entre la flora y la PC. Esta observación es de crucial importancia, dado que se ha relacionado la PC con el néctar y el polen de la

contaminación por pesticidas utilizados en el manejo de los cultivos próximos a los colmenares (Brodschneider y Crailsheim, 2010; Higes y col., 2010a). Ni imidacloprida ni fipronil se detectaron en el polen almacenado, pese a los bajos límites de detección de las técnicas utilizadas en nuestro estudio (Nguyen y col., 2009), lo que implica que la contaminación de pesticidas y cultivos no influye en el fenómeno de PC.

Los resultados de este estudio regional identificaron la presencia de *N. ceranae* como la variable principal asociada con el fenómeno de PC. No obstante, el escenario encontrado en esta representativa zona de España, con una alta prevalencia de PC, infección por virus, *V. destructor* y *A. woodi*, y la ausencia de pesticidas en gran parte de las muestras analizadas, sugiere que este fenómeno está relacionado con el pobre control de los agentes nosógenos de origen biótico más que con los pesticidas y los efectos de toxicidad medioambiental siendo *N. ceranae*, sin lugar a dudas, un agente que juega un papel central en el fenómeno de PC que viene sufriendo nuestro país desde mediados de la actual década.

CONCLUSIONES

1. Se han desarrollado técnicas de PCR convencional para la detección de *Acarapis woodi*, *Ascosphaera apis* y *Melissococcus plutonius*; las dos últimas se han adaptado junto a otra descrita para *Paenibacillus larvae* en una PCR múltiple que mejora la rapidez y economía de la técnica. La PCR múltiple de *Nosema* spp. se ha optimizado mediante la inclusión de un control interno de *Apis mellifera* que garantiza la fiabilidad de los resultados. La innovadora adaptación en el protocolo de manejo de un gran número de muestras durante la realización de este estudio permite un gran rendimiento en el procesamiento y análisis de las mismas.
2. La prevalencia real de los agentes nosógenos ha sido establecida por primera vez en España. De entre todas destaca la alta prevalencia de *Varroa destructor* y *Nosema ceranae* en todas las regiones españolas, verificándose la estrecha relación entre *Varroa destructor*, *Acarapis woodi* y *Nosema apis* y zonas de clima más frío; siendo *Nosema ceranae* más prevalente en áreas de clima más cálido.
3. Las características zootécnicas de las explotaciones apícolas influyen directamente en la prevalencia de algunos agentes bióticos. Mientras *Varroa destructor*, *Nosema apis* y *Paenibacillus larvae* son más prevalentes en explotaciones no profesionales estantes, *Nosema ceranae* se detecta más en explotaciones profesionales transhumantes. En *Acarapis woodi* no se encontró ninguna relación.
4. Los agropesticidas más frecuentemente detectados en el polen de reserva son principalmente acaricidas empleados en el tratamiento de la varroosis como el fluvalinato o el clorfenvinfós. Es evidente el incorrecto uso de estos productos ya que más de la mitad de los apicultores aplican inadecuadamente los medicamentos veterinarios autorizados (dosis y duración del tratamiento) o utilizan productos no autorizados para su uso en apicultura. La presencia de residuos de otros pesticidas como el fipronil, habitualmente relacionados con la pérdida de colonias, es muy baja, no habiéndose detectado en ningún caso presencia de imidacloprida.
5. Se ha establecido una clara relación causal entre la presencia de *Nosema ceranae* y la pérdida de colonias de *Apis mellifera* en una zona de alta incidencia de ese proceso.

RESUMEN



La sanidad de las abejas melíferas es un tema de actualidad debido al importante papel que estos insectos juegan tanto en la polinización como en la producción de productos únicos como la miel o la jalea real. Debido a que las abejas son susceptibles a una amplia variedad de enfermedades y amenazas medioambientales, el objetivo principal de este estudio fue identificar aquellos agentes nosógenos relacionados con las pérdidas de colonias de abejas melíferas (PC) en España. Para ello se ha realizado un estudio transversal nacional durante los años 2006 y 2007 y otro regional, en la comunidad autónoma de Galicia, durante el año 2008. Además, se han desarrollado nuevas técnicas moleculares más fiables, rentables, rápidas y sensibles que las clásicas, capaces de detectar uno (PCR) o varios agentes patógenos (PCR múltiple) en mono o co-infecciones aún cuando la enfermedad no se manifiesta.

Los resultados del estudio nacional muestran una alta detección de *Nosema ceranae* y *Varroa destructor* (haplotipo coreano). La alta prevalencia detectada del primer agente lo sitúa en un primer plano dentro de las posibles causas de pérdidas de colonias de las abejas. El ácaro *Varroa* es responsable de una de las plagas mejor conocidas de *A. mellifera*, y puede causar pérdidas similares a las producidas por *N. ceranae*; actualmente debido al uso incorrecto de las medicaciones o sus posologías está considerado como responsable de la re-emergencia de la varroosis en nuestro país. Una combinación de ambos agentes nosógenos, asociados a otros de menor importancia como *N. apis* y *A. woodi*, podrían aprovechar la deficiencia inmunitaria provocada por los primeros 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 (principalmente acaricidas), 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.

Los resultados del estudio realizado en Galicia, resolvieron las lagunas que quedaron pendientes en el estudio nacional. La respuesta incompleta sobre la valoración de las colmenas perdidas o repuestas por parte de los apicultores impidió el análisis estadístico de regresión y espacial, desencadenante de la repetición del estudio en una zona especialmente afectada por este fenómeno. Estos análisis permitieron identificar la presencia de *N. ceranae* como la variable principal asociada con el fenómeno de pérdida de colonias. El escenario encontrado en esta representativa zona de España, con una alta prevalencia de éste fenómeno, infección por virus, *V. destructor* y *A. woodi*, y la ausencia de pesticidas en los cultivos, sugiere que este fenómeno además está relacionado con el deficiente control de los agentes nosógenos de origen biótico (principalmente *V. destructor*) más que con los pesticidas y los efectos de toxicidad medioambiental.

SUMMARY



Nowadays, honey bee health is a really current issue due to the important role both in pollination and in the production of unique products such as honey or royal jelly. Due to honey bees are susceptible to a wide variety of diseases and environmental threats, the main aim of this study was to identify those nosogenic agents related to honey bee colony losses (CL) in Spain. To this end, a national cross-sectional study was conducted according to the census of beekeepers in every Spanish region (Autonomic communities) and conducted during the years 2006 and 2007, and another at the regional level, in the Galicia region, in 2008. As well, new molecular techniques much more reliable, cost effective, rapid and sensitive than classical techniques were developed.

The results on the national survey showed a high detection of *Nosema ceranae* and *Varroa destructor* (Korean haplotype). The high prevalence of the first pathogen detected puts it in a close within the possible causes of colony losses of bees. *Varroa* mite is responsible for the best-known pest of *Apis mellifera* and it can also cause losses similar to those produced by *N. ceranae*; nowadays, *V. destructor* is considered responsible for re-emergent varroosis in our country due to incorrect treatments and dosage. A combination of both pathogenic agents associated with other underestimated such as *Nosema apis* and *Acarapis woodi*, could take advantage of the immune deficiency caused by the first. And so, the likelihood of death of infected colonies could increase without pesticides exert a significant effect since the low levels of residues detected in pollen (acaricides, mainly), suggest that those products or other pesticides commonly used in Spain are not directly related to the widespread problem of honey bee colonies.

The results of the study in Galicia address the gaps that have been left open in the national study. The incomplete response on the valuation of colonies lost or replaced by beekeepers prevented regression and spatial statistic analysis. This fact triggers repeat study in an area particularly affected by this phenomenon. Theses analysis allowed the identification of the presence of *N. ceranae* as the main variable associated with the phenomenon of colony lost. The representative scenario found in this area of Spain, with a high prevalence of this phenomenon, virus infection, *V. destructor* and *A. woodi*, and the absence of pesticides on crops, suggests that this phenomenon is also related to poor control of pathogenic agents (*V. destructor* mainly) rather than pesticides and environmental toxicological effects.

The main conclusions of the work are:

1. Techniques have been developed for conventional PCR for detection of *Acarapis woodi*, *Melissococcus plutonius* and *Ascosphaera apis*, the last two have been adapted with other one described for *Paenibacillus larvae* in a multiplex PCR improving the speed and economy of the technique. Multiplex PCR for *Nosema*

spp. was optimized by including an internal control of *A. mellifera* ensuring the reliability of results. The innovative adaptation in the protocol for managing a large number of samples during this study allows high performance in processing and analyzing them.

2. The current prevalence of nosogenic agents has been established for the first time in Spain. The high prevalence of *V. destructor* and *N. ceranae* in all Spanish regions is highlighting, verifying the close connection between *V. destructor*, *A. woodi* and *N. apis* and colder climates, while *N. ceranae* is more prevalent in warmer climate areas.
3. The zootechnical characteristics of apiaries directly influenced the prevalence of certain biotic agents. While *V. destructor*, *N. apis* and *P. larvae* were more prevalent in non-professional farms, *N. ceranae* was detected more in transhumant professional farms. No relationship was found in *A. woodi*.
4. The most frequently detected agro-pesticides in stored pollen were mainly acaricides used in the treatment of varroosis such as fluvalinate or chlorfenvinphos. The wrong use of these products is clear since more than half of the beekeepers applied improperly authorized veterinary medicinal products (dose and duration of treatment) or used unauthorized products for beekeeping. The presence of residues of other pesticides like fipronil, usually related to the colony losses, is very low, and no imidacloprid has been detected in any case.
5. It has been established a clear causal relationship between the presence of *N. ceranae* and the colony losses of *A. mellifera* in an area with a high incidence of this process.

BIBLIOGRAFÍA

- Adam B. The honey-bee tracheal mite-fact and fiction. *American Bee Journal*. 1987; 127: 36-38.
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA). Mortalités, effondrements et affaiblissements des colonies d'abeilles. Weakening, collapse and mortality of bee colonies. Noviembre, 2008.
- Aizen MA, Garibaldi LA, Cunningham SA, Klein Am. Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency. *Current Biology*. 2008; 18: 1572-1575.
- Alaux C, Brunet JL, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, Cousin M, Brillard J, Baldy A, Belzunces LP, Le Conte Y. Interactions between *Nosema* micropores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*. 2010; 12 (3): 774-782.
- Alaux C, Folschweiller M, McDonnell C, Belsay D, Cousin M, Dussaubat C, Brunet JL, Le Conte Y. Pathological effects of the microporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 2011; 106: 380-385.
- Albo GN, Cerimele E, Re MS, De Giusti M, Alippi A. Ensayos de campo para evaluar la efectividad de algunos aceites esenciales. *Vida Apícola*. 2001; 108: 41-46.
- Alippi AM. A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera*, in Argentina. *Journal of Apicultural Research*. 1991; 30: 75-80.
- Alippi AM, Ringuet JA, Cerimele EL, Re MS, Henning CP. Antimicrobial activity of some essential oils against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood Disease. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*. 1996; 4: 9-16.
- Alippi AM, Albo GN, Leniz D, Rivera I, Zanelli ML, Roca AE. Comparative study of tylosin, erythromycin and oxytetracycline to control AFB of bees. *Journal of Apicultural Research*. 1999; 38: 149-158.
- Alippi AM, Lopez AC, Aguilar OM. Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American foulbrood of honeybees, by using PCR and restriction fragment analysis of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002; 68: 3655-3660.
- Alippi AM, Lopez AC, Aguilar OM. A PCR-based method that permits specific detection of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American Foulbrood of honeybees, at the subspecies level. *Letters in Applied Microbiology*. 2004; 39: 25-33.
- Al-Ghzwai AAM, Zaitoun ST, Shannag HK. Incidence and geographical distribution of honeybee (*Apis mellifera* L.) pests in Jordan. *Annales de la Société Entomologique de France*. 2009; 45 (3): 305-308.
- Allen M, Ball B. The cultural characteristics and serological relationships of isolates of *Melissococcus pluton*. *Journal of Apicultural Research*. 1993; 32: 80-88.
- Allen M, Ball B. The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World*, 1996; 77: 141-162.
- Allen M, Ball B, Underwood BA. An isolate of *Melissococcus pluton* from *Apis laboriosa*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1990; 55: 439-440.
- Allen M, Ball B, White RF, Antoniw JF. The detection of acute paralysis virus in *Varroa jacobsoni* by the use of a simple indirect ELISA. *Journal of Apicultural Research*. 1986; 25: 100-105.

- Amdam GV, Omholt SW. The regulatory anatomy of honeybee lifespan. *Journal of Theoretical Biology*. 2002; 216: 209-228.
- Amdam GV, Hartfelder K, Norberg K, Hagen A, Omholt, SW. Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa Destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering? *Journal of Economic Entomology*. 2004; 97 (3): 741-747.
- Anderson DL. Kashmir bee virus - a relatively harmless virus of honey bee colonies. *American Bee Journal*. 1991; 131: 767-770.
- Anderson DL. Variation in the parasitic bee mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*. 2000; 31: 281-292.
- Anderson DL, Fuchs S. Two genetically distinct populations of *Varroa jacobsoni* with contrasting reproductive abilities on *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*. 1998; 37: 69-78.
- Anderson DL, Gibson NL. New species and isolates of spore-cyst fungi (Plectomycetes: *Ascosphaerales*) from Australia. *Australian Systematic Botany*. 1998; 11: 53-72.
- Anderson DL, Giacon H. Reduced pollen collection by honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies infected with *Nosema apis* and sacbrood virus. *Journal of Economic Entomology*. 1992; 85: 47-51.
- Anderson DL, Trueman JWH. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*. 2000; 24: 165-189.
- Anderson DL, Morgan MJ. Genetic and morphological variation of bee-parasitic *Tropilaelaps* mites (Acari: Laelapidae): new and re-defined species. *Experimental and Applied Acarology*. 2007; 43: 1-24.
- Anderson DL, Gacon H, Gibson NL. Detection and thermal destruction of the chalkbrood fungus (*Ascosphaera apis*) in honey. *Journal of Apicultural Research* 1997; 36: 163-168.
- Anderson DL, Gibbs AJ, Gibson NL. Identification and phylogeny of sporecyst fungi (*Ascosphaera* spp.) using ribosomal DNA sequences. *Mycological Research*. 1998; 102: 541-547.
- 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). *Environmental Microbiology*. 2009; 11: 2284-2290.
- Antúnez K, Anido M, Arredondo D, Zunino P. Secreted and immunogenic proteins produced by the honeybee bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Veterinary Microbiology*. 2010; 141: 385-389.
- Antúnez K, Anido M, Arredondo D, Evans JD, Zunino P. *Paenibacillus larvae* enolase as a virulence factor in honeybee larvae infection. *Veterinary Microbiology*. 2011a; 147: 83-89.
- Antúnez K, Anido M, Arredondo D, Zunino P. Mellaprotease production by *Paenibacillus larvae* during the infection of honeybee larvae. *Microbiology*. 2011b; 157: 1474-1480.
- Arias MC, Sheppard WS. Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2005; 37: 25-35.
- Arostein DA, Murray KD. Chalkbrood disease in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2010; 103: 20-29.

- Ash C, Farrow JAE, Wallbanks S, Collins MD. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology*. 1991; 13: 202-206.
- Ash C, Priest FG, Collins MD. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1993; 64: 253-260.
- Atwal AS, Goyal NP. Infestation of honeybee colonies with *Tropilaelaps*, and its control. *Journal of Apicultural Research*. 1971; 10: 137-142.
- Avilez JP, Araneda X. Hatching stimulation in bees (*Apis mellifera*). *Archivos de Zootecnia*. 2007; 56: 885-893.
- Aydin N, Bulbul H, Biyikoglu G, Yaraly C, Yavuz MK. Isolation of *Paenibacillus* from honey for human consumption and from samples taken from beehives. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*. 1998; 10: 93-100.
- Aydin L, Gulegen E, Cakmaki I, Girisgin OG, Harrington W. Relation between Nosema and Chalkbrood disease and its implication for an apiary management model. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 2006; 50: 471-475.
- Bacandritsos NK, Saitanis CJ. A field study on the long-term incidence of *Acarapis woodi* in Greece. *Journal of Apicultural Research*. 2004; 43: 21-26.
- 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. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2010; 105: 335-340.
- Bailey L. The epidemiology and control of *Nosema* disease of the honey-bee. *Annals of Applied Biology*. 1955; 43: 379-389.
- Bailey L. Comb fumigation for *Nosema* disease. *American Bee Journal*. 1957a; 97: 24-26.
- Bailey L. The isolation and cultural characteristics of *Streptococcus pluton* and further observations on '*Bacterium eurydice*'. *Journal of General Microbiology*. 1957b ; 17: 39-48.
- Bailey L. An improved method for the isolation of *Streptococcus pluton*, and observations on its distribution and ecology. *Journal of Insect Pathology*. 1959; 1: 80-85.
- Bailey L. The epizootiology of European foulbrood of the larval honey bee, *Apis mellifera* Linnaeus. *Journal of Insect Pathology*. 1960; 2: 67-83.
- Bailey L. Bee diseases. En: Report of the Rothamsted Experimental Station for 1961, Harpenden, UK. 1962: 160-161.
- Bailey L. The effect of temperature on the pathogenicity of the fungus, *Ascosphaera apis*, for larvae of the honey bee. *Apis mellifera*. En: Vand der Laan PA (Ed), *Insect Pathology and Microbial Control*. North Holland Publishing Co., Amsterdam, The Netherlands, 1967. pp 162-167.
- Bailey L. An unusual type of *Streptococcus pluton* from the Eastern Hive bee. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1974; 23: 246-247.
- Bailey L. *Honey bee pathology*. Academic Press, London, UK. 1981.
- Bailey L. Viruses of honeybees. *Bee World*. 1982; 63: 165-173.
- Bailey L. *Melissococcus pluton*, the cause of European foulbrood of honey bees (*Apis* spp.). *Journal of Applied Bacteriology*. 1983; 55: 65-69.
- Bailey L. *Acarapis woodi*: a modern appraisal. *Bee World*. 1985; 66: 99-104.
- Bailey L. The century of *Acarapis woodi*. *American Bee Journal*. 1999; 139: 541-542.
- Bailey L, Ball B. *Honey bee pathology*. Second Edition, Academic Press, London. 1991.

- Bailey L, Collins MD. Reclassification of *Streptococcus pluton* (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton* nom. rev.; comb. nov. *Journal of Applied Microbiology*. 1982; 53: 215-217.
- Bailey L, Woods RD. Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on sacbrood and acute bee-paralysis viruses. *Journal of General Virology*. 1977; 37: 175-182.
- Bailey L, Gibbs AJ, Woods RD. Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology*. 1963; 21: 390-395.
- Bailey L, Fernando EF, Stanley BH. *Streptococcus faecalis*, *Bacillus alvei*, and sacbrood virus in European foulbrood of honeybee. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1973; 22: 45-453.
- Bailey L, Ball BV, Perry JN. Association of viruses with two protocol pathogens of the honey bee. *Annals of Applied Biology*. 1983; 103, 13-20.
- Bakhiet N, Sthaly DP. Ultrastructure of sporulating *Bacillus* larvae in a broth medium. *Applied and Environmental Microbiology*. 1985; 50: 690-692.
- Bakonyi T, Farkas R, Szendrői A, Dobos-Kovács M, Rusvai M. Detection of acute bee paralysis virus by RT-PCR in honey bee and *Varroa destructor* field samples: Rapid screening of representative Hungarian apiaries. *Apidologie*. 2002; 33: 63-74.
- Bakonyi T, Derakhshifar I, Grabensteiner E, Nowotny N. Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: comparison with isolation biochemical characterization. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003; 69: 1504-1510.
- Balança G, De Visscher N. Effects of very low doses of fipronil on grasshoppers and non-target insects following field trials for grasshopper control. *Crop Protection*. 1997; 16: 553-564.
- Ball B. *Varroa jacobsoni* as a virus vector. En R. Cavalloro (Ed.), Present status of varroaosis in Europe and progress in *Varroa* mite control. Office for Official Publications of the European Communities, Luxemburg. 1989.
- Ball B, Allen M. The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Annals of Applied Biology*. 1988. 113:237-244.
- Ball B, Bailey L. Viruses. En: Honey Bee Pest, Predators and Diseases. (R. A. Morse and K. Flottum, eds). The A. I. Root Co., Medina, OH. 1997; pp. 11-31.
- Bamrick JF, Rothenbuhler WC. Resistance to American foulbrood in honey bees. IV. The relationship between larval age at inoculation and mortality in a resistant and a susceptible line. *Journal Insect Pathology*. 1961; 3: 381-390.
- Barr AR, Shoper RE. The invertebrate gut as a barrier to invading parasites. In: Maramorosh K, Shoper RE (Eds.). *Invertebrate Immunity*. Academic Press, New York, USA. 1975. pp 113-114.
- Barros AJD, Hirakata VN. Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: an empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio. *BMC Medical Research Methodology*. 2003; 3: 21.
- Békési L, Szalai Mátray E, Harka L, Hegedus D, Albert A. Medication possibilities against new age-nosemosis. 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).

- Belayiannis G, Belayiannis P. Bee Honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2008; 55: 462-470.
- Belloy L, Imdorf A, Fries I, Forsgren E, Berthoud H, Kuhn R, Charriere JD. Spatial distribution of *Melissococcus plutonius* in adult honey bees collected from apiaries and colonies with and without symptoms of European foulbrood. *Apidologie*. 2007; 38: 136-140.
- Bendahou N, Bounias M, Fleche C. Acute toxicity of cypermethrin and fenitrothion on honeybees (*Apis mellifera*) according to age, formulations and (chronic paralysis virus) insecticide interaction. *Journal of Environmental Biology*. 1997; 18: 55-65.
- Benjeddou M, Leat N, Allsopp M, Davison S. Detection of acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001; 67: 2384-2387.
- Benedetti y Pieralli. *Apicultura*. Ed. Omega. 1988
- Berbee ML, Taylor JW. Two ascomycete classes based on fruiting-body characters and ribosomal DNA sequence. *Molecular Biology and Evolution*. 1992; 9: 278-284.
- Berényi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Köglberger H, Nowotny N. Occurrence of six honey bee viruses in diseased Austrian Apiaries. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72: 2414-2420.
- Betts AD. *The diseases of bees: their signs, causes and treatment*. Hickmott, Camberley. England. 1951.
- Bignell DE, Heath LAF. Electropositive redox state of the fifth-instar larval gut of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* 1985; 24: 211-213.
- Bisset, J. Contribution toward a monograph of the genus *Ascospaera*. *Canadian Journal of Botany*. 1988; 66: 2541-2560.
- Blanchard P, Schurr F, Celle O, Cougoule N, Drajnudel P, Thiéry T, Faucon JP, Ribière M. First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 2008; 99: 348-350.
- Blanco-Loizelier A. Enfermedades infecciosas de las abejas. *Veterinaria*. 1949; 13: 513-537.
- Boecking O, Genersch E. Varroosis- the ongoing crisis in bee keeping. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*. 2008; 3: 221-228.
- Bognadov S, Kilchenmann V, Imdorf A. Acaricide residues in some bee products. *Journal of Apicultural Research*. 1998; 3: 57-67.
- Bonmatin JM, Moineau I, Charvet R, Fleche C, Colin ME, Bengsch ER. A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. *Analytical Chemistry*. 2003; 75: 2027-2033.
- 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.
- Bos C, Masson C. Analyse des effets, en particulier de la répulsivité, d'un pyéthroïde de synthèse, la deltaméthrine, sur les abelles. *Agronomie*. 1983 ; 3 : 545-553.
- Botías C, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, Higes M, Anderson DL. *Nosema ceranae* is able to infect different *Apis* species. Proc. 41st Congress Apimondia Montpellier. 2009a; pp. 161.
- Botías C, Martín-Hernández R, Meana A, Higes M. *Nosema* spp. Infection in Spain: Consequences in colony productivity and vitality. Workshop "Nosema disease: lack of knowledge and work standardization" (COST Action FA0803) Guadalajara. 2009b.

- <http://www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online> (acceso 20 Nov.2009).
- Botías C, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, Martínez-Salvador A, De la Rúa P, Meana A, Higes M. The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Research in Veterinary Science*. 2011a, doi:10.1016/j.rvsc.2011.08.002.
- Botías C, Martín-Hernández R, Meana A, Higes M. Critical aspects of the *Nosema* spp. diagnostic sampling in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Parasitology Research*. 2011b, doi: 10.1007/s00436-011-2760-2.
- Botías C, Martín-Hernández R, Barrios L, Nanetti A, Garrido-Bailón E, Meana A, Higes M. *Nosema* spp. parasitisation decreases the effectiveness of acaricide strips (Apivar®) in treating varroosis of honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environmental Microbiology Reports*. 2011c, doi:10.1111/j.1758-2229.2011.00299.x
- Bourgeois AL, Rinderer TE, Beaman LD, Danka RG. Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in the honey bee. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2010; 103: 53-58.
- Bowen-Walker P, Gunn A. The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 2001; 101: 207-217.
- Bowen-Walker PL, Martin SJ, Gunn A. Preferential distribution of the parasitic mite, *Varroa jacobsoni* Oud. on overwintering honeybee (*Apis mellifera* L.) workers and changes in the level of parasitism. *Parasitology*. 1997; 114: 151-157.
- Bowen-Walker PL, Martin SJ, Gunn A. The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1999; 73:101-106.
- Brem S. Laboruntersuchungen von Wintergemüll. In: *Diagnose und Therapie der Varroatose* Apimondia Publishing House. Bucharest. Romania. 1980; 116-117.
- Brodtschneider R, Crailsheim K. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*. 2010; 41: 278-294.
- Brooks VM. Induced epizootics: Protozoa. *Proceedings Workshop Microbial Control of Insects. Future strategies in pest management systems*. Allen GE, Ignoffo C, Jaques R, Gainesville FL. 1979. pp. 37-42.
- Brødsgaard CJ, Ritter W, Hansen H. Response of in vitro reared honey bee larvae to various doses of *Paenibacillus larvae larvae* spores. *Apidologie*. 1998; 29: 569-578.
- 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. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2010; 105: 164-170.
- Burgher-MacLellan K, Williams GR, Shutler D, MacKenzie K, Rogers REL. Optimization of duplex real-time PCR with meltingcurve analysis for detecting the microsporidian parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*. *The Canadian Entomologist*. 2010; 142: 271-283.
- Burgett DM, Kitprasert C. Evaluation of Apistan as a control for *Tropilaelaps clareae* (Acari: Laelapidae), an Asian honey bee brood mite parasite. *American Bee Journal*. 1990; 130: 51-53.

- Cai J, Collins MD. Evidence for a close phylogenetic relationship between *Melissococcus pluton*, the causative agent of European foulbrood disease, and the genus *Enterococcus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1994; 44: 365-367.
- Cain RF. Evolution of the fungi. *Mycologia*. 1972; 64: 1-14.
- Çakmak I, Aydin L, Gulegen E, Well H. Varroa (*Varroa destructor*) and tracheal mite (*Acarapis woodi*) incidence in the Republic of Turkey. *Journal of Apicultural Research*. 2003;42: 57-60.
- Calderone NW, Lin S. Arrestment activity of extracts of honey bee worker and drone larvae, cocoons and brood food on female *Varroa destructor*. *Physiological Entomology*. 2001; 26: 341-350.
- Cánovas F, De la Rúa P, Serrano J, Galián J. Variabilidad del ADN mitocondrial en poblaciones de *Apis mellifera iberica* de Galicia (NW España). *Archivos de Zootecnia*. 2002; 51: 441-448.
- Cánovas F, De la Rúa P, Serrano J, Galián J. Geographic patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 2008; 46: 24-30.
- Cánovas F, De la Rúa P, Serrano J, Galián J. Microsatellite variability reveals beekeeping influences on Iberian honeybee populations. *Apidologie*. 2011; 42: 235-251.
- Cantwell GE. Standard methods for counting *Nosema* spores. *American Bee Journal*. 1970; 110: 222-223.
- Cantwell GE, Shimanuki H. The use of heat to control *Nosema* and increase production for the commercial beekeeper. *American Bee Journal*. 1970; 110: 263.
- Carpana E, Marocchi L, Gelmini L. Evaluation of the API 50CHB system for the identification and biochemical characterization of *Bacillus larvae*. *Apidologie*. 1995; 26: 11-16.
- Chagas SS, Almeida-Vaucher R, Brandelli A. Detection of *Paenibacillus larvae* by real-time PCR. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2010; 38: 251-256.
- Chaimanee V, Warrit N, Chantawannakul P. Infection of *Nosema ceranae* in four different honeybee species. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2010; 105: 207-210.
- Chantawannakul P, Ward L, Boonham N, Brown M. A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in *Varroa* mites collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2006; 91: 69-73.
- Chauzat MP, Faucon JP, Martel AC, Lachaize J, Cougoule N, Aubert M. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *Journal of Economic Entomology*. 2006; 99: 253-262.
- Chauzat MP, Faucon JP. Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L) in France. *Pest Management Science*. 2007; 63: 1100-1106.
- Chauzat MP, Higes M, Martín-Hernández R, Meana A, Cougoule N, Faucon JP. Presence of *Nosema ceranae* in French honey bee colonies. *Journal of Apicultural Research*. 2007; 46: 127-128.
- Chauzat MP, Carpentier P, Martel AC, Bougerard S, Cougoule N, Pota P, Lachaize J, Madec F, Aubert M, Faucon JP. Influence of pesticide residue on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony health in France. *Environmental Entomology*. 2009; 38: 514-523.
- Chen YP, Siede R. Honey bee viruses. *Advances in virus research*. 2007; 70: 30-80.
- Chen YP, Huang ZY. *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia. *Apidologie*. 2010; 41: 364-374.

- Chen YP, Higgins JA, Feldlaufer MF. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Applied and Environmental Microbiology*. 2005; 71: 436-441.
- Chen YP, Evans JD, Smith JB, Pettis JS. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2008; 147: 1027-1028.
- 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*. *Journal of Eukariotic Microbiology*. 2009; 56: 142-147.
- Chorbinski P. Enzymatic activity of strains of *Ascospaera apis*. *Veterinary Medicine* 2003; 59: 1019-1022.
- Chorbinski P. Identification of *Ascospaera apis* strains using ribosomal DNA sequences. *Veterinary Medicine*. 2004; 60:190-192.
- Chorbinski P, Rypula K. Studies on the morphology of strains *Ascospaera apis* isolated from chalkbrood disease of the honey bees. *Veterinary Medicine* 2003; 6: 1-12.
- Christensen M, Gilliam M. Note on the *Ascospaera* species inciting chalkbrood in honey bees. *Apidologie*.1983; 14: 291-297.
- Claussen, P. Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen Aber den Erreger der als 'Kalbrut' bezeichneten Krankheit der Bienen. *Arb.Biol. Reichsanst.* 1921; 10: 167-519.
- Clark TB. A filamentous virus of the honey bee. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1978; 32 (3); 332-340.
- Cobb, M. Reading and Writing The Book of Nature: Jan Swammerdam (1637-1680). *Endeavour*. 2000; 24:122-128.
- Cobb M. Jan Swammerdam on social insects: a view from the seventeenth Century. *Insectes Sociaux*. 2002; 49: 92-97.
- Cole LM, Nicholson RA, Casida JE. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. *Pesticide, Biochemistry and Physiology*. 1993; 46: 47-54.
- Colin MA, Faucon JP, Gianfert A, Sarrazin C. A new technique for the diagnosis of Acarine infestation in honey bees. *Journal of Apicultural Research*. 1979; 18: 222-224.
- Colin ME, Vandame R, Jourdan P, Di Pasquale S. Fluvalinate resistance of *Varroa jacobsoni* Oudemans (Acari: Varroidae) in Mediterranean apiaries of France. *Apidologie*. 1997; 28: 375-384.
- Colin ME, Le Conte Y, Vermandere JP. Managing nuclei in insect prof tunnel as an observation tool for foraging bees: sublethal effects of deltamethrin and imidacloprid. *Proceedings of the 7th International Symposium "Hazards of pesticides to bees"*. September 7-9, 1999. Avignon, France. (Belzunces LP, Pélissier C, Lewis GB, Ed.). *Les Colloques de l'INRA*. 2001; 98: 259-268.
- Colin ME, Bonmatin JM, Moineau I, Gaimon C, Brun S, Vermandere JP. A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees : relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2004 ; 47 : 387-395.
- 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).

- Cornman RS, Chen YP, Schatz MC, Street C, Zhao Y, Desany B, Egholm M, Hutchison S, Pettis JS, Lipkin WI, Evans JD. Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. *PLoS Pathogens*. 2009; 5: e1000466.
- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briese T, Horning M, Geiser DM, Martinson V, vanEngelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai JH, Cui LW, Hutchison SK, Simons JF, Engholm M, Pettis JS, Lipkin WI. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*. 2007; 318: 283-287.
- Cramp S. Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa. Oxford University Press, Oxford. 1985; 4: 748-763.
- Czekonska K. The influence of *Nosema apis* on young honeybee queens and transmission of the disease from queens to workers. *Apidologie*. 2000; 31: 701-706.
- Dall DJ. Inapparent infection of honeybee pupae by Kashmir and sacbrood bee viruses in Australia. *Annals of Applied Biology*. 1985; 106: 461-468.
- Dancer BN, Chantawannakul P. The proteases of American foulbrood scales. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1997; 70: 79-87.
- Dandeu JP, Lux M, Colin ME, Rabillon J, David B. Immunochemical study of hemolymphs from healthy and *Varroa jacobsoni* Oud infested adult worker-bees (*Apis mellifera* L). *Apidologie*. 1991; 22: 37-42.
- Dauterman WC, O'Brien RD. Cholinesterase variation as a factor in organophosphate selectivity in insects. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1964; 12: 318-319.
- Davidson EW. Ultrastructure of peritrophic membrane development in larvae of the worker honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 1970 ; 15 : 451-454.
- Davidson EW. Ultrastructure of American foulbrood disease pathogenesis in larvae of the worker honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1973 ; 21 : 53-61.
- Davis C, Ward W. Control of chalkbrood disease with natural products: a report for de RIRDC. Publication Nº 03/107, Kingston, ACT, AU, 2003.
- Davis MM, Primrose DA, Hodgetts RB. A member of the p38 mitogen-activated protein kinase family is responsible for transcriptional induction of dopa decarboxylase in the epidermis of *Drosophila melanogaster* during the innate immune response. *Veterinary Medicine*. 2008; 28 (15): 4883-4895.
- Dawicke BL, Otis GW, Scott-Dupree C, Nasr M. Host preference of the honey bee tracheal mite (*Acarapis woodi* Rennie). *Experimental and Applied Acarology*. 1992; 15: 83-98.
- Decisión de la Comisión de 11 de diciembre de 2003 relativa a las condiciones de policía sanitaria y de certificación aplicables a las importaciones de abejas (*Apis mellifera* & *Bombus* spp.) procedentes de determinados terceros países y por la que se deroga la Decisión 2000/462/CE. Diario Oficial de la Unión Europea L 328/26, de 17 de diciembre de 2003.
- Decisión de la Comisión de 20 de enero de 2005 por la que se modifica la Decisión 2003/881/CE relativa a las condiciones de policía sanitaria y de certificación aplicables a las importaciones de abejas (*Apis mellifera* y *Bombus* spp.) procedentes de determinados terceros países, con respecto a los Estados Unidos de América. Diario Oficial de la Unión Europea L 25/64, de 28 de enero de 2005.
- Decisión de la Comisión de 26 de abril de 2007 por la que modifica el anexo E de la Directiva 92/65/CEE del Consejo para incluir medidas sanitarias adicionales aplicables a los

- intercambios comerciales de abejas vivas y actualizar los modelos de certificado sanitario. Diario Oficial de la Unión Europea L 114/17 de 1 de mayo de 2007.
- Decisión de la Comisión de 10 de agosto de 2007, por el que se aprueba el programa de mejora de la producción y la comercialización de los productos de la apicultura presentado por España con arreglo al Reglamento (CE) 797/2004 del Consejo. Diario de la Unión Europea.
- Decourtye A, Lacassie E, Pham-Delègue MH. Learning performances of honeybee (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Management Science*. 2003; 59: 269–278.
- De Graaf DC, Raes H, Sabbe G, Rycke PH, Jacobs FJ. Early development of *Nosema apis* (Microsporidia: Nosematidae) in the midgut epithelium of the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 1994; 63: 74-81.
- De Graaf DC, De Vos P, Heycrickx M, Van Trappen S, Peiren N, Jacobs FJ. Identification of *Paenibacillus larvae* to the subspecies level: An obstacle for AFB diagnosis. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2006; 91: 115-123.
- De Greef M, De Wael A, Van Laere O. Evaluation des résidues de fluvalinate dans le miel et la cire d'abeilles en Belgique. *Apiacta*. 1994 ; 29 : 83-87.
- De Guzmán LI, Delfinado-Baker M. A new species of *Varroa* (Acari: Varroidae) associated with *Apis koschevnikovi* (Apidae: Hymenoptera) in Borneo. *International Journal of Acarology*. 1996; 22: 23-27.
- De Guzmán LI, Rinderer TE. Identification and comparison of *Varroa* species infesting honey bees. *Apidologie*. 1999; 30; 85-95.
- De Guzmán LI, Rinderer TE, Beaman LD. Survival of *Varroa jacobsoni* Oud. (Acari Varroidae) away from its living host *Apis Mellifera* L. *Experimental and Applied Acarology*. 1993; 17: 283-290.
- De Guzmán LI, Rinderer TE, Bigalk M, Tubbs H, Bernard SJ. Russian honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies: *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae) infestations and overwintering survival. *Journal of Economic Entomology*. 2006; 98: 1796-1801.
- De Jong D. Experimental enhancement of chalkbrood infection. *Bee World*. 1976; 57: 114-115.
- De Jong D, De Jong PH, Gonçalves LS. Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *V.jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*. 1982a; 21, 165-216.
- De Jong D, Morse A, Eickwort GC. Mite pests of honey bee. *Annual Review of Entomology*. 1982b; 27: 229-252.
- De la Rúa P, Galián J, Serrano J. Mitochondrial variability of honeybee populations from the Canary Islands. *Molecular Ecology*. 1998; 7: 1543-1547.
- De la Rúa P, Galián J, Serrano J, Moritz RFA. Molecular characterization and population structure of the honeybees from the Balearic Islands. *Apidologie*. 2001a; 32: 417-427.
- De la Rúa P, Galián J, Serrano J, Moritz RFA. Genetic structure and distinctness of *Apis mellifera* L. populations from the Canary Islands. *Molecular Ecology*. 2001b; 10: 1733-1742.
- De la Rúa P, Hernández-García R, Pedersen BV, Galián J, Serrano J. Diversidad molecular de la abeja *Apis mellifera iberica* L. (Hymenoptera: Apidae) de Andalucía Occidental. *Archivos de Zootecnia*. 2004a; 53: 195-203.
- De la Rúa P, Jiménez Y, Galián J, Serrano J. Evaluation of the diversity of honey bee (*Apis mellifera*) populations from Eastern Spain. *Journal of Apicultural Research*. 2004b; 43: 162-166.

- De la Rúa P, Hernández-García R, Jiménez Y, Galián J, Serrano J. Biodiversity of *Apis mellifera iberica* (Hymenoptera: Apidae) from north-eastern Spain assessed by mitochondrial análisis. *Insect Systematics and Evolution*. 2005; 36: 21-28.
- De Miranda JR, Drebot M, Tylor S, Shen M, Cameron CE, Stolz DB, Camazine SM. Complete nucleotide sequence of Kashmir bee virus and comparison with acute bee paralysis virus. *Journal of General Virology*. 2004; 85: 2263-2270.
- De Ruijter A. Reproduction of *Varroa jacobsoni* during successive brood cycles. *Apidologie*. 1987; 18: 321-326.
- De Ruijter A, Kaas JP. The anatomy of the *Varroa* mite. In: Cavalloro R. (Ed), *Varroa jacobsoni* Oud Affecting Honey Bees: Present Status and Needs. A.A. Balkema, Rotterdam. 1983; 45-47.
- De Ruijter A, Van der Steen J. Desinfection of combs by means of acetic acid (96%) against *Nosema*. *Apidologie*. 1989; 20: 503-506.
- Delaplane KS. American foulbrood. *American Bee Journal*. 1991; 131: 700-702.
- Delaplane KS. Strictly for the hobbyist: *Nosema* disease and its control. *American Bee Journal*. 1998; 138: 343-344.
- Delaplane KS, Mayer DF. *Crop pollination by bees*. CABI Publishing, New York. 2000.
- Delfinado M, Baker EW. *Tropilaelaps*, a new genus of mite from Philippines (Laelaptidae: Acarina). *Fieldiana Zoology*. 1961; 44: 53-56.
- Delfinado-Baker M. *Acarapis woodi* in the United States. *American Bee Journal*. 1984; 124: 805-806.
- Delfinado-Baker M, Baker EW. A new species of *Tropilaelaps* parasitic on honey bees. *American Bee Journal*. 1982a; 122: 416-417.
- Delfinado-Baker M, Baker EW. Notes on honey bee mites of the genus *Acarapis* Hirst (Acari: Tarsonemidae). *International Journal of Acarology*. 1982b; 8: 211-226.
- Delfinado-Baker M, Aggarwal K. A new *Varroa* (Acari: Varroidae) from the nest of *Apis cerana* (Apidae). *International Journal of Acarology*. 1987; 18: 315-322.
- Denholm CH. Inducible honey bee viruses associated with *Varroa jacobsoni*. Tesis doctoral. Department of Entomology and Nematology, Rothamsted Research, Hertfordshire, UK and School of Life Sciences, Keele University, Staffordshire, UK. 1999.
- Dingmann DW, Stahly DP. Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Applied and Environmental Microbiology*. 1983; 46: 860-869.
- Di Prisco G, Pennacchio F, Caprio E, Boncristiani HF, Evans JD, Chen Y. *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of General Virology*. 2011; 92: 151-155.
- Directiva 90/425/CEE del Consejo, de 26 de junio de 1990, relativa a los controles veterinarios y zootécnicos aplicables en los intercambios intracomunitarios de determinados animales vivos y productos con vistas a la realización del mercado interior. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 224, de 18 de agosto de 1990.
- Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 230 de 19 de agosto de 1991.
- Directiva 2007/52/CE de la Comisión de 16 de Agosto de 2007 por la que se modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo a fin de incluir en ella las sustancias activas, etoprofos, pirimifos-metilo y fipronil. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 214/3 de 17 de agosto de 2007.

- Djordjevic SP, Noone K, Smith L, Hormitzky MAZ. Development of hemi-nested PCR assay for the specific detection of *Melissococcus pluton*. Journal of Apicultural Research. 1998; 37: 165-174.
- Dobbelaere W, de Graaf DC, Peeters JE, Jacobs FJ. Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease. (*Paenibacillus larvae* subs. *larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR. Apidologie. 2001a; 32: 363-370.
- Dobbelaere W, de Graaf DC, Peeters JE, Jacobs FJ. Comparison of two commercial kits for biochemical characterization of *Paenibacillus larvae larvae* in the diagnosis of AFB. Journal of Apicultural Research. 2001b; 40: 37-40.
- Dohoo IR, Martin SW, Stryhn H. Veterinary Epidemiologic Research. AVC Inc. Charlottetown, Prince Edward Island, Canada. 2003.
- Donzé G. Behavioural attributes of the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* during its reproductive phase in the capped brood of the honey bee *Apis mellifera*. Adaptations comportementales de l'acarien ectoparasite *Varroa jacobsoni* durant sa phase de reproduction dans les alvéoles operculées de l'abeille mellifère *Apis mellifera*. 1995: 153.
- Donzé G, Guerin PM. Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood. Behavioral Ecology and Sociobiology. 1994; 34: 305-319.
- Donzé G, Herrmann M, Bachofen B, Guerin PM. Effect of mating frequency and brood cell infestation rate on the reproductive success of the honeybee parasite *Varroa jacobsoni*. Ecological Entomology. 1996; 21: 17-26.
- Donzé G, Schneyder-Candrian S, Bogdanov S, Diehl PA, Guerin PM, Kilchenmann V, Monachon F. Aliphatic alcohols and aldehydes of the honey bee cocoon induce arrestment behaviour in *Varroa jacobsoni* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasite of *Apis mellifera*. Arch. Insect. Biochemistry and Physiology. 1998; 37: 129-145.
- Downey DL, Winston ML. Honey bee colony mortality and productivity with single and dual infestations of parasitic mite species. Apidologie. 2001; 32: 567-575.
- Duay P, De Jong D, Engels W. Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development. Genetics and Molecular Research. 2002; 1: 227-232.
- Duay P, De Jong D, Engels W. Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites. Apidologie. 2003; 34: 61-65.
- Eckert JE. The flight range of a honey bee. Journal of Apicultural Research. 1933; 47: 257-285.
- El Hassani AK, Dacher M, Gauthier M, Armengaud C. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honey bee (*Apis mellifera*). Pharmacology Biochemistry and Behaviour. 2005; 82: 30-39
- Ellis JD, Munn PA. The worldwide health status of honey bees. Bee World. 2005; 4: 88-101.
- Elzen PJ, Baxter JR, Spivack M, Wilson WT. Control of *Varroa jacobsoni* Oud. Resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos. Apidologie. 2000; 31: 437-441.
- Engels W, Rosenkranz P. Hypertermic experiences in control of varroaosis. Apidologie. 1992; 23: 380-381.
- Erdtman G. Handbook of Palynology. An Introduction to the Study of Pollen Grains and Spores. Munksgaard (Ed) Copenhagen. 1969.
- Erler S, Lommatzsch S, Lattorff HMG. Comparative analysis of detection limits and specificity of molecular diagnostic markers for the three pathogens (Microsporidia, *Nosema* spp.) in

- the key pollinators *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. Parasitology Research. 2011. doi: 10.1007/S00436-011-2640-9.
- Erickson EH, Cohen AC, Cameron BE. A mite excreta: a new diagnostic for varroasis. Bee Science. 1994; 3: 76-78.
- Evans JD. Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. Journal of Invertebrate Pathology. 2003; 83: 46-50.
- Evans JD, Pettis JS, Smith IB. A diagnostic genetic test for the honey bee tracheal mite. Journal of Apicultural Research. 2007; 46: 195-197.
- Faegri K, Iversen J. Textbook of Pollen Analysis, IV Edition (Blackwell scientific publications. Munksgaard (Ed) Copenhagen. 1989.
- Fakhimzadeh K. Potential of super-fine ground, plain white sugar dusting as an ecological tool for the control of Varroasis in the honey bee. (*Apis mellifera*). American Bee Journal. 2000; 140: 487-491.
- Fakhimzadeh K. Effectiveness of confectioner sugar dusting to knock down *Varroa destructor* from adult Honey bees in laboratory trials. Apidologie. 2001; 32: 139-148.
- Farrar CL. *Nosema* losses in Packaged bees as related to queen supersedure and honey yields. Journal of Economic Entomology. 1947; 40: 333-338.
- Faucon JP, Chauzat MP. Varroasis and others honey bee diseases: major causes for colony mortality in France. Bulletin de l'Academie Veterinaire de France. 2008; 161 (3); 257-264
- Faucon JP, Aurières C, Drajudel P, Mathieu L, Ribière M, Martel AC, Zeggane S, Chauzat MP, Aubert M. Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. Pest Management Science. 2005; 61: 111-125.
- Fenoy S, Rueda C, Higes M, Martín-Hernández R, Aguila C. High-level resistance of *Nosema ceranae*, a parasite of the honeybee, to temperature and desiccation. Applied Environmental Microbiology. 2009; 75: 6886-6889.
- Finley J, Camazine S, Frazier M. The epidemic of honey bee colony losses during the 1995-1996 season. American Bee Journal. 1996; 136 (11): 805-808.
- 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.
- Flores J, Spivak M, Gutierrez I. Spores of *Ascosphaera apis* contained in wax foundation can infect honeybee brood. Veterinary Microbiology. 2005a; 108: 141-144.
- Flores JM, Gutierrez I, Espejo R. The role of pollen in chalkbrood disease in *Apis mellifera*: transmission and predisposing conditions. Mycologia. 2005b; 97: 1171-1176.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2008. A contribution to the international initiative for the conservation and sustainable use of pollinators: rapid assessment of pollinators' status. 2008. www.fao.org/biodiversity/ecosystems/bio-pollinators/en/
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2009. FAOSTAT. <http://faostat.fao.org>
- Forsgren E. European foulbrood in honey bees. Journal of Invertebrate Pathology. 2010; 103: 5-9.
- Forsgren E, Fries I. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. Veterinary Parasitology. 2010; 170: 212-217.

- Forsgren E, Lundhagen AC, Imdorf A, Fries I. Distribution of *Melissococcus plutonius* in honeybee colonies with and without symptoms of European foulbrood. *Microbial Ecology*. 2005; 50: 369-374.
- Franck P, Garnery L, Solignac M, Cornuet JM. The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution*. 1998; 52: 1119-1134.
- Franck P, Garnery L, Celebrano G, Solignac M, Cornuet JM. Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). *Molecular Ecology*. 2000; 9: 907-921.
- Franck P, Garnery L, Loiseau A, Oldroyd BP, Hepburn HR, Solignac M, Cornuet JM. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*. 2001; 86: 420-430.
- Frazier MT, Finley J, Harkness W, Rajotte EG. A sequential sampling scheme for detecting infestation levels of tracheal mites (Heterostigmata: Tarsonemidae) in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Journal of Economic Entomology*. 2000; 93: 551.
- Free JB, Spencer-Booth Y. The longevity of worker honey bees (*Apis mellifera*). *Proceedings of the Royal Entomological Society of London*. 1959; 34: 141-150.
- Fries I. Observations on the development and transmission of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of the honey bee. *Journal of Apicultural Research*. 1989; 28: 107-117.
- Fries I. *Nosema apis* - a parasite in the honey bee colony. *Bee World*. 1993; 74: 5-19.
- Fries I. Protozoa. En: Morse RA., Flottum K. (Ed). *Honey bee pests, predators, and diseases*. Tercera Edición. Al. Root, Medina, Ohio, USA. 1997, pp. 59-76.
- Fries I. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 2010; 105: 73-79.
- Fries I, Feng F. Cross infectivity of *Nosema apis* in *Apis mellifera* and *Apis cerana*. En: *Proceedings of the Apimondia 34th International Apicultural Congress*. Bucharest, Romania. 1995; pp. 151-155.
- Fries I, Rosenkranz P. Number of reproductive cycles of *Varroa jacobsoni* in honey-bee (*Apis mellifera*) colonies. *Experimental and Applied Acarology*. 1996; 20: 103-112.
- Fries I, Forsgren E. *Nosema ceranae* fungerar inte som *Nosema apis*. *Nosema ceranae* does not function as *Nosema apis*. *Bitidningen*. 2009; 107, junio.
- Fries I, Granados RR, Morse RA. Intracellular germination of spores of *Nosema apis* Z. *Apidologie*. 1992; 23: 61-71.
- Fries I, Camazine S, Sneyd J. Population dynamics of *Varroa jacobsoni*: a model and a review. *Bee World*. 1994; 75: 5-28.
- Fries I, Feng F, Da Silva A, Slemenda SB, Pieniasek J. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae). Morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*. 1996; 32: 356-365.
- Fries I, Hansen H, Imdorf A, Rosenkranz P. Swarming in honey bees (*Apis mellifera*) and *Varroa destructor* population development in Sweden. *Apidologie*. 2003; 34: 389-398.
- Fries I, Martín R, Meana A, García-Palencia P, Higes M. Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *Journal of Apicultural Research*. 2006; 45, 230-233.
- Fuchs S, Langenbach K. Multiple infestation of *Apis mellifera* L. brood cells and reproduction in *Varroa jacobsoni* L.Oud. *Apidologie*. 1989; 20: 257-266.

- Furgala B. The effect of the intensity of *Nosema inoculum* on queen supersedure in the honey bee, *Apis mellifera* Linnaeus. *Journal of Insect Pathology*. 1962; 4: 429-432.
- Furgala B, Duff SR, Aboulfaraj S, Ragsdale DW, Hyser RA. Some effects of the honey bee tracheal mite (*Acarapis woodi*) on non-migratory honey bee colonies in east central Minnesota. *American Bee Journal*. 1989; 129: 195-197.
- Furgala B, Mussen EC. Protozoa. En: Morse RA, Nowogrodzki R (Ed). *Honey bee pests, predators, and diseases*. Segunda Edición. Comstock, Ithaca, NY. 1990. pp 49-63.
- Fyg WW. Anomalies and diseases of the queen honey bee. *Annual Review of Entomology*. 1964; 9: 207-224.
- Gajger T, Vugrek O, Grilec D, Petrinc Z. Prevalence and distribution of *Nosema ceranae* in Croatian honeybee colonies. *Veterinari Medicina*. 2010; 55: 457-462.
- García-Palencia P, Martín-Hernández R, González-Porto AV, Marín P, Meana A, Higes M. Natural infection by *Nosema ceranae* causes similar lesions as in experimentally infected caged-worker honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*. 2010; 49: 278-283.
- Garnery L, Vautrin D, Cornuet JM, Solignac M. Phylogenetic relationships in the genus *Apis* inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Apidologie*. 1991; 22: 87-92.
- Garnery L, Cornuet JM, Solignac M. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology*. 1992; 1: 145-154.
- Garnery L, Mosshine EH, Oldroyd BP, Cornuet JM. Mitochondrial-DNA variation in Moroccan and Spanish honey-bee populations. *Molecular Ecology*. 1995; 4: 465-471.
- Garrido C. Reproduktionssteuerung bei der parasitischen Bienenmilbe *Varroa destructor* Anderson & Trueman (ehamals *Varroa jacobsoni*). Tesis Doctoral. Facultad de Biología de la Universidad de Hohenheim. 2004: 82.
- Garrido C, Rosenkranz P. The reproductive program of female *Varroa destructor* mites is triggered by its host, *Apis mellifera*. *Experimental and Applied Acarology*. 2003; 231: 269-273.
- Garrido C, Rosenkranz P, Stürmer M, Rübsam R, Büning J. Toluidine blue staining as a rapid measure for initiation on oocyte growth and fertility in *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*. 2000; 31: 559-556.
- Garrido C, Rosenkranz P, Paxton RJ, Gonçalves LS. Temporal changes in *Varroa destructor* fertility and haplotype in Brazil. *Apidologie*. 2003; 34: 535-541.
- Garrido-Bailón E, Martín-Hernández R, Bernal J, Bernal JL, Martínez-Salvador A, Barrios L, Meana A, Higes M. The detection of Israeli Acute Paralysis virus (IAPV), fipronil and imidacloprid in professional apiaries are not related with massive honey bee colony loss in Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2010; 8 (3): 658-661.
- Gary NE. Actividades y comportamiento de la abeja melífera. En: *La colmena y la abeja melífera*. Editorial Hemisferio sur, Uruguay. 1975, pp 936.
- Gary NE, Page RE Jr, Lorenzen K. Effect of age of worker honey bee (*Apis mellifera*) on tracheal mite (*Acarapis woodi*) infestation. *Experimental and Applied Acarology*. 1989; 7: 153-160.
- Genersch E. American foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2010; 103: 10-19.
- Genersch E, Ashiralieva A, Fries I. Strain- and genotype- specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the causative agent of American foulbrood disease in honey bees. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005; 71: 7551-7555.

- Genersch E, Forsgren E, Pentikäinen J, Ashiralieva A, Rauch S, Kilwinski j, Fries L. Reclasification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2006; 56: 501-511.
- Gerson U, Mozes-Koch R, Cohen E. Enzyme levels used to monitor pesticides resistance in *Varroa jacobsoni*. Journal of Apicultural Research. 1991; 30: 17-20.
- Getis A, Ord JF. The analysis of spatial association by use of distance statistics. Geographical Analysis. 1992; 24: 189-206.
- Ghazoul J. Buzziness as usual? Questioning the global pollination crisis. Trends in Ecology and Evolution. 2005; 20 (7): 367-373.
- 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.
- 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*? Applied of Enviromental Microbiology. 2010; 76: 3032-3038.
- Gilliam M, Shimanuki H. *In vitro* phagocytosis of *Nosema apis* spores by honey-bee Hemocytes. Journal of Invertebrate Pathology. 1967; 9: 387-389
- Gilliam M. Infectivity and survival of the chalkbrood pathogen, *Ascosphaera apis*, in colonies of honey bees, *Apis mellifera*. Apidologie. 1986; 17: 93-100.
- Gilliam M, Lorenz BJ. Enzymatic activity of strains of *Ascosphaera apis*, an entomopathogenic fungus of the honey bee, *Apis mellifera*. Apidologie. 1993; 24: 19-23.
- Gilliam M, Vandenberg JD. Fungi. En: Morse R, Flottum K (Ed), Honey Bee Pests, Predators, and Diseases, third ed. Al Root, Ohio, OH, 1997. pp. 81-110.
- Giordani G. Ricerche di laboratorio su *Acarapis* (Rennie), agente dell'acarosi delle api mellifiche (*Apis mellifera* L.) Note 6. Ann. Acc. Naz. Agric. 1970; 90: 69-76.
- Glinski Z. Studies on pathogenicity of *Ascosphaera apis* for larvae of the honeybee *Apis mellifera* L. Parte II. Relationships between biochemical types and virulence of *A. apis*. Annales Universitatis Mariae Curie Sklodowska Sectio DD. Medicine Veterinary. 1982; 37 (8): 69-77.
- Glinski Z, Buczek K. Response of the *Apoidea* to fungal infections. Apiacta. 2003; 38: 183-189.
- Glinski Z, Jarosz J. Infection and immunity in the honeybee *Apis mellifera*. Apiacta. 2001; 36: 12-24.
- Gochnauer TA. Growth, protease formation and sporulation of *Bacillus larvae* in aerated broth culture. Journal of Invertebrate Pathology. 1973; 22: 251-257.
- Gochnauer TA, Hughes SJ. Detection of *Ascosphaera apis* in honey bee larvae (Hymenoptera: Apidae) from Eastern Canada. Canadian Entomologist. 1976; 108: 985-988.
- Gochnauer TA, Margetts VJ. Decontaminating effect of ethylene oxide on honeybee larvae previously killed by chalkbrood disease. Journal of Apicultural Research. 1980; 19: 261-264.
- Gochnauer TA, Corner J. Detection and identification of *Bacillus larvae* in a commercial pollen sample. Journal of Apicultural Research. 1987; 13: 264-267.
- Gochnauer TA, Furgala B, Shimamuki H. Diseases and enemies of the honeybee. En: The hive and the honey bee. Dadant Hamilton. Illinois, USA. 1975, pp 615-621.
- Gordon RE, Haynes WC, Pang HN. The Genus *Bacillus*. Agriculture Handbook. Washington DC, US Department of Agriculture. 1973; 427.

- Govan VA, Brözel V, Allsopp MH, Davison S. A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998; 64:1983-1985.
- Govan VA, Allsopp MH, Davison S. A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999; 65: 2243-2245.
- Govind S. Innate immunity in *Drosophila*: pathogens and pathways. *Journal of Insect Science*, 2008; 15: 985-988.
- Granato A, Calderone M, Falcaro C, Mutinelli F. Presence of *Nosema Apis* and *Nosema ceranae* in Italian apiaries, Proc. Workshop "Nosema disease: lack of knowledge and work standardization" (COST Action FA0803) Guadalajara, <http://www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online> (acceso 20 Nov. 2009).
- Grant G, Nelson D, Olsen P, Rice WA. The ELISA detection of tracheal mites in whole honey bee samples. *American Bee Journal*. 1993; 133: 652-655.
- Gray FH, Cali A, Briggs JD. Intracellular stages in the life cycle of the Microsporidian *Nosema apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1969; 14: 391-394.
- Gregorc A, Bowen ID. Histopathological and histochemical changes in honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) after infection with *Bacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood disease. *Cell Biology International*. 1998; 22: 137-144.
- Gross M. Bee puzzles. *Current Biology*. 2007; 17: R389.
- Gross M. Pesticides linked to bee deaths. *Current Biology*. 2008; 18: R684.
- Guzmán-Novoa E, Eccles L, Calvete Y, McGowan J, Kelly PG, Correa-Benítez A. *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. *Apidologie*. 2010; 41: 443-450.
- Ha JS, Lee HM, Lee DB, Son WG, Lim YK, Yoon BS. Rapid identification of *Melissococcus plutonius* causing european foulbrood disease in honeybee by real-time PCR. *Korean Journal of Apiculture*. 2006; 21: 19-26.
- Hainzl D, Casida JE. Fipronil insecticida: Novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 1996; 93: 12764-12767.
- Halm MP, Rortais A, Arnold G, Tase'í N, Rault S. New risk assessment approach for systematic insecticides the case of honey bees and imidacloprid (Gaucho). *Environmental Science and Technology*. 2006; 40: 2448-2454.
- Han SH, Lee DB, Lee DW, Kim EH, Yoon BS. Ultra-rapid real-time PCR for the detection of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood (AFB). *Journal of Invertebrate Pathology*. 2008; 99: 8-13.
- Hansen H, Petersen H. Residues in honey and wax after treatment of bee colonies with bromopropylate. *Danisch Research Service of Plant and Soil Science*. 1988: 1921.
- Hansen H, Brødsgaard CJ. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World*. 1999; 80: 5-23.
- Harizanis PC. Infestation of queen cells by the mite *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*. 1991; 22: 533-538.
- Harris W, Harbo JR. Natural and Supressed Reproduction of *Varroa*. *Bee Culture*. 2001; 129: 34-38.
- Haseman L. How long can spores of American foulbrood live? *American Bee Journal*. 1961; 101: 298-299.

- Haynes WC. The catalase test. An aid in the identification of *Bacillus larvae*. American Bee Journal. 1972; 112: 10-131.
- Heath LAF. Development of chalkbrood in a honey bee colony: chalk brood pathogens: a review. Bee World. 1982; 63: 119-135.
- Heath LAF, Gaze BM. Carbon dioxide activation of spores of the chalkbrood fungus *Ascosphaera apis*. Journal of Apicultural Research 1987; 26: 243-246.
- Hernández GR. Trashumancia y variabilidad genética de las poblaciones de *Apis mellifera ibérica* (Hymenoptera, Apidae) de la región de Murcia. Tesina Facultad de Veterinaria. Facultad de Zoología y Antropología Física. Universidad de Murcia. España. 2002, pp 50.
- Heyndrickx M, Vandemeulebroecke K, Hoste B, Janssen P, Dersters K, De Vos P, Logan NA, Ali N, Berkeley R. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. International Journal of Systematic Bacteriology. 1996; 46: 270-279.
- Hibbet DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lucking R, Lumbsch HT, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castelbury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Koljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schussler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycological Research. 2007; 111: 509-547.
- Higes M, Martín R, Meana A. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. Journal of Invertebrate Pathology. 2006; 92: 93-95.
- Higes M, García-Palencia P, Martín-Hernández R, Meana A. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with the Microsporidia *Nosema ceranae*. Journal Invertebrate Pathology. 2007; 94, 211-217.
- 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. Environmental Microbiology. 2008a; 10: 2659–2669.
- Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, Botías C, García-Palencia P, Meana A. Regurgitated pellets of *Merops apiaster* as fomites of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores. Environmental Microbiology. 2008b; 5: 1374-1379.
- Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, García-Palencia P, Meana A. Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honey bees. Journal of Invertebrate Pathology. 2008c; 97: 76-78.
- 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 profesional apiaries. Environmental Microbiology Reports. 2009a; 1: 110-113.

- Higes M, Martín-Hernández R, García-Palencia P, Marín P, Meana A. Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (Microsporidia) from worker honeybees to queens (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports*. 2009b; 1: 495-498.
- Higes M, Martín-Hernández R, Meana A. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie*. 2010a; 41: 375-392.
- Higes M, Martín-Hernández R, Martínez-Salvador A, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, Meana A, Bernal JL, Nozal MJ, Bernal J. A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environmental Microbiology Reports*. 2010b; 2: 243–250.
- Hirschfelder H, Sachs H. Recent research on acarine disease. *Bee World*. 1952; 33: 201-209.
- Hirst S. On the mite associated with Isle of Wight disease. *Annals and Magazine of Natural History*. Taylor y Francis Ltd: London, 1921. Series 9, 7: 511-517.
- Hitchcock JD, Christensen M. Occurrence of chalk brood (*Ascosphaera apis*) in honey bees in the United States. *Mycologia*. 1972; 64: 1193-1198.
- Hitchcock JD, Stoner A, Wilson WT, Menapace DM. Pathogenicity of *Bacillus pulvificiens* to honeybee larvae of various ages (*Hymenoptera: Apidae*). *Journal Kansas Entomology Society*. 1979; 52: 238-246.
- Hornitzky MAZ. The examination of honey bee virus in New South Wale. *Australasian Beekeeper*. 1981; 82: 261-262.
- Hornitzky MAZ. Bee diseases research. *Australasian Beekeeper*. 1982; 84: 7-10.
- Hornitzky MAZ. Major bee diseases in Australia. *Australian Standard diagnostic Techniques for Animal Diseases*. 1985; 35: 17.
- Hornitzky MAZ. The pathogenicity of *Paenibacillus larvae* subs. *larvae* spores and vegetative cells to honey bee (*Apis mellifera*) colonies and their susceptibility to royal jelly. *Journal of Apicultural Research*. 1998; 37: 267-271.
- Hornitzky MAZ. Literature review of chalkbrood. A report for de RIRDC. Publication No. 01/150, Kingston, ACT, AU.2001.
- Hornitzky MAZ, Wilson SC. A system for the diagnosis of the major bacterial brood diseases of honeybees. *Journal of Apicultural Research*. 1989; 28: 191-195.
- Hornitzky MAZ, Smith L. Procedures for the culture of *Melissococcus plutonius* from diseased brood and bulk honey samples. *Journal of Apicultural Research*. 1998; 37: 293-294.
- Hornitzky MAZ, Smith L. The sensitivity of Australian *Melissococcus plutonius* isolates to oxytetracycline hydrochloride. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 1999; 39: 881-883.
- Hrabák J, Martínek K. Screening of secreted proteases of *Paenibacillus larvae* by using substrate-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Apicultural Research*. 2007; 46: 160-164.
- Huang WF, Jiang JH, Chen YW, Wang CH.) A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie*. 2007; 38: 30–37.
- Ifantidis MD. Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* in worker and drone honey bee brood cells. *Journal of Apicultural Research*. 1983; 22: 200-206.
- Ifantidis MD. Re-examination of some parameters concerning reproduction of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Proceedings of the International Symposium on Recent Research on Bee Pathology*, Gent, Belgium. 1990; 20-26.

- Ifantidis MD, Thrashyvolou A, Pappas M. Some aspects of the process of *Varroa jacobsoni* mite entrance into honey bee (*Apis mellifera*) brood cells. *Apidologie*. 1988; 19: 387-396.
- Ifantidis MD, Karamanidou A, Katikou P. Juvenile mortality of the female descendants in the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in worker brood of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*. 1999; 38: 25-32.
- Imdorf A, Charriere JD, Maquelin C, Kilchenmann V, Bachofen B. Alternative *Varroa* Control. *American Bee Journal*. 1996; 136: 189-193.
- James RR, Skinner JS. PCR diagnostic methods for *Ascosphaera* infections in bees. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2005; 90: 98-103.
- James TJ, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio J, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung G, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schüßler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JT, White MM, Griffith GW, Davies RD, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossman AR, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lücking R, Büdel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW, Vilgalys V. Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*. 2006; 443: 818-822.
- 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. *Journal of Invertebrate Pathology*. doi: 10.1016/j.jip.2012.01.007
- Jean-Prost P. *Apicultura*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 1989.
- Jiménez JJ, Bernal JL, Del Nozal MJ, Martín MT. Residues of organic contaminants in beeswax. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2005; 107: 896-902.
- Johansen CA, Brown FC. Effect of methyl parathion vapors from contaminated pollen collected by honey bee. *Environmental Entomology*. 1972; 1: 385-386.
- Johnson BR. Organization of work in the honeybee: a compromise between division of labour and behavioural flexibility. *Proceedings of the Royal Society*. 2003; 270: 147-152.
- Johnson BR, Ellis MD, Mullin CA, Frazier M. Pesticides and honey bee toxicity-USA. *Apidologie*. 2010; 41: 312-331.
- Jones JC, Oldroyd BP. Nest thermoregulation in social insects. *Advances in Insect Physiology*. 2007; 33: 153-191.
- Julian GS, Bulla LAJ. Physiology of sporeforming bacteria associated with insects. *Journal of Bacteriology*. 1971; 108: 828-834.
- Kanbar G, Engels W. Ultrastructure and bacterial infection of wounds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae punctured by *Varroa* mites. *Parasitology*. 2003; 9: 349-354.
- Kang YB, Kim DS, Jang DH. Experimental studies on the pathogenicity and developmental stages of *Nosema apis*. *Korean Journal of Veterinary Research*. 1976; 16: 11-25.
- Katznelson H. *Bacillus pulvificiens* (n. sp.), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae. *J. Bacteriol.* 1950; 59: 153-155.
- Katznelson H, Jamieson CA. Control of *Nosema* disease of honey-bees with fumagilin. *Science*. 1952; 115: 70-71.

- Katznelson H, Robb JA. The use of gamma radiation from Cobalt 60 in the control of diseases of the honeybee and the sterilisation of honey. *Canadian Journal of Microbiology*. 1962; 8: 175-179.
- Kerr EW, Lello E. Sting glands in stingless bees. A vestigial character (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the New York Entomological Society*. 1962; 70: 190-214.
- Kilwinski J, Peters M, Ashiralieva A, Genersch E. Proposal to reclassify *Paenibacillus larvae subsp. pulvificiens* DSM 3615 (ATCC 49843) as *Paenibacillus larvae subsp. larvae*. Results of a comparative biochemical and genetic study. *Veterinary Microbiology*. 2004; 104: 31-42.
- Kirchner WH. Mad-bee-disease? Sublethal effects of imidacloprid ("Gaucho") on the behaviour of honey-bees. *Apidologie*. 1999; 30: 422.
- 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*. *Journal of Invertebrate Pathology* 2007; 96: 1-10.
- Klein AM, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London*. 2007; 274: 303-313.
- Koch H, Weisser P. Exposure of honey bee during pesticide application under field conditions. *Apidologie*. 1997; 28: 439-447.
- Koenig JP, Boush GM, Erickson Jr EH. Effect of type of brood comb on chalk brood disease in honeybee colonies. *Journal of Apicultural Research*. 1986; 25: 58-62.
- Koenig JP, Boush GM, Erickson Jr EH. Effect of spore introduction and ratio of adult bees to brood on chalkbrood in honeybee colonies. *Journal of Apicultural Research*. 1987; 26: 191-195.
- Kojima Y, Yoshiyama M, Kimura K, Kadowaki T. PCR-based detection of a tracheal mite of the honey bee *Acarapis woodi*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2011; 108: 135-137.
- Kolev Da, Shabanov M. Changes in the haemolymph proteins of drone larvae and pupae infested by *Varroa jacobsoni* Oudemans 1904. *Acta Microbiologica Bulgarica*. 1989; 21: 41-44.
- Komissar AD. Heat treatment of bees. *Pchelovodsvo*. 1979; (6): 17-18.
- Korpela S. *Nosema* situation in Finland. 5th COLOSS Meeting, Montpellier. http://www.coloss.org/documents/Vth_Coloss_Conference_Proceedings.pdf/ (accesso 20 Nov. 2009).
- Kovac h, Crailsheim K. Life span of *Apis mellifera carnica* Pollm. Infested by *Varroa jacobsoni* in relation to season and extent of infestation. *Journal of Apicultural Research*. 1988; 27:230-238.
- Kralj J, Fuchs S. Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers. *Apidologie*. 2006; 37: 577-587.
- Kralj J, Fuchs S. *Nosema* sp. influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*, foragers. *Apidologie*. 2010; 41: 21-28.
- Kralj J, Brockmann A, Fuchs S, Tautz J. The parasitic mite *Varroa destructor* affects non-associative learning in honey bee foragers, *Apis mellifera* L. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, Behavioral and Physiology*. 2007; 193: 363-370.

- Kraus B. Preferences of *Varroa jacobsoni* for honey bees (*Apis mellifera* L.) of different ages. *Journal of Apicultural Research* 1993; 32: 57:64.
- Kronenberg F, Heller CH. Colonial thermoregulation in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systematic and Environmental Physiology*. 1982; 148: 65-76.
- Kuonen LPS, Calderone NW. Transfers of *Varroa* mites from newly emerged bees: preferences for age- and function- specific adult bees. *Journal of Insect Behaviour* 1997; 10: 213-228.
- Kulinčević JM, Rothenbühler WC. Selection for resistance and susceptibility to hairless-black syndrome in the honeybee. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1975; 25: 289-295.
- Kubik M, Nowacki J, Pidek A, Warakomska Z, Michalczyk L, Goszczynski W. Pesticide residues in bee products collected from cherry trees protected during blooming period with contact and systemic fungicides. *Apidologie*. 1999; 30: 521-532.
- Lange AB, Naztkii KV, Tatzii VM. The biology of the mite *Varroa*. *Veterinary*. 1976; 7: 74-77.
- Lanzi G, De Miranda JR, Boniotti MB, Cameron CE, Lavazza A, Capucci L, Camzine SM, Rossi C. Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Virology*. 2006; 80: 4998-5009.
- Larsson R. Ultrastructure, function, and classification of Microsporidia. *Progress in Protistology*. 1986; 1: 325-390.
- Lauro FM, Favaretto M, Covolo L, Rasso M, Bertoloni G. Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *International Journal of Food Microbiology*. 2003; 81: 195-201.
- Le Conte Y, Arnold G, Trouiller J, Masson C, Chape B, Ourisson G. Attraction of the parasitic mite *Varroa* to the drone larvae of honey bees by simple aliphatic esters. *Science*. 1989; 245: 638-639.
- Le Conte Y, Arnold G, Trouiller J, Masson C. Identification of a brood pheromone in honeybees. *Naturwissenschaften*. 1990; 77: 334-336.
- Lee HM, Yoo MS, Kim EH, Lee DW, Han SH, Yoon BS. Rapid detection of *Ascophæra apis* causing Chalkbrood disease by using quick real-time PCR. *Korean Journal of Apiculture*. 2006; 21: 107-112.
- 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.
- Le Faouder J, Bichon E, Brunschwig P, Landelle R, Andre F, Le Bizet B. Transfer assessment of Fipronil residues from feed to cow Milk. *Talanta*. 2007; 73: 710-717.
- Lello E. Glândulas anexas no aparelho do ferrão das abelhas (Hymenoptera: Apidae). Tesis doctoral. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Rio Claro, Brasil. 1968.
- Lello E. Adnexal glands of the sting apparatus of bees. *Anatomy and Histology I. Hymenoptera: Colletidae and Andrenidae*. *Journal of the Kansas Entomological Society*. 1971; 44: 5-13.
- Liljas L, Tate J, Line T, Christian P, Johnson JE. Evolutionary and taxonomic implications of conserved structural motifs between picornaviruses and insect picorna-like viruses. *Archives of Virology*. 2002. 147, 59–84.
- Lindström A, Fries I. Sampling of adult bees for detection of American foulbrood (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) spores in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Journal of Apicultural Research*. 2005; 44: 82-86.

- Liu TP. Ultrastructure of the midgut of the worker honeybee *Apis mellifera* heavily infected with *Nosema apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1984; 44: 282-291.
- Liu TP. Ultrastructural changes in the secretion granules of the hypopharyngeal glands of the honeybee infected by *Nosema apis* and after treatment with fumagillin. *Tissue Cell*. 1990; 22; 523-531.
- Liu TP. Oocytes degeneration in the queen honey bee after infection by *Nosema apis*. *Tissue Cell*. 1992; 24: 131-138.
- Llorente J. Estudios sobre el tratamiento y control químico de la infestación por *Varroa jacobsoni* Oud. en Castilla-La Mancha. Tesis Doctoral. León, Universidad de León. 1993.
- Llorente J. Principales enfermedades de las abejas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 2003.
- Lo N, Gloag RS, Anderson DL, Oldroyd BP. A molecular phylogeny of the genus *Apis* suggests that the giant honeybee of the Philippines, *A. breviligula* Maa, and the plains honeybee of southern India, *A. indica* Fabricius, are valid species. *Systematic Entomology*. 2010; 35: 226-233.
- Lodesani M, Pellacani A, Bergomi S, Carpana E, Rabitti T, Lasagni P. Residue determination for some products used against *Varroa* infestation in bees. *Apidologie*. 1992; 23: 257-272.
- Lodesani M, Colombo M, Spreafico M. Ineffectiveness of Apistan treatment against the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in several districts of Lombardy (Italy). *Apidologie*. 1995; 26: 67-72.
- Loglio G, Pinessi E. Impegno della farina de frutamento nella lotta ecologica contro la varroasi. *Apicoltore Moderno*. 1992; 83: 169-174.
- Loglio G, Pinessi E. Impegno de la farina di frutamento per valutare I livelli di infestazione da *Varroa*. *Apicoltore Moderno*. 1993; 84: 105-109.
- Lotmar R. Der Eiweiss-Stoffwechsel im Bienenvolk (*Apis mellifica*) während der Überwinterung. *Landwirtschaft Jahrb Schweiz*. 1939; 54: 34-69.
- Lu R, Goerzen DW, Rang GH. Use of RAPD analysis for in situ identification of *Ascosphaera aggregata* and *Ascosphaera larvis* in larval cadavers of the alfalfa leafcutting bee, *Megachile rotundata*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1996; 68: 78-83.
- Maasen A. Weitere Mitteilungen Aber die Seuchenhaften Brutkrankheiten der Bienen. *Mitt.Biol. Zent Anst*. 1913; 14: 48-58.
- Maghrabi HA, Kish LP. Isozyme characterization of *Ascosphaerales* associated with bees. II *Ascosphaera major*, *Ascosphaera atra*, and *Ascosphaera asterophora*. *Mycologia*. 1985; 77: 366-372.
- Maghrabi HA, Kish LP. Isozyme characterization of *Ascosphaerales* associated with bees. IV. Analyses. *Mycologia*. 1987; 79: 519-523.
- Maghrabi HA, Kish LP. Isozyme characterization of *Ascosphaerales* associated with bees. I. *Ascosphaera apis*, *Ascosphaera proliferada*, and *Ascosphaera aggregata*. *Mycologia*. 2001; 77: 358-365.
- Maistrello L, Lodesani M, Costa C, Leonardi F, Marani G, Caldon M, Mutinelli F, Granato A. Screening of natural compounds for the control of *Nosema* disease in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*. 2008; 39: 436-445.
- Malloch D. The plectomycete centrum. En: Reynolds, D.R (Ed.), *Ascomycete Systematics: The Luttrellian Concept*. Springer-Verlag, New York. 1981. pp. 73-91.

- Malone LA, Gatehouse HS. The ribosomal RNA gene region of *Nosema apis* (Microsporida): DNA sequence for small and large subunit rRNA genes and evidence of a large tandem repeat unit size. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1998; 71 (2): 97-105.
- Malone LA, Gatehouse HS, Tregida EL. Effects of Time, Temperature, and Honey on *Nosema apis* (Microsporida: Nosematidae), a Parasite of the Honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 2001; 77: 258-268.
- Martin SJ. Ontogenesis of the mite *Varroa Jacobsoni* Oud. In worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Experimental and Applied Acarology*. 1994; 18: 87-100.
- Martin SJ. Reproduction of *Varroa jacobsoni* in cells of *Apis mellifera* containing one or more mother mites and the distribution of these cells. *Journal of Apicultural Research*. 1995; 34: 187-196.
- Martin SJ. Life and death of *Varroa*. En Munn P, Jones R, editores. *Varroa! Fight the mite*. Cardiff. International Bee Research Association. 1997; 3: 10.
- Martin SJ. The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honey bee colonies: A modelling approach. *Journal of Applied Ecology*. 2001; 38:1082-1093.
- Martin SJ, Kemp D. Average number of reproductive cycles performed by *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Journal Apicultural Research*. 1997; 36: 113-123.
- Martín-Hernández R, Meana A, Prieto L, Martínez Salvador A, Garrido-Bailón E, Higes M. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007; 73: 6331-6338.
- Martín-Hernández R, Meana A, García-Palencia P, Marín P, Botías C, Garrido-Bailón E, Barrios L, Higes M. Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporida. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009; 75: 2554-2557.
- Martín-Hernández R, Botías C, Garrido-Bailón E, Martínez-Salvador A, Prieto L, Meana A, Higes M. Microsporida infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *N. ceranae* replacing *N. apis*. *Environmental Microbiology*. 2011. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02645.x
- Martínez C. Notes on the prey taken by bee-eaters *Merops apiaster* at a colony in central Spain. *Alauda*. 1984; 52: 45-50.
- Martínez Fernández AR, Cordero del Campillo M. El parasitismo y otras asociaciones biológicas. Parásitos y hospedadores. En Cordero del Campillo, Rojo Vázquez FA. *Parasitología Veterinaria*. Ed. McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.U., Madrid. 1999.
- Martínez J, Simon V, González B, Conget P. A real-time PCR-based strategy for the detection of *Paenibacillus larvae* vegetative cells and spores to improve the diagnosis and the screening of American foulbrood. *Letters in Applied Microbiology*. 2010; 50: 603-610.
- Mathenson A. World bee health report. *Bee World*. 1993; 74: 176-212.
- Mathenson A. World bee health update. *Bee World*. 1996; 77: 45-51
- Mathieu L, Faucon JP. Changes in the response time for *Varroa jacobsoni* exposed to amitraz. *Journal of Apicultural Research*. 2000; 39 (3-4): 155-158.
- Mattila HR, Otis GW. Effects of pollen availability and *Nosema* infection during spring on division of labour and survival of worker honey bees. *Environmental Entomology*. 2006; 35: 708-717.
- Matus F, Sarbak I. Occurrence of chalkbrood disease in Hungary. *Magyar Allat Lapja*. 1974; 29: 250-255.

- Maul V, Klepsch A, Assamann-Werthmüller U. Das bannwabenverfahren als element imkerlicher betriebsweise bei starkem befall mit *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*. 1998; 19: 139-154.
- Maurizio A. Über die Kaltbrut (Pericystis-Mycose) der Bienen. *Archiv Bienenkunde*. 1934; 15: 165-193.
- Maurizio A. The influence of pollen feeding and brood rearing on the length of life and physiological conditions of the honeybee. *Bee World*. 1950; 31: 9-12.
- Mayo MA. Virus taxonomy. *Houston. Archives of Virology*. 2002; 147: 1071-1076.
- McGregor SE. Insect pollination of cultivated crop plants. US Department of Agriculture, Washington, D. C. 1976.
- McKee BA, Djordjevic SP, Goodman RD, Hornitzky MAZ. The detection of *Melissococcus pluton* in honey bees (*Apis mellifera*) and their products using a hemi-nested PCR. *Apidologie*. 2003; 34: 19-27.
- McKee BA, Goodman RD, Hornitzky MAZ. The transmission of European foulbrood (*Melissococcus plutonius*) to artificially reared honey bee larvae (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*. 2004; 43: 93-100.
- McMullan JB, Brown MJF. A qualitative model of mortality in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with tracheal mites (*Acarapis woodi*). *Experimental and Applied Acarology*. 2009; 47: 225-234.
- M'Diaye K, Bounias M. Sublethal effects of the formamidin amitraz on honeybees gut lipids following *in vivo* injections. *Biomedical and Environmental Sciences*. 1991; 4: 376-383.
- Meana A, Martín-Hernández R, Higes M. The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. *Journal of Apicultural Research and Bee World*. 2010; 49: 212-214.
- Mehr Z, Menapace DM, Wilson WT, Scaket RR. Studies on the initiation and Spreads of chalkbrood within an apiary. *American Bee Journal*. 1976; 116: 266-268.
- Message D, Gonçalves LS. Effect of size of worker brood cells of Africanized honey bees on infestation and reproduction of the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*. 1995; 26: 381-386.
- Meusel MS, Moritz RFA. Transfer of paternal mitochondrial DNA in fertilization of honeybees (*Apis mellifera* L.) eggs. *Current Genetics*. 1993; 24: 539-543.
- Mickey RM, Greenland S. The impact of confounder selection criteria on effect estimation. *American Journal of Epidemiology*. 1998; 129 (1): 125-137.
- Milani N. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to pyrethroids: a laboratory assay. *Apidologie*. 1995; 26: 415-429.
- Milani N. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie*. 1999; 30: 229-234.
- Milani N, Nannelli R. The tarsal sense organ in *Varroa jacobsoni* Oud.: SEM observations. *Proceedings of a Meeting of EC-Experts Group, Udine, Italy*. 1988; 71-82.
- Miyagi T, Peng CYS, Chuang RY, Mussen EC, Spivak MS, Doi RH. Verification of oxytetracycline-resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2000; 75: 95-96.
- Moeller FE. Nosema disease – its control in honey bee colonies. U. S. Department of Agricultural Technical Bulletin Nº 1569, Washington, USA. 1978.
- Mondragón L, Spivak M, Vandame R. A multifactorial study of the resistance of honeybees *Apis mellifera* to the mite *Varroa destructor* over one year in Mexico. *Apidologie*. 2005; 36: 345-358.

- Mondragón L, Martin S, Vandame R. Mortality of mite offspring: a major component of *Varroa destructor* resistance in a population of Africanized bees. *Apidologie*. 2006; 37: 67-74.
- Morse RA. Arachnids: Acarina (mites and ticks). En: Honey Bee Pests, Predators and Diseases, 2nd edn, Morse RA, Nowogrodzki R (Eds). Cornell University Press, Ithaca, USA. 1978; pp. 430.
- Mozes-Koch R, Gerson U. Guanine visualization: a new method for diagnosing tracheal mite infestation of honey bees. *Apidologie*. 1997; 28: 3-9.
- Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, VanEngelsdorp D, Pettis JS. *PLoS ONE*. 2010; 5: 1-19.
- Muñoz I, Garrido-Bailón E, Martín-Hernández R, Meana A, Higes M, De la Rúa P. Genetic profile of *Varroa destructor* infesting *Apis mellifera iberiensis* colonies. *Journal Apicultural Research*. 2008; 47: 310-313.
- Murray KD, Aronstein KA, Jones WA. A molecular diagnostic method for selected *Ascosphaera* species using PCR amplification of internal transcribed spacer regions of rDNA. *Journal of Apicultural Research*. 2005; 44: 61-64.
- Nannelli R. Ulteriori conoscenze sulla morfologia e lo sviluppo, della larva e delle ninfe di *Varroa jacobsoni* Oud (Mesostigmata: Varroidae). Estratto da REDIA. 1985; 67: 287-303.
- Nanetti A. ApiHerb as an alternative product to treat Nosema infection. 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).
- Naug D, Gibbs A. Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie*. 2009; 40: 595-599.
- Navajas M, Anderson DL, De Guzmán LI, Huang ZY, Clement J, Zhou T, Le Conte Y. New Asian Types of *Varroa Destructor*: A Potential New Threat for World Apiculture. *Apidologie*. 2010; 41:181-193.
- Nazzi F, Gratti M, Milani N. La reinfestazione degli apiari trattati da parte di *Varroa jacobsoni* Oud.: andamento stagionale e aspetti statistici. *Apicoltura*. 1995; 10: 99-107.
- Nei M, Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution*. 1986; 3: 418-426.
- Nelson DL, Gochnauer TA. Field and laboratory studies on Chalkbrood disease of honey bees. *American Bee Journal*. 1982; 122: 29-32.
- Neuendorf S, Hedtke K, Tangen G, Genersch E. Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen. *Microbiology*. 2004; 150, 2381-2390.
- Neumann P, Carreck NL. Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*. 2010; 49: 1-6.
- Neveu-Lemaire M. *Traité d'Entomologie Médicale et Vétérinaire*, Vigot Frères, Éditeurs, Paris. 1938.
- 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? *Journal of Economic Entomology*. 2009; 102: 616-623.
- Nixon M. Preliminary world maps of honey bee diseases and parasites. *Bee World*. 1982; 63: 23-24.

- Nozal MJ, Berna JL, Martín MT, Bernal J, Alvaro A, Martín-Hernández R, Higes M. Trace analysis of fumagillin in honey by liquid chromatography-DAD-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2008; 1190: 224-231.
- Office International des Epizooties (OIE), 2004. Manual of standards for diagnostic test and vaccines. <http://www.oie.int/eng/norms/mmanual/2004>.
- Office International des Epizooties (OIE). 2008. Manual of standards for diagnostic test and vaccines. <http://www.oie.int/eng/norms/mmanual/2008>.
- Office International des Epizooties (OIE), 2012. Lista de enfermedades 2012. <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2012/>.
- Oldroyd BP. Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. *Trends in Ecology and Evolution*. 1999; 14: 312-315.
- Oldroyd BP. What's killing American honey bees? *PLoS Biology*. 2007; 5 (6): e168.
- Oldroyd BP, Wongsiri S. Asian honey bees: biology, conservation and human interactions. Cambridge (MA): Harvard University Press. 2006.
- Olsen PE, Grant GA, Nelson DL, Rice WA. Detection of American foulbrood disease of the honeybee, using a monoclonal antibody specific to *Bacillus larvae* in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Canadian Journal of Microbiology*. 1990; 36: 732-735.
- Orantes FJ, García P. Nosema disease in honey bee (*Apis mellifera* L) infested with *Varroa* mites in southern Spain. *Apidologie*. 1997; 28: 105-112.
- Orantes FJ, Benítez R, García P. A scientific note on the current low of honey bee tracheal mite in southern Spain. *Apidologie*. 1997; 28: 149-150.
- Ord JK, Getis A. Local spatial autocorrelation statistics: distributional issues and an application. *Geographical Analysis*. 1995; 27: 286-306.
- Orden de 5 de mayo de 1998 por la que se establece un régimen de ayudas a la apicultura en el marco del Programa Nacional Anual. Boletín Oficial del Estado 110, 8 de mayo de 1998.
- Orden APA/735/2008, de 14 de marzo, por la que se modifica el anexo II del Real Decreto 608/2006, de 19 de mayo, por el que se establece y regula un Programa nacional de lucha y control de las enfermedades de las muñecas de la miel. Boletín Oficial del Estado 68, 19 de marzo de 2008.
- Otis GW, Bath JB, Randall DL, Grant GM. Studies of the honeybee tracheal mite (*Acarapis woodi*) (Acari: Tarsonemidae) during winter. *Canadian Journal of Zoology*. 1988; 66: 2122-2127.
- Otis GW, Scott-Dupree CD. Effects of *Acarapis woodi* on overwintered colonies of honey bees (Hymenoptera: Apidae) in New York. *Journal of Economic Entomology*. 1992; 85: 40-46.
- Otte E. Contribution to the laboratory diagnosis of American foulbrood of the honey bee with particular reference to the fluorescent antibody technique. *Apidologie*. 1973; 4: 331-339.
- Oudemans AC. On a new genus and species of parasitic acari. Notes from the Leyden Museum. 1904; 24: 216-222.
- Pajuelo AG, Fernández Arroyo MP. Enfermedades de las abejas en España. XXVII Congreso Internacional de Apicultura. Atenas. Ed. Apimondia. 1979: 357-361.
- Palmer MR, Smith DR, Kaftanoglu O. Turkish honeybees: Genetic variation and evidence for a fourth lineage of *Apis mellifera* mtDNA. *The Journal of Heredity*. 2000; 91: 42-46.

- 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.
- Pederson K. Chalkbrood: possible methods of control, and the effect of additional heat. *Birkteren*. 1976; 92: 18-22.
- Peng YS, Peng KY. A study on the possible utilization of immunodiffusion and immunofluorescence techniques as diagnostic methods for American foulbrood of honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 1979; 33: 284-289.
- Peng YS, Nasr ME. Detection of honey bee tracheal mites (*Acarapis woodi*) by simple staining techniques. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1985; 46: 325-331.
- Peng YS, Mussen EC, Fong A, Cheng P, Wong G, Montague MA. Laboratory and field studies on the effect of the antibiotic tylosin on honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) development and prevention of American foulbrood disease. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1996; 67: 65-71.
- Pettis JS. Honey bee colony losses in the United States. En: OIE Symposium Diagnosis and Control of Bee diseases. 26-28 de Agosto, Freiburg, Alemania. 2008.
- Pettis JS, Wilson WT. Life story of the honey bee tracheal mite (Acari: Tarsonemidae). *Annals of the Entomological Society of American*. 1996; 89: 368-374.
- Pettis JS, Wilson WT, Eischen FA. Nocturnal dispersal by female *Acarapis woodi* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Experimental and Applied Acarology*. 1992; 15: 99-108.
- Phelan LP, Smith AW, Needham GR. Mediation of host selection by cuticular hydrocarbons in the honeybee tracheal mite *Acarapis woodi* (Rennie). *Journal of Chemical Ecology*. 1991; 17: 463-473.
- Piccini C, D'Alessandro B, Antúnez K, Sunino P. Detection of *Penibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in naturally infected bee larvae and artificially contaminated honey by PCR. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2002; 18: 761-765.
- Piccirillo GA, De Jong D. The influence of Broad comb cell size on the reproductive behavior of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* in Africanized Honey bee colonies. *Genetics and Molecular Research*. 2003; 2: 36-42.
- Pickard RS, El-Shemy AAM. Seasonal variation in the infection of honeybee colonies with *Nosema apis* Zander. *Journal of Apicultural Research*. 1989; 28 (2): 93-100.
- Pinnock DE, Featherstone NE. Detection and quantification of *Melissococcus pluton* infection in honeybee colonies by means of enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Apicultural Research*. 1984; 23: 168-170.
- Poggeler S. Mating-type genes for classical strain improvements of *Ascomycetes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001; 56: 589-601.
- Popa A. *Varroa* disease of honeybee. *Bulletin de OIE*. 1985; 93: 1423-1438.
- Prier KRS, Lighthart B, Bromenshenk JJ. Adsorption model of aerosolized bacterial spores (*Bacillus subtilis* variety *niger*) onto free-flying honey bees (Hymenoptera: Apidae) and its validation, *Environmental Entomology*. 2001; 30: 1188-1194.
- Puerta F, Flores JM, Bustos M, Padilla F, Campano F. Chalkbrood development in honeybee Broad under controlled conditions. *Apidologie*. 1994; 25: 540-546.
- Qin X, Evans JD, Aronstein KA, Murray KD, Weinstock GM. Genome sequences of the Honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. *Insect Journal of Molecular Biology*. 2006; 15(5): 715-718.

- Rademacher E. La varroosis en la República Federal de Alemania. *Vida Apícola*. 1988; 32: 49-52.
- Raffiudin R, Crozier RH. Phylogenetic analysis of honey bee behavioural evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2007; 43: 543-552.
- Ragsdale D, Furgala B. A serological approach to the detection of *Acarapis woodi* parasitism in honey bees using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Apidologie*. 1987; 18: 1-10.
- Ragsdale D, Kjer KM. Diagnosis of tracheal mite (*Acarapis woodi* Rennie) parasitism of honey bees using a monoclonal based enzyme-linked immunosorbent assay. *American Bee Journal*. 1989; 129: 550-553.
- Ramírez W. ¿Es posible atajar el ácaro *Varroa* con polvo? *Apiacta*. 1989; XXIV: 3-4.
- Ramírez W. Conformation of the ambulacrum of *Varroa jacobsoni* Oud. and mite control with dust. *American Bee Journal*. 1994; 134: 835.
- Ramírez-Gómez C. Nota sobre el hallazgo de *Acarapis woodi* en la isla de Mallorca. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural*. 1949; 47: 611-618.
- Raper KB, Fennell DI. The genus *Aspergillus*. Williams y Wilkins. Baltimore. 1965.
- Rath W. Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. And *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*. 1999; 30: 97-110.
- Real Decreto 4/2001, de 12 de enero, por el que se establece un régimen de ayudas a la utilización de métodos de producción agraria compatibles con el medio ambiente. *Boletín Oficial del Estado* 12, 13 de enero de 2001.
- Real Decreto 708/2002, de 19 de julio, por el que se establecen medidas complementarias al Programa de Desarrollo Rural para las Medidas de Acompañamiento de la Política Agraria Común. *Boletín Oficial del Estado* 175, 23 de julio de 2002.
- 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.
- Real Decreto 479/2004, de 26 de marzo, por el que se establece y regula el Registro general de explotaciones ganaderas. *Boletín Oficial del Estado* 89, 13 de abril de 2004.
- Real Decreto 448/2005, de 22 de abril, por el que se modifican el Real Decreto 519/1999, de 26 de marzo, por el que se regula el régimen de ayudas a la apicultura en el marco de los programas nacionales anuales, y el Real Decreto 209/2002, de febrero, por el que se establecen normas de ordenación de las explotaciones apícolas. *Boletín Oficial del Estado* 109, 7 de mayo de 2005.
- Real Decreto 608/2006, de 19 de mayo, por el que se establece y regula un Programa nacional de lucha y control de enfermedades de las abejas de la miel. *Boletín Oficial del Estado* 131, 2 de junio de 2006.
- Real Decreto 617/2007, de 16 de mayo, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación. *Boletín Oficial del Estado* 118, 17 de mayo de 2007.
- 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) Nº 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.
- Reglamento (CE) Nº 2300/1997 de la Comisión de 20 de noviembre de 1997 por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento 1221/1997 del consejo 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 L 319, 21 de noviembre de 1997.
- Reglamento (CE) Nº 1774/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 3 de octubre de 2002 por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano. Diario Oficial de la Unión Europea L 273, 10 de octubre de 2002.
- Reglamento (CE) Nº 797/2004 del Consejo de 26 de abril de 2004 relativo a las medidas destinadas a mejorar las condiciones de producción y comercialización de los productos de la apicultura. Diario Oficial de la Unión Europea L 125/1, 28 de abril de 2004.
- Reglamento (CE) Nº 917/2004 de la Comisión de 29 de abril de 2004 por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) Nº 797/2004 del Consejo relativo a las medidas en el sector de la apicultura. Diario Oficial de la Unión Europea L 163/83, 30 de abril de 2004.
- Reglamento (CE) Nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea L 70/1 de 16 de marzo de 2005.
- Reglamento (CE) Nº 178/2006 de la Comisión de 1 de febrero de 2006 por lo que se modifica el Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo con vistas a establecer el anexo I que incluye la lista de alimentos y piensos a los que se aplican contenidos máximos de residuos de plaguicidas. Diario Oficial de la Unión Europea L 29/3, 2 de febrero de 2006.
- Reglamento (CE) Nº 811/2007 de la Comisión de 11 de julio de 2007 que modifica el Reglamento (CE) nº 797/2004 del Consejo, relativo a las medidas destinadas a mejorar las condiciones de producción y comercialización de los productos de la apicultura. Diario Oficial de la Unión Europea L 182/5, 12 de julio de 2007.
- Reglamento (CE) Nº 1234/2007 del Consejo de 22 de octubre de 2007 por el que se crea una organización común de mercados agrícolas y se establecen disposiciones específicas para determinados productos agrícolas (Reglamento único para las OCM). Diario Oficial de la Unión Europea L 299/1, de 16 de noviembre de 2007.
- Reglamento (CE) Nº 839/2008 de la Comisión de 31 de julio de 2008 que modifica el Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a los anexos II, III y IV relativos a los límites máximos de residuos de plaguicidas en el interior o en la superficie de determinados productos. Diario Oficial de la Unión Europea L 234/1, de 30 de agosto de 2008.
- Reglamento (CE) Nº 256/2009 de la Comisión de 23 de marzo de 2009 por el que se modifican los anexos II y III del Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de azoxistrobina y fludioxonil en determinados productos. Diario Oficial de la Unión Europea L 81/3, de 27 de marzo de 2009.
- Reglamento (CE) Nº 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. Diario Oficial de la Unión Europea L 15/1 de 20 de enero de 2010.

- Reglamento (CE) Nº 459/2010 de la Comisión del 27 de mayo de 2010 por el que se modifican los anexos II, III y IV del Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de determinados plaguicidas en determinados productos. Diario Oficial de la Unión Europea L 129/3 de 28 de mayo de 2010.
- Reglamento (CE) Nº 726/2010 de la Comisión del 12 de agosto de 2010 que modifica el Reglamento (CE) Nº 917/2004, por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) Nº 797/2004 del Consejo relativo a las medidas destinadas a mejorar las condiciones de producción y comercialización de los productos del sector de la apicultura. Diario Oficial de la Unión Europea L 213/29 de 13 de agosto de 2010.
- Rennie J, White PB, Harvey EJ. Isle of Wight Disease in hive bees. Transactions of the Royal Society of Edinburgh. 1921; 52: 737-779.
- Reynaldi FJ, Lopez AC, Albo GN, Alippi AM. Genomic fingerprinting. Journal of Apicultural Research 2003; 42: 68-76.
- Ribièrre M, Faucon JP, Pépin M. Molecular diagnostic of chronic bee paralysis virus infection. Apidologie. 2002; 33: 339-351.
- Richards AJ. Does low biodiversity resulting from modern agricultural practice affect crop pollination and yield? Annals of Botany. 2001; 88: 165-172.
- Riessberger-Gallé U, Von der Ohe W, Crailsheim K. Adult honeybee's resistance against *Paenibacillus larvae* larvae, the causative agent of the American foulbrood. Journal of Invertebrate Pathology. 2001; 77: 231-236.
- Rinderer TE, Rothenbuhler WC, Kulinčević JM. Responses of three genetically different stocks of the honey bee to a virus from bees with hairless-black syndrome. Journal of Invertebrate Pathology. 1975; 25: 297-300.
- Ritter W. Varroaosis a new disease of the *Apis mellifera*. Anim.Res.Develop. 1981; 14: 17-35.
- Ritter W, Kiefer BM. A method for diagnosing *Bacillus larvae* in honey samples. Animal Research and Development. 1995; 42: 7-13.
- Ritter W. Diagnosis and control of bee diseases. Bustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, Germany. 1996.
- 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.
- Robinson GE, Ben-Sahar Y. Social behavior and comparative genomics: new genes or new gene regulation? Genes Brain Behavior. 2002; 1: 197-203.
- Rodríguez-Dehaibes SR, G Otero-Colina, V Pardio Sedas and Villanueva-Jiménez JA. Resistance to amitraz and flumethrin in *Varroa destructor* populations from Veracruz, Mexico. Journal of Apicultural Research. 2005; 44 (3): 124-125.
- 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.
- Rortais A, Arnold G, Halm MP, Touffet-Briens F. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. Apidologie. 2005; 36: 71-83.
- Rösch GA. Über die Bautätigkeit im Bienenvolk und das Alter der Baubienen. Zeitschrift für Vergleichende Physiologie. 1927; 6: 265-298.

- Rose JB, Christensen M, Wilson WT. *Ascospaera* species inciting chalkbrood in North America and taxonomic key. *Mycotaxon*. 1984; XIX: 41-55.
- Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B. Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2010; 103: S96-S119.
- Rosenkranz P. Honey bee (*Apis mellifera* L.) tolerance to *Varroa jacobsoni* Oud. in South America. *Apidologie*. 1999; 30: 159-172.
- Rosenkranz P, Engels W. Infertility of *Varroa jacobsoni* females after invasion into *Apis mellifera* worker brood as a tolerance factor against varroatosis. *Apidologie*. 1994; 25: 402-411.
- Rothenbuhler W. Behavior genetics of nest cleaning behaviour in honeybees I. Response of four inbred lines to disease killed brood. *Animal Behaviour*. 1964; 12: 579-583.
- Roussy L. New contribution to the study of *Pericystis apis* (MN). *La Gazette Apicole*. 1962; 63: 101-105.
- Royce LA, Rossignol PA. Epidemiology of honey bee parasites. *Parasitology Today*. 1990; 6: 348-353.
- Royce LA, Krantz GW, Ibay LA, Burgett DM. Some observations on the biology and behaviour of *Acarapis woodi* and *Acarapis dorsalis* in Oregon. En *Africanized honey bees and bee mites*. Needham GR y col. (Ed) Ellis Horwood, Chichester. 1988. pp 498-505.
- Ruano MV, Fernandez FM, Ochoa AC, Valenzuela. *Varroa* sis disturbs the orientation of bees its influence on parasitosis development. *Vida Apicola*. 1991; 48: 55-57.
- Ruijter AD, Eijnde J. Van den: Veldproef in Nederland met *Acarapis woodi* in bijenvolken (1982-1985). *Bijenteelt*. 1987; 89: 80-83.
- Ruttner F. Biogeography and taxonomy of honeybees. Springer-Verlag. Berlín. 1988
- Ruttner F, Tassenco U, Louveaux J. Biometrical statistical análisis of the Geographic variability of *Apis mellifera* L. *Apidologie*. 1978; 9: 363-382.
- Sachs H. Über das verhalten und die orientierung der tracheenmilben *Acarapis woodi* (Rennie, 1921) auf Bienen. *Z Bienenforsch*. 1952; 1: 148-170.
- Sadov AV. A study of the female *Varroa* mite. *Pchelovodstvo*. 1976; 8: 15-16.
- Sammataro D, Needham GR. How oil affects the behaviour of tracheal mites. *American Bee Journal* 1996; 136: 511-514.
- Sammataro D, Gerson U, Needham G. Parasitic mites of honey bees: life history, implications and impact. *Annual Review of Entomology*. 2000; 45: 519-548.
- Savolaninen K. Understanding the toxic action of organophosphates. *Handbook of pesticide toxicology*. Academic Press, USA. 2001: 1746-1752.
- Schneider P. The influence of *Varroa* infestation during pupal development on the flight activity of worker honeybees. *Apidologie*. 1986; 17: 366-368.
- Schneider P, Drescher W. Action de *Varroa jacobsoni* sur le poids à l'émergence le développement des glandes hypopharyngiennes et la longévité d'*Apis mellifera*. *Apidologie*. 1987; 18: 101-110.
- Schuch DMT, Madden RH, Satler A. An improved method for the detection and presumptive identification of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in honey. *Journal of Apicultural Research*. 2001; 40: 59-64.
- Scott-Dupree C, Otis G. Parasitic mites of honey bees: to or not to be. *Highlights Agricultural Research of Ontario*. 1988; 11: 24-28.

- Scott-Dupree C, Ball BV, Welsh O, Allen M. An investigation into the potential transmission of viruses by the honey bee tracheal mite (*Acarapis woodi* R.) to honey bees. Canadian Honey Council Research Symposium Proceedings. 1995. pp 15-24.
- Seal DWA. Chalk brood disease of bees. New Zealand Journal of Agriculture. 1957; 6: 562.
- Seeley TD. Honeybee ecology: a study of adaptation in social life. Princeton University Press, Princeton, NJ. 1985.
- Shah FA, Shah TA. *Tropilaelaps clareae*, a Serious Pest of Honey Bees; Four Dusting Control for *Varroa* Disease. American Bee Journal. 1988; 128: 27.
- Shimanuki H. Bacteria. En: En Morse RA, Nowogrodzki R (Eds.). Honey Bee Pests, Predators, and Diseases, 2nd Ed. Published by Cornell University Press. 1990; pp. 28-47.
- Shimanuki H. Bacteria. En: Morse RA, Flottum K (Eds.), Honey Bee Pests, Predators, and Diseases. The A.I Root Company, Medina, Ohio, USA. 1997; pp. 35-54.
- Shimanuki H, Knox DA. Diagnosis of honey bee diseases. USDA-ARS Agriculture Handbook. 2000; pp. 690: 61.
- Shimanuki, H; Herbert, EW; Knox, DA. High velocity electron beams for bee disease control. American Bee Journal. 1984; 124: 865-867.
- Sina M, Alastair G, Farmer M, Andersen R, Anderson O, Barta J, Bowser S, Brugerolle G, Fensome R, Fredericq S, James T, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane C, Lewis L, Lodge J, Lynn D, Mann D, Maccourt R, Mendoza L, Moestrup O, Mozley S, Nerad T, Shearer C, Smirnov A, Spiegel F, Taylor M. The new higher level classification of Eukaryotes with emphasis on the taxonomy of Protists. Journal of Eukaryotic Microbiology. 2005; 52: 399-451.
- Skou JP. Ascospaerales. Friesia. 1972; 10: 1-24.
- Smirnov AM. Research results obtained in USSR concerning aetiology, pathogenesis, epizootiology, diagnosis and control of *Varroa* disease in bees. Apiacta. 1978, N° 4.
- Smith Jr IB. The bee louse, *Braula coeca* Nitzsch, its distribution and biology on honey bees. Thesis. Universidad de Maryland. 1978; pp. 111.
- Smith AW, Phelan PL, Needham GR, Page RE Jr. Chemical ecology of the honey bee tracheal mite. American Bee Journal. 1989; 129: 822.
- Smith DR, Palopoli MF, Taylor BR, Garnery L, Cornuet JM, Solignac M, Brown M. Geographical overlap of two mitochondrial genomes in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). Journal of Heredity. 1991; 82: 96-100.
- Solignac M, Vautrin D, Pizzo A, Navajas M, Le Conte Y, Cornuet JM. Characterization of microsatellite markers from the apicultural pest *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and its relatives. Molecular Ecology Notes. 2003; 3: 556-559.
- Solignac M, Cornuet JM, Vautrin D, Le conte, Anderson D, Evans J, Cros-Arteil S, Navajas M. The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the Western honey bee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones. Proceedings of the Royal Society of London. Biology Science. 2005; 272:411-419.
- Song Z, Feng X, Liu J, Shi J, Wang Z. Development and application of polymerase chain reaction for detection of bee Chalkbrood disease. Journal of Bee. 2009. doi: CNKI:SUN:MFZA.0.2009-10-007
- Song Z, Wang Z, Feng X, Wang W, Luo Y, Liu J, Jiang Y. Establishment and application of real-time PCR for detection of *Ascosphaera apis*. Progress in Veterinary Medicine. 2010. doi: CNKI:SUN:DYJZ.0.2010-12-013

- Spivak M, Gilliam M. Facultative expression of hygienic behaviour of honey bees in relation to disease resistance. *Journal of Apicultural Research*. 1993; 32: 147-157.
- Spivak M, Reuter GS. Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary. *Apidologie*. 1998; 29: 291-302.
- Spivak M, Reuter GS. *Varroa destructor* infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies selected for hygienic behaviour. *Journal of Economic Entomology*. 2001; 94: 326-331.
- Spiltoir CF. Life cycle of *Ascospaera apis* (*Pericystis apis*). *American Journal of Botany*. 1955; 42: 501-508.
- Spiltoir CF, Olive LS. A re-clasification of the genus *Pericystis* Betts. *Mycologia*. 1955; 47: 238-244.
- Spreafico M, Eördegh FR, Bernardinelli I, Colombo M. First detection of strains of *Varroa destructor* resistant to coumaphos. Results of laboratory test and field trials. *Apidologie*. 2001; 32: 49-55.
- Stanley D, Miller J, Tunaz H. Eicosanoid actions in insecto immunity. *Journal of Innate Immunity*. 2009; 1: 282-290.
- Steche W. Revision of Zander and Bottcher. Nosematose. En: *Krankheiten der Biene, Handbuch der Bienenkunde*. 1985.
- Steiner J, Diehl PA, Vlimant M. Vitellogenesis in *Varroa jacobsoni*, a parasite of honey bees. *Experimental and Applied Acarology*. 1995; 19: 411-422.
- Steiner J, Dittmann F, Rosenkranz P, Engels W. The first gonocycle of the parasitic mite (*Varroa jacobsoni*) in relation to preimaginal development of its host, the honey bee (*Apis mellifera carnica*). *Invertebrate Reproduction and Development*. 1994; 25: 175-183.
- Stoltz D, Shen XR, Boggis C, Sisson G. Molecular diagnosis of Kashmir bee virus infection. *Journal of Apicultural Research*. 1995; 34: 153-165.
- Strand MR. Insect cellular immunity. *Journal of Insect Science*. 2008; 15: 1-14.
- Stroschein-Stevenson SL, Foley E, O'Farrell PH, Johnson AD. Phagocytosis of *Candida albicans* by RNAi-treated *Drosophila* S2 cells. *Methods in Molecular Biology*. 2009; 470: 347-358.
- Suchail S, Guez DL, Belzunces PL. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2000; 19: 1901-1905.
- Suchail S, Guez D, Belzunces LP. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2001; 20: 2482-2486.
- Suchail S, Debrauwer L, Belzunces LP. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest Management Science*. 2004; 60: 191-196.
- Suwanpong G, Yemor T, Boonpakdee C, Benbow ME. *Nosema ceranae*, a new parasite in Thai honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2011; 106: 236-241.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2007; 24: 1596-1599.
- Tanada Y, Kaya KH. *Insect pathology*. Academic Press Inc. 1993; 318-317.
- Tapasztai Z, Forgách P, Kövágó C, Békési L, Bakonyi T, Rusvai M. First detection and dominance of *Nosema ceranae* in Hungarian honeybee colonies. *Acta Vet. Hung.* 2009; 57: 383-388.
- Teixeira EW, Chen Y, Message D, Pettis JS, Evans JD. Virus infections in Brazilian honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2008; 99:117-119.

- Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cellular and Molecular Life Science*. 2003; 60: 2622-2636.
- Tentcheva D, Gauthier L, Jouve S, Canabady-Rochelle L, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Ball BV, Bergoin M. Polymerase chain reaction detection of deformed wing virus (DWV) in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie*, 2004; 35: 431-439.
- Theantana T, Chantawannakul P. Protease and β -N acetylglucosaminidase of honey bee chalkbrood pathogen *Ascosphaera apis*. *Journal of Apicultural Research* 2008; 47(1): 68-76.
- Thompson HM, Brown MA. Is contact colony treatment with antibiotics an effective control for European foulbrood? *Bee World*. 2001; 82: 130-138.
- Titera D, Haklova M. Detection method of *Paenibacillus larvae larvae* from beehive winter debris. *Apiacta*. 2003; 38: 131-133.
- Tlak Gajger IT, Vugrek O, Grilec D, Petrinec Z. Prevalence and distribution of *Nosema ceranae* in Croatian honeybee colonies. *Veterinary Medicine*. 2010; 55: 457-462.
- Tomaszewska B. Alterations in the levels of some components of haemolymph in honeybees infected with *Nosema apis* Z. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*. 1979; 23: 181-207.
- Toschkov A, Vallerianov T, Tomov A. Die Immunofluoreszenzmethode und die Schnelle und Spezifische Diagnostik der Amerikanischen Faulbrut bei der Bienenbrut. *Bulletin Apicole*. 1970; 13: 13-18.
- Toumanoff C. Lea Maladies des Abeilles. *Revue Française de Apiculture*. 1951; 68: 325.
- Traver BE, Fell RD. Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2011; 107: 43-49.
- Tremolada P, Bernardinelli I, Colombo M, Spreafico M, Vighi M. Coumaphos distribution in the hive ecosystem: case study for modelling applications. *Ecotoxicology*. 2004; 13: 589-601.
- Trouiller J, Millani N. Stimulation of *Varroa jacobsoni* Oud. oviposition with semiochemicals from honeybee brood. *Apidologie*. 1999; 30: 3-12.
- Trouiller J, Arnold G, Chappe B, Le Conte Y, Billion A, Masson C. The kairomonal esters attractive to the *Varroa jacobsoni* mite in the queen brood. *Apidologie*. 1994; 25: 314-321.
- Truper HG, de Clari L. Taxonomic note: erratum and correction of further specific epithets formed as substantives (nouns) in apposition. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1998; 48: 615.
- Tsigouri AD, Menkissoglu-Spiroudi U, Thrasylvoulou A, Diamantidis G. Fluvalinate residues in honey and bees wax after different colony treatments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2004; 72: 975-982.
- Valera F, Martín-Hernández R, Higes M. Evaluation of large-scale dissemination of *Nosema ceranae* spores by European bee-eaters *Merops apiaster*. *Environmental Microbiology Reports*. 2011; 3: 47-53.
- Valdés B. Atlas Polínico de Andalucía Occidental. Universidad de Sevilla (Ed). Sevilla. 1987.
- Van der Zee R. Colony losses in the Netherlands. *Journal of Apicultural Research*. 2010; 49: 121-123.
- 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. *Journal of Apicultural Research*. 2010; 103: 80-95.

- vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood R, Tarpay DR, Pettis JS. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One*. 2009; 4: 6481-6497.
- Vanhooren A, Henneghien J, Jacobs FJ. The influence of environmental factors on the induction antimicrobial responses in honeybees. *Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society*. 1994; 5: 81-83.
- Vidyasagar J, Karunakar N, Reddy MS, Rajnarayana K, Surender T, Krishna DR. Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorous insecticide poisoning. *Indian Journal Pharmacology*. 2004; 36, 76-79.
- Villa JD, Rinderer TE. Inheritance of resistance to *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae) in crosses between selected resistant Russian and selected susceptible U.S. honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*. 2008; 101 (5): 1756-1759.
- Villa S, Vighi M, Finizio A, Serini GB. Risk assessment for honeybees from pesticide-exposed pollen. *Ecotoxicology*. 2000; 9: 287-297.
- Villa JD, Bustamante DM, Dunkley JP, Escobar LA. Changes in Honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony swarming and survival pre- and postarrival of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in Louisiana. *Annals of the Entomological Society of America*. 2008; 101: 897-971.
- Von der Ohe W, Dustmann JH. Efficient prophylactic measures against American foulbrood by bacteriological analysis of honey for spore contamination. *American Bee Research*. 1997; 137: 603-606.
- Waite R, Brown M, Thompson H, Bew M. Controlling European foulbrood with the shook swarm method and oxytetracycline in the UK. *Apidologie*. 2003; 34: 569-575.
- Waller GD, Erickson BJ, Harvey J, Martin JH. Effects of dimethoate on honey bees (Hymenoptera: Apidae) when applied to flowering lemons. *Journal of Economic Entomology*. 1984; 77: 70-74.
- Wallner K. Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie*. 1999; 30: 235-248.
- 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 (4): 506-513.
- Wang DI, Moeller FE. Histological comparisons of the development of hypopharyngeal glands in healthy and *Nosema*-infected Yorker honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1969; 14: 135-142.
- Wang DI, Moeller FE. The division of labor and queen attendance behaviour of *Nosema*-infected worker honey bees. *Journal of Economic Entomology*. 1970; 63: 1539-1541.
- Wang DI, Moeller FE. Ultrastructural changes in the hypopharyngeal glands of Yorker honey bees infected by *Nosema apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1971; 17: 308-320.
- Webster TC. *Nosema apis* spore transmission among honey bees. *American Bee Journal*. 1993; 133: 869-870.
- Weidner E, Byrd W. The microsporidian spore invasion tube. II. Role of calcium in the activation of invasion tube discharge. *The Journal of Cell Biology*. 1982; 93: 970-975.
- Weinberg KP, Madel G. The influence of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. On the protein concentration and the haemolymph volume of the brood of worker bees and drones of the honey bee *Apis mellifera* L. *Apidologie*. 1985; 16: 421-435.
- Whitaker J, Szalanski, Kence M. Molecular detection of *Nosema ceranae* and *N. apis* from Turkish honey bees. *Apidologie*. 2010. doi: 10.1051/apido/2010045.

- White GF. The bacteria of the apiary, with special reference to bee diseases. Bureau of Entomology Technical Series no.14. U.S. Department of Agriculture, Washington, D. C. 1906.
- White GF. Sacbrood, a Disease of Bees. U. S. Department of Agriculture Bulletin of Entomology. Circular No.169. U.S. Department of Agriculture, Washington, D. C. 1913.
- White GF. *Nosema* Disease. United States Department of Agriculture Bulletin. 1919; 780: 54.
- Whitfield CW, Behura SK, Berlocher SH, Clark AG, Johnston JS, Sheppard WS, Smith DR, Suarez AV, Weaver D, Tsutsui ND. Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science*. 2006; 314: 642-664.
- Wilde J, Fuchs S, Bratkowski J, Siuda M. Distribution of *Varroa destructor* between swarms and colonies. *Journal of Apicultural Research*. 2005; 44: 190-194.
- Wilkins S, Brown M, Andrew A, Cuthbertson GS. The incidence of honey bee pests and diseases in England and Wales. *Pest Management Science*. 2007; 63: 1062-1068.
- Williams BAP. Unique physiology of host-parasite interactions in microsporidia infections. *Cellular Microbiology*. 2009; 11: 1551-1560.
- 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.
- Wilson WT. Resistance to American foulbrood in honey bees XI. Fate of *Bacillus larvae* spores ingested by adults. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1971; 17: 247-255.
- Wilson WT, Nunamaker RA. The incidence of *Nosema apis* in honeybees in Mexico. *Bee World*. 1983; 64: 132-136.
- Wilson WT, Pettis JS, Henderson CE, Morse RA. Tracheal mites. En *Honey Bee Pests, predators and diseases*. 3rd Ed. Al Root publishing, Medina, Ohio, USA. 1997. pp 255-277.
- Winston ML. The Biology of the Honey Bee. En: *Development and nutrition*. Harvard University Press, Cambridge, USA. 1991; pp.48.
- Yang X, Cox-Foster DL. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; 102: 7470-7475.
- Yang X, Cox-Foster DL. Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. *Parasitology*. 2007; 134: 405-412.
- Yoshiyama M, Kimura K. Distribution of *Nosema ceranae* in the European honeybee, *Apis mellifera* in Japan. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2011; 106: 263-267.
- Yue C, Genersch E. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology*. 2005; 86: 3419-3424.
- Yue D, Nordhoff M, Wieler LH, Genersch E. Fluorescence in situ-hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*. 2008; 10: 1612-1620.
- Zander E. Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Münchener Bienenzeitung*. 1909; 31: 196-204.
- Zhavnenko VM. Indirect method of immunofluorescence in the diagnosis of foulbrood (American and European). *Veterinariia*. 1971; 8: 109-111.

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.

GLOSARIO

°C: Grados centígrados

A: Adenina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia

ADNmt: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial

ADNr: Ácido desoxirribonucleico ribosómico

AFSSA: *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*

ARN: Ácido ribonucleico

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico

ARN^{leu}: Región intergénica del ARN transferente de la leucina

ATTC: *American Type Culture Collection*

C: Citosina

CA: Centro Agrario de la Junta de Comunidades de Castilla La-Mancha

CC. AA. : Comunidades autónomas

CE: Comunidad Europea

cm: Centímetros

cm²: Centímetros cuadrados

Cl₂Mg: Cloruro de magnesio

COI: Subunidad I del gen de la citocromo oxidasa

COII: Subunidad II del gen de la citocromo oxidasa

CO₂: Dióxido de carbono

CSA: Agar columbia de sangre de oveja

d: Días

DNTP: deoxinucleosido trifosfato

Dr: Doctor

EE. UU.: Estados Unidos

EFSA: *European food safety authority*

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ERIC: Secuencias intergénicas de consenso repetitivas de enterobacterias

etc: Etcétera

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

Fig.: Figura

g: Gramos

G: Guanina

HJ: Hormona juvenil

h: Horas

H₂O: Agua

IC: Intervalo de confianza

ITS1: Espaciador interno transcrito 1

ITS2: Espaciador interno transcrito 2

J: Haplotipo japonés/thailandés de *V. destructor*

K: Haplotipo coreano de *V. Destructor*

km: Kilómetro

K_s: Divergencia sinónima nucleotídica entre secuencias

L: Litro

LMR: Límite máximo de residuos

LT₁₀₀: Tiempo letal

MAGRAMA: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente

MEGA: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis 4*

mg: Miligramos

min: Minutos

mL: Mililitros

mm: Milímetros

mM: Milimolar

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

ND2: Subunidad II del gen de la deshidrogenasa NADH

OTC: Oxitetraciclina

OIE: Oficina Internacional de Epizootias

pb: Pares de bases

p. ej.: por ejemplo

PC: Pérdida de colonia

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PCR-RFLP: Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción

q-PCR: PCR cuantitativa

RAPD-PCR: Amplificación aleatoria de polimorfismo del ADN

rpm: Revoluciones por minuto

RD: Real Decreto

REGA: Registro General de Explotaciones Agrarias

rep-PCR: Amplificación de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos

RP: Razón de prevalencias

s: Segundos

SAB: Seroalbúmina bovina

spp. : Especies

SSU-16S: *small-subunit* del gen 16S del ARNr

T: Timina

Tm: Temperatura de fusión (*melting*)

UE: Unión Europea

UFC: Unidades formadoras de colonias

UV: Ultravioleta

v: Versión

VAD: Virus de las alas deformadas

VCS: Virus de la cría ensacada

VF: Virus filamentosos

VIPA: Virus israelí de la parálisis aguda

VK: Virus Kashmir

VPA: Virus de la parálisis aguda

VPC: Virus de la parálisis crónica

VRN: Virus de la realera negra

vs: *versus*, frente a

VTG: Vitelogenina

χ^2 : Prueba de Chi² de Pearson

μL : Microlitro

μM : Micromolar

μm : Micrómetro

ANEXO I

Datos del Apicultor			
Nombre y Apellidos			
Asociación		Teléfono	

Datos del colmenar y Explotación			
Municipio del colmenar		Paraje	Coordenadas
¿Está registrado? Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>		Nº Asentamientos	
Tipo de colmenas (elija una o varias opciones)		Layens <input type="checkbox"/>	Perfección <input type="checkbox"/>

Clasificación zootécnica de la explotación			
Producción de miel y otros productos <input type="checkbox"/>		Especificar.....	
Selección y cría <input type="checkbox"/>		Polinización <input type="checkbox"/> Otros <input type="checkbox"/> ¿Cuál?.....	
Autoconsumo (1-14 colmenas) <input type="checkbox"/>	No Profesional (15-149 colmenas) <input type="checkbox"/> nº	Profesional (+ 150 colmenas) <input type="checkbox"/> nº	
Realiza trashumancia	No <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/>	Indique las provincias	
Aprovecha	Girasol <input type="checkbox"/>	Maíz <input type="checkbox"/>	
Flora principal próxima al colmenar (elija una o varias opciones)			
Barbecho / Yermo (sin cultivo) <input type="checkbox"/>		Bosque <input type="checkbox"/>	Espliego /Romero/Lavanda <input type="checkbox"/>
Roble <input type="checkbox"/>	Maíz <input type="checkbox"/>	Girasol <input type="checkbox"/>	Leguminosas <input type="checkbox"/> Olivo <input type="checkbox"/>
Encina <input type="checkbox"/>	Frutales <input type="checkbox"/>	Otros.....	

Muestras que envía:	Fecha de recogida:
<input type="checkbox"/> Abejas. Por favor, indique la hora aproximada de toma de muestra	
<input type="checkbox"/> Polen	<input type="checkbox"/> Cría
<input type="checkbox"/> Miel	

Datos sanitarios			
<i>¿Ha sufrido Enfermedades en el último año?</i>			
			No <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/>
Varroosis <input type="checkbox"/>	Loque americana <input type="checkbox"/>	Nosemosis <input type="checkbox"/>	Virus <input type="checkbox"/>
Intoxicaciones <input type="checkbox"/>	Loque europea <input type="checkbox"/>	Apimiasis <input type="checkbox"/>	Otras <input type="checkbox"/>
Dónde realizaron el diagnóstico			

<i>¿Ha sufrido el síndrome de despoblamiento de las colmenas, o mortalidad elevada de colonias?</i> No <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> ¿Cuándo?

Número de tratamientos para VARROA realizados en el último año	0 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	
<i>Primer tratamiento</i>					
Apistan <input type="checkbox"/>	Bayvarol <input type="checkbox"/>	Apivar <input type="checkbox"/>	Otros <input type="checkbox"/>	Especifique	
Nº tiras por colmena	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	Otros
Fecha inicio tratamiento	Semanas con el tratamiento 4 <input type="checkbox"/> 6 <input type="checkbox"/> 8 <input type="checkbox"/> 10 <input type="checkbox"/> Otros				
<i>Segundo tratamiento (en caso de que lo hubiera)</i>					
Apistan <input type="checkbox"/>	Bayvarol <input type="checkbox"/>	Apivar <input type="checkbox"/>	Otros <input type="checkbox"/>	Especifique	
Nº tiras por colmena	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	Otros
Fecha inicio tratamiento	Semanas con el tratamiento 4 <input type="checkbox"/> 6 <input type="checkbox"/> 8 <input type="checkbox"/> 10 <input type="checkbox"/> Otros				

<i>¿Ha realizado tratamientos frente a Nosema?</i>	No <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> ¿cuándo?..... Fumagilina <input type="checkbox"/> Otros Nº tratamientos Dosis por tratamiento
<i>¿Ha realizado tratamientos frente a Loque?</i>	No <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> ¿cuándo?..... Indique el producto usado Dosis del producto porcolmena

ANEXO II



ORIGINAL RESEARCH ARTICLE



Genetic profile of *Varroa destructor* infesting *Apis mellifera iberiensis* colonies.

Irene Muñoz¹, Encarna Garrido-Bailón², Raquel Martín-Hernández², Aranzazu Meana³, Mariano Higes² and Pilar De la Rúa^{1*}

¹Área de Biología Animal, Dpto. de Zoología y Antropología Física, Facultad de Veterinaria, Apdo. 4021, Universidad de Murcia, 30100 Murcia, Spain.

²Centro Apícola Regional, Consejería de Agricultura, Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, Marchamalo, 19180 Guadalajara, Spain.

³Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

Received 21 December 2007, accepted subject to revision 19 May 2008, accepted for publication 21 June 2008.

*Corresponding author. Email: pdelarua@um.es

Summary

The genetic profile of the *Varroa destructor* mite infesting *Apis mellifera iberiensis* colonies located in the Iberian Peninsula and also on Canarian and Balearic islands was determined through standard molecular assays (RFLP of the mitochondrial *cox1* fragment). The *V. destructor* Korea haplotype was found in all of the 575 samples analyzed except in one, confirming the worldwide expansion of the more virulent haplotype. The mitochondrial haplotypes of the honey bees from an apiary where the Japan haplotype was detected were also determined, but no significant relationship was observed in the parasite-host haplotype distribution.

Perfil genético de *Varroa destructor* infestando colonias de *Apis mellifera iberiensis*

Resumen

El perfil genético del ácaro *Varroa destructor* infestando colonias de *Apis mellifera iberiensis* situadas en la Península Ibérica, las islas Baleares y Canarias, ha sido determinado mediante análisis moleculares estándar (RFLP de parte del gen mitocondrial *cox1*). El haplotipo Korea de *V. destructor* se encontró en todas las 575 muestras analizadas excepto en una, confirmando la expansión mundial de este haplotipo más virulento. Los haplotipos mitocondriales de las abejas del apiario donde se detectó el único haplotipo Japón, se determinaron también y no se observó ninguna relación significativa en la distribución de haplotipos del parásito y del hospedador.

Keywords: *Varroa destructor*, *Apis mellifera iberiensis*, varroasis, genetic characterization, mtDNA, haplotypes, cytochrome oxidase I, Xhol, Dral, Spain

Introduction

The genus *Varroa* consists of at least four, but possibly seven, distinct species. The four recognized species, *Varroa jacobsoni*, *V. destructor*, *V. underwoodi* and *V. rindereri* are morphologically distinct and show clear differences in their mitochondrial DNA sequences. They are also reproductively isolated and show differences in their host specificity and geographical distribution

(Anderson and Trueman, 2000). In this sense *Apis koschevnikovi* is parasitized by *V. rindereri* and *Apis cerana* by *V. underwoodi*, *V. jacobsoni* and *V. destructor* in Asia, but *A. mellifera* is only parasitized by *V. destructor* worldwide. Several mitochondrial haplotypes of *V. destructor* have been described, but only two of them are capable of reproducing on *A. mellifera*. These are the K and J haplotypes (short for Korea and Japan, the places where they were first described parasitizing their original host *A. cerana*)

(Anderson, 2000; Anderson and Trueman, 2000). These types are also thought to vary in their virulence toward *A. mellifera*, with the K type assumed to be more virulent than the J type (De Guzman *et al.*, 1997; 1998; Anderson and Trueman, 2000). The K type infests *A. mellifera* almost worldwide, but the J type has only been observed on *A. mellifera* in Japan, the Americas (including Brazil) and Thailand (De Guzman *et al.*, 1997; 1998; Anderson and Trueman, 2000; Garrido *et al.*, 2003). Using microsatellite markers characterized in *V. destructor* (Solignac *et al.*, 2003) Solignac *et al.* (2005) found almost no polymorphism among the J and K types, which led the authors to conclude that each type has a quasi-clonal structure and that the lack of polymorphism is due to severe "bottleneck" events that occurred at the time of host change.

In Spain, *varroa* was first detected at the French-Spanish border in December 1985 (Llorente, 2003) and since then it has spread all over the Iberian Peninsula and also to the Balearic Islands and recently to the Canary Islands. The impact of the parasite on Spanish apiculture has been severe: about 40 % of the Iberian colonies collapsed during the first years of incidence (Llorente, 2003). As in other countries, the use of chemical acaricides and organic treatments to control mites have saved Spanish apiculture from total devastation, but they have also caused many secondary problems, such as mite resistance and chemical residues in honey and other hive products (reviewed by Milani, 1999; Wallner, 1999; Martin, 2004; Bogdanov, 2006). Hence, alternative control methods such as selection of *varroa*-tolerant honey bees (Harbo and Harris, 1999; Ibrahim *et al.*, 2007) are being explored.

The Iberian honey bee *A. m. iberiensis* Engel, shows more variation in its mitochondrial (mtDNA) sequence than any other subspecies of *A. mellifera* in Europe. In the Iberian honey bee populations a clinal variation of African (A) and west European (M) evolutionary lineages occurs, with the frequency of A haplotypes decreasing in a SW-NE trend, while that of M haplotypes increases (Cánovas *et al.*, 2007). This situation leads to speculation whether there could be differences in the distribution of the *V. destructor* haplotypes in relation to the evolutionary lineage of the Iberian honey bees. Given the documented *varroa* tolerance of Africanized *A. mellifera* in relation to the fertility of female mites (Rosenkranz, 1999), we wonder if there is a difference in the mite association between the African and European types of Iberian honey bees, although the African subspecies of origin is different in both cases (North African *A. m. intermissa* in the case of the Iberian honey bees and South African *A. m. scutellata* in the case of the Africanized honey bees).

In this study we examined the genetic profile of *varroa* populations infecting *A. m. iberiensis* to provide further insights into host-parasite relationships. As such we first report the genetic characterization of a wide sample of *varroa* mites infesting *A. m. iberiensis*.

Material and Methods

Sampled colonies

Phoretic adult female *varroa* mites were collected from honey bee workers sampled from representative colonies spread

throughout the whole Iberian Peninsula including two samples from Portugal, 14 from the Balearic Islands and 2 from El Hierro on the Canary Archipelago (Fig. 1). Some of these samples were randomly collected as part of an epidemiological study aimed to elucidate the cause of honey bee losses observed in Spain in recent years.

DNA extraction

DNA was extracted from whole individual mites or from two or three honey bee worker legs following a modified Chelex-based method (Walsh *et al.*, 1991).

mtDNA analysis

Varroa destructor

A total of 575 individual *varroa* mites were identified following the molecular test of Anderson and Fuchs (1998) (Fig. 1). Briefly it consisted of amplifying a fragment of the mitochondrial *coxI* gene and restricting it with the enzymes *XhoI* and *SacI*. The resulting products were electrophoresed on 1.5 % agarose gels, stained with ethidium bromide and UV light photographed for documentation. With the *XhoI* test the *coxI* fragment remains undigested if the mite corresponds to the Japan haplotype, whereas two fragments are generated in the case of the Korean haplotype. The opposite results with the *SacI* test (PCR product digested in the Japan haplotypes and undigested in the Korean haplotype). This last test was used to confirm results from the first.

Apis mellifera iberiensis

The mitochondrial haplotype of ten worker honey bees was determined following Garnery *et al.* (1993). For this, the mitochondrial DNA fragment including the tRNA^{leu}-*cox2* intergenic region was amplified. Two μ l aliquots of the PCR product were run on 1 % agarose gel for size determination and the remaining volume was incubated with 5 units of the restriction enzyme *DraI* at 37 °C for 2-8 h. Restricted DNA fragments were discriminated on 3 % agarose NUSIEVE® gels and UV visualized after stained with ethidium bromide.

Results

Nine out of ten *varroa* mites sampled in 2001 from one apiary located in Guadalajara (central Spain), were identified as the *V. destructor* Korea haplotype, but one of the ten was the Japan haplotype. Despite the identification of this unique J type, the remaining 565 mites tested (which were collected during 2006-07) were all identified as the K type, including samples from Portugal, the Balearic and Canary Islands. The *XhoI* restriction test was repeated twice and the *SacI* test was also performed in order to confirm some false negatives results (i.e. those uncut fragments that could lead to a wrong assignation of the Japan haplotype).

In relation to the mitochondrial haplotype characterization of the honey bee colonies eight out of the tested were of the European M4 haplotype, the other three samples showed African haplotypes: two A2 and one A3.

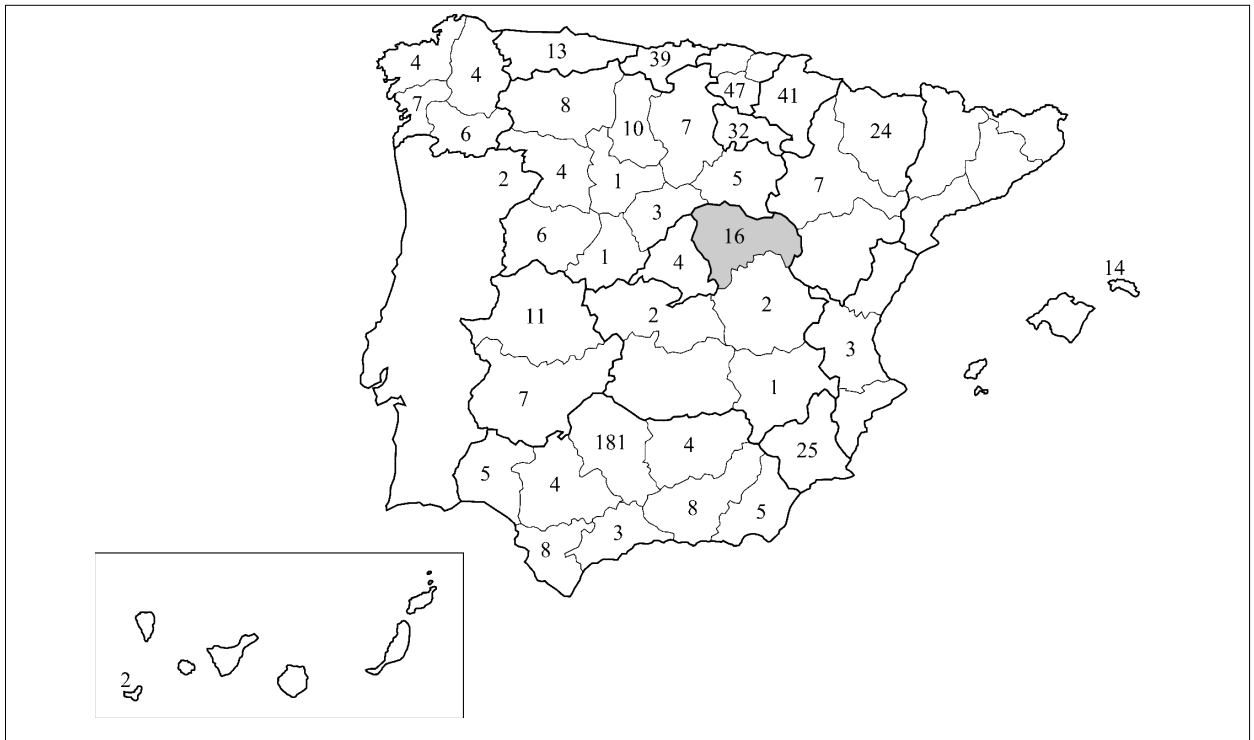


Fig 1. Number and distribution of the sampled *varroa* mites in the Iberian Peninsula (Spanish provinces plus two samples from Portugal). Note: Ten samples collected from Guadalajara (lightly shaded) were collected in 2001, while all other samples were collected during 2006-7.

Table 1. *Varroa* and honey bee haplotypes in the apiary sampled in 2001 where both mite haplotypes were found.

Colony	<i>V. destructor</i> haplotype	<i>A. m. iberiensis</i> haplotype
2	Korea	African (A2)
5	Korea	African (A3)
6	Korea	African (A2)
7	Korea	European (M4)
11	Korea	European (M4)
15	Korea	European (M4)
19	Korea	European (M4)
20	Japan	European (M4)
26	Korea	European (M4)
29	Korea	European (M4)

Discussion

To our knowledge this is the first study in which a large number of individual *varroa* mites have been identified from a single country, apart from a study in China (Zhou *et al.* 2004) and in Java, Indonesia (Anderson and Trueman, 2000). In the present study a total of 575 *V. destructor* individuals sampled from *A. m. iberiensis* colonies were analyzed through a mitochondrial PCR-RFLP assay to determine their haplotype. All of them, except one, belonged to the Korean haplotype.

These results confirm the expansion of the Korean haplotype worldwide, (Anderson and Trueman, 2000) and also the hypothesized clonal distribution of the *Varroa* types due to "bottleneck" events during the expansion process (Solignac *et al.*, 2003). Although microsatellite analyses were not performed in the present study, our mitochondrial data support the lack of molecular variation of the *Varroa* population infesting the European (in this case Iberian) honey bee.

The presence of one mite bearing the Japan haplotype was confirmed by crossing RFLP experiments with two restriction enzymes that produce complementary results (Anderson and Fuchs, 1998). After performing the *Xho*I test and to avoid the possibility of mutation at the restriction target, we conducted the *Sac*I test which confirmed the results. Given the low frequency of the Japan haplotype it can be considered that the *varroa* population infesting *A. m. iberiensis* colonies is pure Korea haplotype and that the detection of the Japan haplotype is exceptional, probably due to importations of honey bee queens from countries such as those on the American continent where this haplotype is present.

This result emphasises the importance of applying adequate controls on the movement and importation of honey bees to avoid the introduction of parasites into regions free of them. For example, in 2004 the fast and competent control measures of the Portuguese National Veterinarian Services avoided the introduction of two young larvae of small hive beetle *Aethina tumida* found in a legal importation of 122 queen cages and escorting workers from the US (Murilhas, 2005).

In order to elucidate whether the different mite haplotypes would be restricted to a particular honey bee evolutionary lineage or haplotype, the mitochondrial haplotype was determined for those colonies from the apiary where both the Japan and Korea mite haplotypes coexisted. The results obtained suggest that in the Iberian Peninsula the pattern of *V. destructor* haplotype distribution is not related to the mitochondrial evolutionary lineages observed in the populations of *A. m. iberiensis* (Cánovas *et al.* 2007). In fact both the Japan and Korean *Varroa* haplotype infested honey bee colonies bearing the same European (M4) haplotype. This conclusion although based in just one sample, supports the lack of any relationship between parasite-host in relation to mitochondrial evolution, but needs further studies to make a sound interpretation of this data.

This study has also shown the vital importance of determining the identity of *varroa* haplotypes in European experiments dealing with *varroa* tolerance, as it is possible that the J haplotype may now be more common in Europe than has been previously thought (due to its spread through the world trade of live honey bees) and its presence could bias interpretation of results.

Acknowledgements

This study was supported by projects RTA2005-00152, JCCM 05-280/PA-47, API-06-009, and API06-010-COORD-2. We very much appreciate the help of the beekeepers, professional beekeepers associations and veterinaries who provided the honey bee and *varroa* samples. Thanks are also given to A. Pinto, A. Arias, F. Padilla and J.M Flores for their collaboration. P. De la Rúa is supported by the Program Ramón y Cajal of the Spanish Ministry of Education and Science.

References

- ANDERSON, D L (2000) Variation in the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 31: 281–292.
- ANDERSON, D L; FUCHS, S (1998) Two genetically distinct populations of *Varroa jacobsoni* with contrasting reproductive abilities on *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* 37: 69–78.
- ANDERSON, D L; TRUEMAN, J W H (2000) *Varroa jacobsoni* is more than one species. *Experimental and Applied Acarology* 24: 165–189.
- BOGDANOV, S (2006) Contaminants of bee products. *Apidologie* 37: 1–18.
- CÁNOVAS, F; DE LA RÚA, P; SERRANO, J; GALIÁN, J (2007) Geographic patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 46: 24–30.
- DE GUZMAN, L I; RINDERER, T E; STELZER, J A; ANDERSON, D L (1998). Congruence of RAPD and mitochondrial markers in assessing *Varroa jacobsoni* genotypes. *Journal of Apicultural Research* 37: 49–51.
- DE GUZMAN, L I; RINDERER, T E; STELZER, J A (1999). Occurrence of two genotypes of *Varroa jacobsoni* Oud in North America. *Apidologie* 30: 31–36.
- GARNERY, L; SOLIGNAC, M; CELEBRANO, G; CORNUET, J-M (1993) A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia* 49: 1016–1021.
- GARRIDO, C; ROSENKRANZ, P; PAXTON, R J; GONÇALVES, L S (2003) Temporal changes in *Varroa destructor* fertility and haplotype in Brazil. *Apidologie* 34: 535–541.
- HARBO, J R; HARRIS, J W (1999) Selecting honey bees for resistance to *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 30: 183–196.
- IBRAHIM, A; REUTER, G S; SPIVAK, M (2007) Field trial of honey bee colonies bred for mechanisms of resistance against *Varroa destructor*. *Apidologie* 38: 67–76.
- LLORENTE, J (2003) *Principales enfermedades de las abejas*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 158 pp.
- MARTIN, S J (2004) Acaricide (pyrethroid) resistance in *Varroa destructor*. *Bee World* 85: 67–69.
- MILANI, N (1999) The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie* 30: 229–234.
- MURILHAS, A (2005) *Aethina tumida* arrives in Portugal. Will it be eradicated? *EurBee Newsletter* 2: 7–9.
- ROSENKRANZ, P (1999) Honey bee (*Apis mellifera* L.) tolerance to *Varroa jacobsoni* Oud. in South America. *Apidologie* 30: 159–172.
- SOLIGNAC, M; VAUTRIN, D; PIZZO, A; NAVAJAS, M; LE CONTE, Y; CORNUET, J-M (2003) Characterization of microsatellite markers from the apicultural pest *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and its relatives. *Molecular Ecology Notes* 3: 556–559.
- SOLIGNAC, M; CORNUET, J-M; VAUTRIN, D; LE CONTE, Y; ANDERSON, D; EVANS, J; CROS-ARTEIL, S; NAVAJAS, M (2005) The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the Western honey bee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 272: 411–419.
- WALLNER, K (1999) Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie* 30: 235–248.
- WALSH, P S; METZGER, D A; HIGUCHI, R (1991) ChelexR 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506–513.
- ZHOU, T; ANDERSON, D L; HUANG, Z Y; HUANG, S; YAO, J; KEN, T; ZHANG, Q (2004). Identification of *Varroa* mites (Acari: Varroidae) infesting *Apis cerana* and *Apis mellifera* in China. *Apidologie* 35: 645–654.

Overview of Pesticide Residues in Stored Pollen and Their Potential Effect on Bee Colony (*Apis mellifera*) Losses in Spain

J. BERNAL,^{1,2} E. GARRIDO-BAILÓN,³ M. J. DEL NOZAL,¹ A. V. GONZÁLEZ-PORTO,³
R. MARTÍN-HERNÁNDEZ,³ J. C. DIEGO,¹ J. J. JIMÉNEZ,¹ J. L. BERNAL,¹ AND M. HIGES³

J. Econ. Entomol. 103(6): 1964–1971 (2010); DOI: 10.1603/EC10235

ABSTRACT In the last decade, an increase in honey bee (*Apis mellifera* L.) colony losses has been reported in several countries. The causes of this decline are still not clear. This study was set out to evaluate the pesticide residues in stored pollen from honey bee colonies and their possible impact on honey bee losses in Spain. In total, 1,021 professional apiaries were randomly selected. All pollen samples were subjected to multiresidue analysis by gas chromatography-mass spectrometry (MS) and liquid chromatography-MS; moreover, specific methods were applied for neonicotinoids and fipronil. A palynological analysis also was carried out to confirm the type of foraging crop. Pesticide residues were detected in 42% of samples collected in spring, and only in 31% of samples collected in autumn. Fluvalinate and chlorfenvinphos were the most frequently detected pesticides in the analyzed samples. Fipronil was detected in 3.7% of all the spring samples but never in autumn samples, and neonicotinoid residues were not detected. More than 47.8% of stored pollen samples belonged to wild vegetation, and sunflower (*Helianthus* spp.) pollen was only detected in 10.4% of the samples. A direct relation between pesticide residues found in stored pollen samples and colony losses was not evident accordingly to the obtained results. Further studies are necessary to determine the possible role of the most frequent and abundant pesticides (such as acaricides) and the synergism among them and with other pathogens more prevalent in Spain.

KEY WORDS *Apis mellifera*, stored pollen, colony losses, pesticide residues

It is well known that honey bees (*Apis mellifera* L.) fulfill an important ecological and economic role as pollinators of many crops and wild plants and that certain field treatments may have potential deleterious effects on this group of beneficial insects (FAO 2008). In fact, analyzing pollen, honey, and other honey bee products usually provides useful indications regarding to the diffusion of pesticides and micropollutants within the environment. Therefore, it is common for investigators to use honey bees or honey bee products as tools to assess environmental pollution in industrial or agricultural areas (Bromenshenk et al. 1985, De Greef et al. 1994, Wallner 1999, Chauzat et al. 2006; Belayiannis and Belayiannis 2008, Gross 2008).

In the last decade, an increase in honey bee colony losses have been reported in several European and American countries (Gross 2007, 2008), including Spain, where recent data from many apiarists, indicate a loss close to 80% of beehives (COST office action FA0803-COLOSS and Centro Apícola Regional, unpublished data). Several lines of research are being carried out on the assumption that it is a multifactorial problem, in which external factors such pesticides may

confuse bees, impeding them from finding their way back to their hive or directly causing their death (El Hassani et al. 2005, Rortais et al. 2005, Gross, 2008). In the same way, there is some research devoted to measure the residues content (Chauzat et al. 2009, Mullin et al. 2010), whereas other work has focused onto searching for specific compounds, mainly related to the evaluation and assessment of possible sublethal effects of some pesticides, such as neonicotinoids on bees, which is increasing the interest among scientists, beekeepers, and regulatory authorities (Decourtye et al. 2004, Halm et al. 2006, Nguyen et al. 2009, van-Engelsdorp et al. 2009). Possible interactions between some compounds (Johnson et al. 2009) or between particular compounds and pathogens are being studied. It has been shown recently that entomopathogenic fungi and chemical insecticides, such imidacloprid, together significantly increased the lethality of control agents (Alaux et al. 2010).

For several years, our group has been investigating the possible causes of the colony loss in Spain, and we have found several factors that could explain this phenomenon, including the presence of *Nosema ceranae*, but not excluding other possible factors (Higes et al. 2010a,b). Among them, we have interest in assessing the contamination resulting from pesticide use in agriculture and from beekeeping practices, and its consequences on beehive health. To this end, a field sur-

¹ IU CINQUIMA, Analytical Chemistry Group, University of Valladolid, E-47071 Valladolid, Spain.

² Corresponding author, e-mail: pepinho@qa.uva.es.

³ Centro Apícola Regional. Bee Pathology Laboratory. Consejería de Agricultura, Marchamalo. E-19180 Guadalajara, Spain.

Short communication. The detection of Israeli Acute Paralysis virus (IAPV), fipronil and imidacloprid in professional apiaries are not related with massive honey bee colony loss in Spain

E. Garrido-Bailón¹, R. Martín-Hernández¹, J. Bernal², J. L. Bernal²,
A. Martínez-Salvador³, L. Barrios⁴, A. Meana⁵ and M. Higes^{1*}

¹ Bee Pathology Laboratory. Centro Apícola Regional. JCCM. 19180 Marchamalo. Spain

² IU CINQUIMA. Analytical Chemistry Group. Facultad de Ciencias. Universidad de Valladolid. 47011 Valladolid. Spain

³ Department of Epidemiology. Animal Health and Livest Co. (Tragsega). 28006 Madrid. Spain

⁴ Statistics Department. CTI. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 28006 Madrid. Spain

⁵ Animal Health Department. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid. Spain

Abstract

This study is presented in order to determine the presence and impact of some factors related with honeybee colony losses such as Israeli Acute Paralysis virus (IAPV) and certain pesticides. Samples (house worker bees and stored pollen from brood chamber) were selected from one hundred apiaries, half of them with a clear underpopulation, in accordance with region and time of the year. Total prevalence of IAPV either in spring or in autumn was 18% (CI95% = 9.9-26.0; $p < 0.0001$), no relationship between IAPV and depopulated colonies was established. Fipronil was only detected in two samples of stored pollen from asymptomatic colonies and imidacloprid was not detected in any sample. Like IAPV, neither fipronil nor imidacloprid appeared to be directly related with the generalized problem of colony death and honey bee losses in professional Spanish apiaries.

Additional key words: *Apis mellifera*, honeybee colony loss, neonicotinoids, pesticides, viruses.

Resumen

Comunicación corta. La detección de IAPV, fipronil e imidacloprida en colmenares profesionales no está relacionada con la masiva pérdida de colonias de abejas en España

Se llevó a cabo un estudio para determinar la presencia y el impacto de algunos factores relacionados con las pérdidas de colonias de abejas, como el virus IAPV (virus israelita de parálisis aguda) y ciertos pesticidas. Se incluyeron en el estudio muestras (abejas adultas y polen almacenado de la cámara de cría) procedentes de 100 colmenares profesionales, la mitad de ellas con claros síntomas de despoblamiento de acuerdo con la región y el momento del año. La prevalencia total del virus IAPV fue del 18% (CI95% = 9,9-26,0; $p < 0,0001$), tanto en otoño como en primavera y su presencia no estaba directamente relacionada con la manifestación del síntoma de despoblamiento en las colonias de abejas. El fipronil se detectó solo en dos muestras de polen almacenado en la cámara de cría de las colmenas, en ambos casos en colonias asintomáticas. No se detectó imidacloprida en ninguna muestra. Nuestros resultados sugieren que IAPV, fipronil e imidacloprida no están relacionados con las muertes masivas de colonias de abejas detectadas en colmenares profesionales en España.

Palabras clave adicionales: *Apis mellifera*, fipronil, IAPV, imidacloprida, pérdida de colonias de abejas.

In recent years, high losses of worker honey bees have been reported worldwide. Accordingly, unexpected honey bee colony losses have been reported by

beekeepers in Spanish apiaries since autumn/winter 2004, with mortality rates of up to 85% of the colonies in certain areas of the country. Indeed, from 2006, this

* Corresponding author: mhiges@jccm.es

Received: 08-12-09; Accepted: 28-04-10.

Abbreviations used: CCD (colony collapse disorder), IAPV (Israeli Acute Paralysis Virus).

problem has become more widespread across the entire Spanish territory. Some hypotheses regarding the origin of this phenomenon have been linked to the deleterious effect of certain pesticides (Chauzat *et al.*, 2006), the possible introduction of a novel infectious agent, such as *Nosema ceranae* (Martín-Hernández *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2008; revised by Williams, 2009) or of the Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV: Cox-Foster *et al.*, 2007), as well as other aetiologies (*e.g.*, environmental and climatic changes, radiation, the synergistic action of different agents). However, these latest hypotheses have not always been supported by well founded scientific data.

In this study, a total of 100 samples were included in the study from 100 different professional apiaries from 33 different Spanish provinces. The case definition for the disease was: the unusual presence of few adult bees from the hives with no or little builds up of dead bees in or in front of the colony compared with highly productive colonies in the same region and time of the year.

Each sample was composed of adult house worker honey bees ($n > 200$) and stored pollen (> 100 g) from brood chamber combs. The samples were collected by the veterinary services of beekeeping and included a report about the sanitary status of the colonies in the moment of sampling. Samples were obtained in the spring ($n = 50$) and autumn ($n = 50$) of 2006 (Figs. 1a and 1b) and while 55 of them came from diseased colonies ($n = 28$ spring samples, $n = 27$ autumn samples), the other 45 were from asymptomatic colonies ($n = 22$ spring samples, $n = 23$ autumn samples).

IAPV analyses were carried out as described previously (Maori *et al.*, 2007) in the virus laboratory of Hebrew University of Jerusalem (Israel). The presence of fipronil and imidacloprid in stored pollen were carried out as described previously (Jiménez *et al.*, 2007; Higes *et al.*, 2008).

To define the correlation between the presence of each one of these three agents and colony depopulation, three successive and independent contrasting hypotheses were proposed based on the Chi-squared asymptotic test and calculating the exact probabilities. The statistical analyses were all performed using SPSS 15.0.1.

Total prevalence of IAPV in the period of sampling was 18% (CI95% = 9,9-26,0; $p < 0.0001$), and 9 apiaries from 8 different Spanish provinces were IAPV positive in spring. Similar results were obtained in autumn 2006, when 8 apiaries were found as IAPV positive (Figs. 1a and 1b). No significant correlation was established between IAPV detection and depopulation symptoms (Chi-square, $p > 0.05$, Table 1). Fipronil was only detected in 2 samples of stored pollen from asymptomatic colonies in two provinces during spring (Fig. 1a), and it was not related with colony depopulation (Chi-square, $p > 0.05$). Imidacloprid was not detected in any of the stored pollen samples.

IAPV was first described in Israel (Maori *et al.*, 2007) and it was associated with bee mortality, even though only some hives in an apiary were affected. It was suggested that genetic diversity among honey bees could explain the different susceptibility/resistance

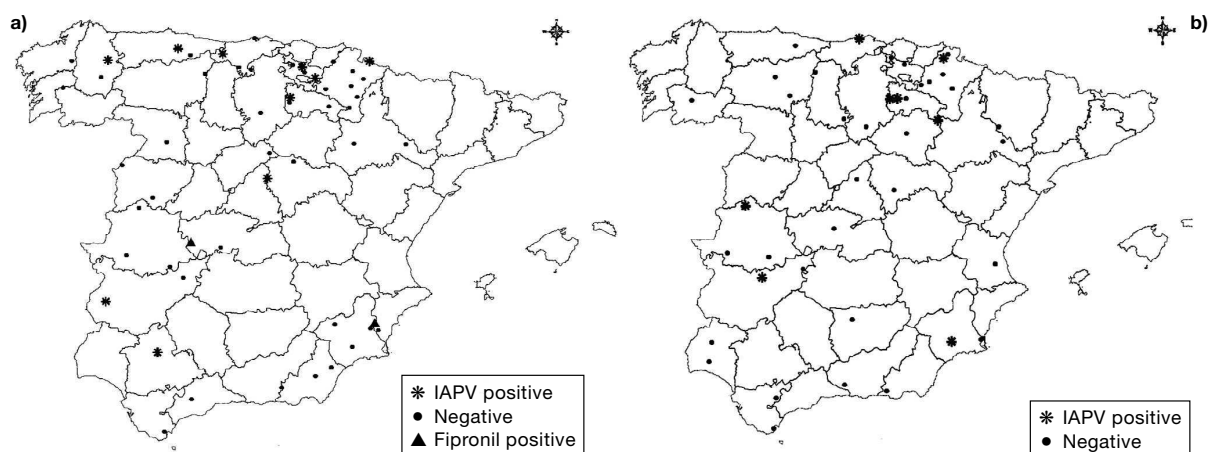


Figure 1. Collection sites of the Spanish apiaries monitors in a) spring 2006 (N = 50) and b) autumn 2006 (N = 50). • Samples negative to both Fipronil and IAPV. ▲ Samples positive to Fipronil. * Samples positive to IAPV. None sample was positive to both of studied factors.

Table 1. Frequencies of detection of studied factors (IAPV and Fipronil) in colonies showing depopulation symptoms or asymptomatic

	Depopulation symptoms			Asymptomatic		
	Spring	Autumn	Chi-square	Spring	Autumn	Chi-square
IAPV	6/31	3/25	$p > 0.05$	3/19	6/25	$p > 0.05$
Fipronil	0/31	0/25	$p > 0.05$	2/19	0/25	$p > 0.05$

between hives in an apiary. Thus, it was proposed that IAPV is related to the problem of bee colony losses in the USA (Cox-Foster *et al.*, 2007) and that it is a significant marker for Colony Collapse Disorder (CCD). However, further works found IAPV to be present in U.S. bees since prior to CCD, and that U.S. isolates of IAPV are not substantially different from those found in Israel (Chen and Evans, 2007). Indeed, no association was established between this virus and the severe winter losses in France, since the prevalence of IAPV in this country is 14% (Blanchard *et al.*, 2008), indicating that other pathogens/factors may be responsible for the colony loss. In our research work we found no relationship between IAPV and depopulated colonies, our results are consistent with these latter conclusions. Indeed, the prevalence of IAPV (18%) is very low compared with other pathogens that are more prevalent in Spain such as *Nosema ceranae* (Higes *et al.*, 2006; Martín-Hernández *et al.*, 2007) and *Varroa destructor* (Bee Pathology laboratory, Centro Apícola Regional, unpublished data) do appear to affect the health status of our apiaries. Thus, IAPV does not seem to be a good marker for depopulation and colony loss, although the exact pathogenic role of this virus in Spanish honey bee colonies remains to be defined.

It has been proposed that bees come into contact with pesticides through the pollen and/or nectar they consume. Accordingly, stored pollen could be a chronic source of toxic to the bees (Faucon *et al.*, 2005), which would mainly exert their influence in autumn/winter since stored pollen is practically the only pollen that the bees consume in this season (Seeley, 1985). The toxicity of sub-lethal doses of fipronil in honey bees has been demonstrated in laboratory studies but until now, not in field conditions (El Hassani *et al.*, 2005). In Spain, its use has been authorized for sunflower (*Helianthus annuus*) and other crops since 2004. As a consequence, its application to sunflower seeds is very recent and it is limited to very specific geographic sites in central and southern Spain. Indeed, in 2007 fipronil residues were only detected in two samples but they

were not directly related with unhealthy colonies. Imidacloprid is a neonicotinoid that is toxic to honey bees, and authorized in Spain to treat corn (*Zea mays*) crops, fruit trees and vegetable crops but their prevalence in stored pollen samples from Spain is very low as described previously and not related with colony losses from professional apiaries (Higes *et al.*, 2009b). Actually the bee losses observed by beekeepers in France or Belgium are not attributed to imidacloprid and other causes such as pathogens or other unidentified synergistic factors have been considered in the origin (Schmuck, 2004; Faucon *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2009).

Thus, like IAPV, neither of these two insecticides we tested appears to be directly related with the generalized problem of colony death and honey bee losses in professional Spanish apiaries. Honey bee losses are likely to be provoked by different causes but the recent pandemic produces weakness, depopulation or death clinical features similar to those caused by the emergent pathogen *N. ceranae*, known to be a short-term bee pathogen (Higes *et al.*, 2007; Paxton *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009a,b) and a long-term colony pathogen (Higes *et al.*, 2008, 2009a; Korpela, 2009). Along similar lines, well-known pathogens like *V. destructor*, one of the main pathogens of *A. mellifera*, can cause a similar illness and act as a re-emerging agent if not suitably controlled. In our country, the combination of both pathogens and the highly pathogenic viruses associated with them could increase the risk of death in infected colonies, without pesticides exerting a significant effect (Higes *et al.*, 2009b).

Acknowledgements

The authors wish to thank the Spanish beekeeper Associations for supplying the samples and Dr. Sela's lab from Hebrew University of Jerusalem for IAPV analysis. This study was supported by the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (Consejería de Agricultura) and INIA (RTA2005-152 and RTA 2008-

00020-C02-01). R. Martín-Hernández was co-financed by the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (JCCM) and INIA-European Social Found.

References

- BLANCHARD P., SCHURR F., CELLE O., COUGOULE N., DRAJNUDEL P., THIÉRY T., FAUCON J.P., RIBIÈRE M., 2008. First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol* 99, 348-350.
- CHAUZAT M.P., FAUCON J.P., MARTEL A.C., LACHAIEZE J., COUGOULE N., AUBERT M., 2006. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *J Econ Entomol* 99, 253-262. doi: 0022-0493/06/0253?0262\$04.00/0.
- CHEN Y., EVANS J.D., 2007. Historical presence of Israeli Acute Paralysis Virus in the United States. *Am Bee J* 147, 1027-1028.
- CHEN Y.P., EVANS J.D., MURPHY C., GUTELL R., ZUKER M., GUNDENSEN-RINDAL D., PETTIS J.S., 2009a. Morphological, molecular and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a Microsporidian parasite isolated from the European honey bee *Apis mellifera*. *J Eukaryot Microbiol* 56, 142-147. doi: 10.1111/j.1550-7408.2008.00374.x.
- CHEN Y.P., EVANS J.D., ZHOU L., BONCRISTIANI H., KIMURA K., XIAO T., LITKOWSKI A.M., PETTIS J.S., 2009b. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *J Invertebr Pathol* 101, 204-209. doi: 10.1016/j.jip.2009.05.012.
- COX-FOSTER D.L., CONLAN S., HOLMES E., PALACIOS G., EVANS J.D., MORAN N.A., *et al.*, 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee Colony Collapse Disorder. *Science* 318, 283-287. doi: 10.1126/science.1146498.
- EL HASSANI A.K., DACHER M., GAUTHIER M., ARMENGAUD C., 2005. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacol Biochem Behav*, 82, 30-39.
- FAUCON J.P., AURIÈRES C., DRAJNUDEL P., MATHIEU L., RIBIÈRE M., MARTEL A.C., ZEGGANE S., CHAUZAT M.P., AUBERT M., 2005. Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Pest Manag Sci* 61, 111-125. doi: 10.1002/ps.957.
- HIGES M., MARTÍN-HERNÁNDEZ R., MEANA A., 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J Invertebr Pathol* 92, 93-95. doi: 10.1016/j.jip.2006.02.005.
- HIGES M., GARCÍA-PALENCIA P., MARTÍN-HERNÁNDEZ R., MEANA A., 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with the Microsporidia *Nosema ceranae*. *J Invertebr Pathol* 94, 211-217. doi: 10.1016/j.jip.2006.11.001.
- HIGES M., MARTÍN-HERNÁNDEZ R., BOTÍAS C., GARRIDO-BAILÓN E., GONZÁLEZ-PORTO A.V., BARRIOS L., DEL NOZAL M., BERNAL J.L., JIMÉNEZ J.J., GARCÍA-PALENCIA P., MEANA A., 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ Microbiol* 10, 2659-2669. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x.
- HIGES M., MARTÍN-HERNÁNDEZ R., GARRIDO-BAILÓN E., GONZÁLEZ-PORTO A.V., GARCÍA-PALENCIA P., MEANA A., DEL NOZAL M.J., MAYO R., BERNAL J.L., 2009a. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ Microbiol Reports* 1, 110-113. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00014.x.
- HIGES M., MARTÍN-HERNÁNDEZ R., MARTÍNEZ-SALVADOR A., GARRIDO-BAILÓN E., GONZÁLEZ-PORTO A.V., MEANA A., BERNAL J.L., NOZAL M.J., BERNAL J., 2009b. A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environ Microbiol Reports* 2(2), 243-250. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00099.x.
- KORPELA S., 2009. *Nosema* situation in Finland. Proc 5th COLOSS Conference. Montpellier, France, Sept. 14-15, p. 48.
- JIMÉNEZ J.J., BERNAL J.L., DEL NOZAL M.J., MARTÍN M.T., MAYO R., 2007. Comparative study of sample preparation procedures to determine fipronil in pollen by gas chromatography with mass spectrometric and electron capture detection. *J Chromatogr A* 1146, 8-16. doi: 10.1016/j.chroma.2007.01.117.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ R., MEANA A., PRIETO L., MARTÍNEZ-SALVADOR A., GARRIDO-BAILÓN E., HIGES M., 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl Environ Microbiol* 73, 6331-6338. doi: 10.1128/AEM.00270-07.
- MAORI E., TANNE E., SELA I., 2007. Reciprocal sequence exchange between non-retroviruses and hosts leading to the appearance of new host phenotypes. *Virology* 362, 342-349. doi: 10.1016/j.virol.2006.11.038.
- NGUYEN B.K., SAEGERMAN C., PIRAD C., MIGNON J., WIDART J., THIRIONET B., VERHEGGEN F.J., BERKVEN D., PAUW E., HAUBRUGE E., 2009. Does imidacloprid seed-treated maize have an impact on honey bee mortality? *J Econ Entomol* 102, 616-623. doi: 10.1603/029.102.0220.
- PAXTON R., KLEE J., KORPELA S., FRIES I., 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* 38, 558-565. doi: 10.1051/apido:2007037.
- SEELEY T.D., 1985. Honeybee ecology: a study of adaptation in social life. Princeton Univ Press, Princeton, NJ, USA.
- SCHMUCK R., 2004. Effects of a chronic dietary exposure of the honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to imidacloprid. *Arch Environ Contam Toxicol* 47, 471-478. doi: 10.1007/s00244-004-3057-6.
- WILLIAMS B.A.P., 2009. Unique physiology of host-parasite interactions in microsporidia infections. *Cell Microbiol* 11, 1551-1560. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01362.x.

Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*?

Raquel Martín-Hernández,^{1,2*} Cristina Botías,¹
Encarna Garrido Bailón,¹

Amparo Martínez-Salvador,³ Lourdes Prieto,⁴

Aránzazu Meana⁵ and Mariano Higes¹

¹Bee Pathology laboratory, Centro Apícola Regional, JCCM, 19180 Marchamalo, Spain.

²Instituto de Recursos Humanos para la Ciencia y la Tecnología (INCRECYT), Fundación Parque Científico y Tecnológico de Albacete, Spain.

³Epidemiology Consultant, C/Puente la Reina, 28050 Madrid, Spain.

⁴Instituto Universitario de Investigación en ciencias policiales (IUICP), Comisaría General de la Policía Científica, DNA Laboratory, Madrid, Spain.

⁵Animal Health Department, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

Summary

***Nosema ceranae* has been suggested to be replacing *Nosema apis* in some populations of *Apis mellifera* honeybees. However, this replacement from one to the other is not supported when studying the distribution and prevalence of both microsporidia in professional apiaries in Spanish territories (transverse study), their seasonal pattern in experimental hives with co-infection or their prevalence at individual level (either in worker bees or drones). Nevertheless, *N. ceranae* has shown to present a higher prevalence at all the studied levels that could indicate any advantage for its development over *N. apis* or that it is more adapted to Spanish conditions. Also, both microsporidia show a different pattern of preference for its development according to the prevalence in the different Spanish bioclimatic belts studied. Finally, the fact that all analyses were carried out using an Internal PCR Control (IPC) newly developed guarantees the confidence of the data extracted from the PCR analyses. This IPC provides a useful tool for laboratory detection of honeybee pathogens.**

Introduction

Nosemosis is the most widespread of adult bee diseases, causing significant economic losses to bee-keepers (OIE, 2008; Giersch *et al.*, 2009; Heintz *et al.*, 2011). To date, two microsporidia species have been associated with this disease, both infecting honeybees worldwide: *Nosema apis* (Zander, 1909) and *Nosema ceranae* (Fries *et al.*, 1996). The first of these, *N. apis*, was shown to infect the honeybee *Apis mellifera* more than 100 years ago and it was one of the first microsporidia to be described. By contrast, *N. ceranae* was only recently shown to infect *A. mellifera*, both in Europe and Asia (Higes *et al.*, 2005; 2006; Huang *et al.*, 2007).

Nosema ceranae was initially described in *Apis cerana* (Fries *et al.*, 1996) and the expansion of its host range to *A. mellifera* probably occurred in the last decade of the 20th Century (Klee *et al.*, 2007). Nosemosis caused by *N. ceranae* is now considered to be an internationally emergent disease (Higes *et al.*, 2010). Moreover, the rise in microsporidian infection of honeybees observed worldwide during the last 15 years (Klee *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2007; Calderón *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2008; Giersch *et al.*, 2009; Invernizzi *et al.*, 2009; Higes *et al.*, 2010; Yoshiyama and Kimura, 2011) is strongly associated with the colonization of this new host by *N. ceranae* (Martín-Hernández *et al.*, 2007), which is currently a more common infection than that of *N. apis* in European honeybees (Chen and Huang, 2010).

Epidemiological differences between these two microsporidia could support the rise of *N. ceranae* over *N. apis*. For example, *N. ceranae* seems to be less host-specific since it has been found in a wider range of hosts, including *Apis koschevnikovi* (Botías *et al.*, 2009), *Apis florea* (Suwannapong *et al.*, 2010a,b), *Apis dorsata* (Chaimanee *et al.*, 2010) and some Argentinean bumble bee species (Plischuk *et al.*, 2009), in which *N. apis* has been never reported. Moreover, differences have been found related to the season when infection can be detected. In this sense, *N. apis* infections have been associated with temperate climates and seasonal patterns, hardly being detected during the summer but with a small peak in the autumn and a stronger peak in spring (Bailey, 1955; Hornitzky, 2005). By contrast, *N. ceranae* seems not to have this seasonality, infecting bees

Received 16 June, 2011; revised 11 October, 2011; accepted 23 October, 2011. *For correspondence. E-mail rmhernandez@jccm.es; Tel. (+34) 949250026; Fax (+34) 949250176.

La sanidad de las abejas melíferas es un tema de actualidad debido al importante papel que estos insectos juegan en la polinización y en la producción de productos únicos como la miel o la jalea real. En los últimos años se han denunciado importantes pérdidas de colonias de abejas en la práctica totalidad del planeta y dado que los humanos somos los responsables de las continuas modificaciones ambientales a las que se ven sometidas, 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, es necesario realizar investigaciones orientadas al estudio de las causas de mortalidad como el que aquí se expone, así como establecer nuevos programas regionales y nacionales que limiten la difusión de las enfermedades apícolas.



Foto: Lois Fernández Vázquez