

# **Nosema ceranae en España y su relación con el despoblamiento de las colmenas.**

Situación en 2006

REVISTA EL COLMENAR Nº 85 2007

El presente artículo es continuación del ya publicado en octubre de 2005, en el cual poníamos de manifiesto la detección por primera vez en Europa del microsporidio *Nosema ceranae* parasitando *Apis mellifera*, y provocando un cuadro clínico cuya principal manifestación era la ausencia de síntomas previos a la muerte de gran número de abejas. Después de más de un año de intensos trabajos de investigación, los resultados hasta ahora obtenidos refuerzan la hipótesis de que la acción patógena de este microsporidio guarda relación con la desaparición de abejas como causa del síndrome de despoblamiento de las colmenas.

La detección de *Nosema ceranae* por nuestro equipo de investigación en colonias de abejas afectadas por despoblamiento no ha sido un hecho accidental, sino la culminación de más de 6 años de trabajos de investigación y del análisis de más de 8.000 muestras de abejas tanto de España como de diferentes países de la Unión Europea.

Hasta junio del año 2006, año en que fue detectado por primera vez en abejas de once provincias españolas diferentes (Higes y col., 2006<sup>a</sup>), prácticamente no existía información bibliográfica acerca de *N. Ceranae*. Solo se había publicado un trabajo (Fries y col. 1996) en el que se realizaba una identificación de este parásito por su morfología y características moleculares, en un aislado en abejas asiáticas *Apis cerana* en China. En el mismo, no se estudiaba la capacidad lesiva (patogenicidad) del parásito en su hospedador, aunque sí se describían alteraciones a nivel del ventrículo compatibles con una nosemosis clásica, estos mismos autores (Fries y col., 1995) previamente habían detectado diferencias en la patogenicidad de la nosemosis entre la abeja asiática y la europea, siendo esta última más sensible a la acción patógena de *Nosema Apis*, único microsporidio que se consideraba parásito de las abejas melíferas europeas. Las observaciones realizadas a lo largo de los últimos años y los resultados obtenidos en nuestros trabajos de investigación previos ya apuntaban la hipótesis de que *Nosema ceranae* presentaba una mayor patogenicidad para *Apis melífera* que la debida a *Nosema Apis*, hipótesis que ha sido confirmada recientemente, al infectar con este microsporidio abejas melíferas españolas en condiciones controladas de laboratorio (Higes y col., 2006b). Este hecho es una base importante para establecer un nexo de conexión entre esta mayor patogenicidad y el despoblamiento y muerte de colmenas que se está produciendo en España y el resto de países europeos.

Como ya apuntábamos en el anterior artículo, el problema puede ser realmente grave a nivel mundial, ya que en las mismas fechas que fue detectado este microsporidio en España se denunció su presencia en Taiwán en abejas melíferas europeas. Huang y col. en un trabajo presentado en el 38 Meeting of the Society for Invertebrate Pathology (7-11 de agosto de 2005, Anchorage, Alaska, USA) y que se ha publicado recientemente en la revista *Apilogie* (aceptado el 16/10/2006), detectaron en colmenares de Taiwán, *Apis mellifera* parasitadas por *Nosema ceranae*. Desde el punto de vista epidemiológico, este hallazgo fue de gran importancia, ya que confirmó que en el área geográfica de origen de *Nosema ceranae*, el parásito habrá sido capaz de pasar a un hospedador nuevo (*Apis mellifera*), y por lo tanto, permite deducir que *Nosema ceranae* se ha propagado

por las colonias de abejas melíferas europeas, como ya hizo Varroa. De una forma similar, el parásito se ha expandido por el continente Asiático y el Europeo, hasta llegar a nuestro país (Higes y col., 2005). Apoyando esta hipótesis están las recientes denuncias en países europeos de nuestro entorno de la presencia de *Nosema ceranae*, en la que nuestro laboratorio ha participado activamente al poner a disposición de los investigadores europeos las técnicas utilizadas y actualizadas. De esta forma, hemos detectado el parásito también por primera vez en países como Francia, Alemania, Suiza y Eslovenia en abejas también afectadas por despoblamiento.

El actualmente conocido como “síndrome de despoblamiento de las colmenas”, no es un fenómeno nuevo, si bien se ha manifestado de manera más evidente y más generalizada en todo el territorio nacional. Nuestro equipo de trabajo ya identificó un mayor número de abejas con esporas de *Nosema*, de tamaño ligeramente menor de lo habitual en los primeros años del nuevo siglo, momento en el que probablemente el parásito *Nosema ceranae* pudo llegar a nuestro país.

En los años 2003 y 2004 el síndrome de despoblamiento se manifestó de forma evidente durante el otoño e invierno, momento en el que se produjeron la mayor parte de las bajas en los colmenares. Sin embargo, durante 2005 y 2006, este fenómeno se ha detectado a lo largo de todo el año, incluso durante el verano. El único signo relacionado con este cuadro es la desaparición de las abejas sin presencia de las mismas ceras de las colmenas y un progresivo descenso en las producciones de miel y polen por la pérdida de la población de abejas. No es frecuente apreciar mortalidad evidente las mismas en las colmenas, tan solo una neta falta de vigor. En la última fase, las colonias de abejas desaparecen debido a que no cuentan con una población de abejas suficiente para mantener la termorregulación interna, ni pueden aprovechar las reservas de miel y polen ni atender a la cría, si esta aun existe. En las últimas fases de este síndrome es frecuente que aparezcan patologías asociadas en la cría como son la loque americana o la ascosferosis.

Desde el año 1999 hasta la actualidad se han remitido al laboratorio del CAR muestras para el diagnóstico de este síndrome que demuestran claramente la existencia de un problema ya que se han pasado desde 132 muestras anuales hasta más de 4000, lo que ocasionó que la mayoría de las investigaciones del Centro se enfocaran en su resolución, incluso en detrimento de otras líneas de actuación.

La primera línea de actuación se relacionó con la hipótesis esgrimida por gran parte del sector de que la causa era la acción tóxica de determinados pesticidas agrícolas.

Actualmente sigue siendo la principal etiología barajada por parte del sector.

Como ya indicábamos en nuestro artículo anterior, en los últimos seis años, hemos estudiado la posible acción de determinados pesticidas de uso agrícola como la imidacloprida (Gaucho<sup>®</sup>) o el fipronil (Regent<sup>®</sup>), utilizados en el tratamiento de las semillas de girasol, y su relación con el despoblamiento de las colmenas, debido a la preocupación del sector por la posible utilización de estos productos y derivado de algunos trabajos realizados en Francia durante los primeros años.

A este respecto, resultan esclarecedores los datos presentados en la “Second European Conference of Apidology” celebrada en Praga, en septiembre de 2006. Algunos trabajos (Wheling y col. 2006) confirman científicamente que la utilización en condiciones de campo de semillas de girasol con un tratamiento estándar de imidacloprida, no suponen un riesgo real para las abejas. Bajo otro tipo de condiciones son productos tóxicos para las abejas (Rortais y col., 2006), pero no en la relación abeja/girasol. En cuanto al fipronil, en el citado Congreso también se presentaron trabajos realizados bajo condiciones de laboratorio o semi-campo (pruebas en túnel) (Chauzat y col., 2006; Decourtye, 2006; Bernadou y col., 2006), en los que se concluye el elevado potencial

toxico, que bajo estas condiciones controladas, tiene esta molécula para las abejas, aunque no se dispone de información real en condiciones de campo, ni de ensayos realizados sobre campos de girasol cuyas semillas fueran tratadas con este insecticida, que confirmen este efecto en condiciones de campo.

En España y como ya indicamos en el informe anterior la imidacioprida sigue sin estar autorizada para el tratamiento de semillas de girasol. Es importante reseñar que los análisis realizados por nuestro equipo entre 1999 y 2001 tanto en semillas de girasol como en polen de girasol, abejas y miel de colmenas ubicadas en diferentes plantaciones de girasol de Castilla La Mancha, no mostraron la presencia de esta molécula o de ninguno de sus metabolitos por encima de los límites de detección de las técnicas empleadas, del orden de la ppb, en lo referido al fipronil, la situación es diferente, como también indicamos.

Actualmente esta sustancia está autorizada para el tratamiento de las semillas de girasol, habiéndose utilizado por primera vez en España en 2004. En ese año, solamente recibieron semillas tratadas con fipronil el 5% del total de hectáreas sembradas de girasol. Estas se encontraban exclusivamente en Córdoba, Sevilla y en la provincia de Cuenca. En 2005 este porcentaje fue del 8% de las hectáreas sembradas de girasol en las mismas provincias.

Además, la fuerte sequía de ese año determinó que gran parte del girasol sembrado en Andalucía no fuera aprovechado por los apicultores. En 2006, la situación es similar a la de 2005, habiéndose utilizado semillas de girasol tratadas con fipronil para sembrar aproximadamente el 8% de las hectáreas totales que han tenido este cultivo, fundamentalmente en las tres provincias citadas con anterioridad.

Durante el verano de 2005 se ha llevado a cabo un completo estudio de campo de las posibles repercusiones que sobre las colonias de abejas tienen los cultivos de girasol cuyas semillas se trataron con fipronil en la provincia de Cuenca, una de las provincias con mayor superficie de girasol sembrado de toda España. En enero de 2006 se finalizaron todas las pruebas realizadas sobre las muestras obtenidas en campo (abejas pecoreadoras, miel, polen corbicular y polen almacenado) durante los meses de julio (antes de florecer el girasol), agosto (en plena floración del girasol). Y en octubre (antes de la invernada), con resultados contundentes. En los colmenares estudiados no se han encontrado problemas toxicológicos agudos, ni se ha detectado fipronil ni ninguno de sus metabolitos en las muestras estudiadas hasta ahora (seis colmenares experimentales y 50 muestras) con un límite de cuantificación de la técnica analítica de 0,0005 mg/kg. En todas las colonias de abejas se detectó, por el contrario, una altísima parasitación por *Nosema ceranae*.

Durante el verano de 2006 hemos realizado un estudio de similares características en la provincia de Sevilla, cuyos resultados están pendientes de informe. Sin embargo en las colmenas no se han observado problemas compatibles con la presentación de un cuadro tóxico y si la presencia de *Nosema ceranae* en la mayoría de ellas.

En cuanto a la presencia de estos y otros insecticidas en el polen de reservas de las colmenas, como fuente de intoxicación crónica de las colonias de abejas, los resultados previos obtenidos en proyecto INIA RTA2005-00152 titulado “debilitamiento y mortalidad de las colmenas en las principales zonas de producción apícola. Factores epidemiológicos”, indican que la presencia de pesticidas de origen fitosanitario en esta matriz es muy baja, aunque si aparecen en algunos casos residuos de sustancias acaricidas utilizadas de manera artesanal para el control de la varroosis, en particular chlorfenvinfos y fluvalinato. Todos estos datos confirman que el problema generalizado de despoblamiento y muerte de colmenas que se está produciendo en España y otros países europeos no parece guardar una relación directa con los pesticidas anteriormente

indicados, aunque estos si supongan un riesgo potencial para las abejas bajo determinadas circunstancias, o bajo determinados usos diferentes a los estudiados por nuestro equipo.

Los datos de prevalencia de agentes infecciosos y parasitarios diagnosticados en muestras remitidas al laboratorio descartan el papel etiológico de los virus por el bajo número de abejas que han dado positivo a estos agentes. La varroosis aun cuando no se descarta que tenga un cierto papel en el síndrome no aparece ser su única causa ya que el número de colmenas afectadas se ha mantenido similar a lo largo de los últimos años (entre el 20 y el 30%). Tan solo ha sido evidente el progresivo aumento de la detección de esporas de nosema en abejas procedentes de colmenas afectadas por el síndrome y es en esta línea en la que se han centrado los estudios los últimos años.

En julio de 2005 se detecto las primeras secuencias genéticas que nos permitieron confirmar la presencia de nosema ceranae en las abejas melíferas españolas.

Aunque como ya se ha señalado las diferencias morfológicas de esta especie ya se habían percibido en muchas de las esporas observadas en los años anteriores, en septiembre de mismo año se confirmo su amplia difusión en el territorio nacional (11 provincias diferentes, de diferentes comunidades autónomas) lo que indicaba que no era un hallazgo aislado, si no que afectaba a todo el territorio nacional (Higes y Col. 2005; Higes y Col. 2006a).

Tal y como era de suponer la difusión de nosema ceranae no se limitaba exclusivamente al territorio nacional, si no que afectara a otros muchos países como demuestra su denuncia en diferentes países europeos y en el continente americano (Paxton, comunicación personal) aunque es demasiado pronto para conocer la verdadera difusión del agente.

En la actualidad nuestros trabajos de investigación apoyan estas primeras hipótesis elaboradas sobre bases mas solidas, y cuyas conclusiones hasta el momento son las siguientes:

Nuestro equipo de trabajo a sido el primero en Europa en detectar la presencia de nosema ceranae parasitando Apis mellifera en colmenares afectados por despoblamiento. La identificación molecular permite asegurar que es similar a la especie encontrada en china hace años y por ello, puede ser considerada como parásito exótico en nuestro país.

Se sigue detectando la presencia de nosema Apis, generalmente en colmenares asintomáticos y más frecuente en zonas norte de España. Las secuencias genéticas de ambos parásitos en España han quedado registradas en un banco genético internacional (GenBank) a disposición de otros investigadores para su comparación con otras especies detectadas en otros países.

Hemos confirmado recientemente que nosema ceranae cierra totalmente su ciclo biológico en las abejas melíferas en menos de tres días y presenta una mayor capacidad patógena que nosema Apis para las abejas melíferas, matando a estas en pocos días sin ningún síntoma previo. Esto puede estar relacionado directamente con las observaciones que estamos realizando en campo sobre colmenas parasitadas de manera natural en nuestros colmenares experimentales y con datos que se reciben en nuestro laboratorio de diagnostico en relación con la desaparición de abejas sin signos clínicos previos.

Los métodos diagnósticos tradicionales utilizados para Detectar la nosemosis en las colmenas (fundamentalmente observación y recuento de esporas) han resultado ser poco fiables, y no permiten valorar el estado sanitario real de la colonia de abejas ni su nivel de infección, ni tampoco la relación que esta tiene con las manifestaciones clínicas.

Hemos detectado nosema ceranae en abejas de Francia. (AFSSA, INRA, y ADS del

jura), Alemania (laboratorio de referencia de la OIE) y Suiza (laboratorio investigación apícola de Liebefeld). En total hemos analizados 101 muestras de Francia, 80 muestras de Alemania y 32 muestras de suiza. Las correspondientes secuencias genéticas están también registradas en el GenBank. Las muestras mayoritariamente procedían de colmenas afectadas por fuertes despoblamiento y muertes de colonias. Las muestras analizadas de Francia, Alemania y suiza tienen porcentajes de *Nosema ceranae* muy superiores a Napis, sobre todo comparando con España. Así en Francia hemos encontrado solamente el 1% de las muestras parasitadas por *Nosema Apis*, el 6% presentan una doble parasitación por *Nosema ceranae*+ *Nosema Apis*, siendo el 93% positivas a *Nosema ceranae*. En Alemania el 5% de las muestras fueron positivas a *Nosema Apis* y el 95% positivas a *Nosema ceranae*. En suiza positivas el 3% de las muestras fueron positivas a *Nosema Apis* y el 97% positivas a *Nosema ceranae*. Sin embargo en España hemos detectado *Nosema ceranae* en el 75% de las muestras estudiadas (de estas el 16% presentan infección por *N. ceranae* y *N. apis*) y *Nosema Apis* en el 25%. Estos datos parecen indicar que el microsporidio ha seguido una ruta similar a *Varroa*, especie también procedente del sudeste asiático, y que habría llegado con anterioridad a los países más orientales, desplazando a *Nosema Apis* de su nicho ecológico. La denuncia de casos de despoblamiento en países europeos algunos años antes que en España podría indicar que *N. ceranae* llevaría más tiempo en estos países, y que su entrada en España ha sido más reciente, en esta línea Klee y Col. (2006) presentaron en el congreso anteriormente citado unos recientes datos que apoyan también esta hipótesis. *Nosema ceranae* produce en *Apis mellifera* un cuadro clínico característico, diferente al producido por *Nosema Apis*, y cuya principal manifestación es la muerte masiva y continua de abejas adultas que ocasiona que en un corto periodo de tiempo disminuya la población y se detecte el despoblamiento de la colmena tal y como ya aparece mencionado en la reciente reimpresión y actualización del libro de parasitología veterinaria de 1999 (Cordero del Campillo y col.).

Los primeros datos obtenidos en el estudio epidemiológico que estamos realizando gracias a la financiación del proyecto INIA RTA2005-00152 y JCCM 05-280/PA-47 (alrededor de 700 explotaciones apícolas muestreadas en toda España durante primavera de 2006), indican que la prevalencia de la nosemosis supera el 50% de media en todo el territorio nacional, siendo superior al 80% en algunas comunidades autónomas. La detección en el mismo estudio de *Varroa destructor* ha sido inferior al 25% por el momento. La prevalencia de las infecciones víricas determinadas por ahora, es muy inferior a la de otros países europeos. No hay datos que permitan, por ahora, atribuir el despoblamiento a la presencia de agroquímicos, dado que en las muestras analizadas hasta el momento prácticamente no se detectan.

Todos estos datos indicarían que *Nosema ceranae*, representa actualmente un riesgo sanitario de primera magnitud para las explotaciones apícolas españolas y europeas dada su alta prevalencia y su gran capacidad patógena, pudiendo provocar por sí sola el despoblamiento y muerte de las colmenas, proceso que por otra parte puede tardar en desarrollarse más de un año desde el inicio de la parasitación, como hemos podido comprobar en colmenas experimentales parasitadas de manera natural por *Nosema ceranae*. Este proceso puede producirse en un menor tiempo si concurren otras circunstancias sanitarias o de manejo que favorezcan el desarrollo del parásito. Sin embargo, no se deben descartar otras patologías, fundamentalmente la varroosis que sigue originando graves problemas sanitarios, o la loque americana y ascosferosis, cuya prevalencia está aumentando significativamente, probablemente asociada a la menor población adulta de la colmena.

En cuanto al tratamiento de esta enfermedad parasitaria, y como ya se apuntó, hemos

podido comprobar que la fumagilina está dando buenos resultados (Higes y Col, 2006c), cuando se respeta la posología recomendada y se aplican medidas profilácticas de manera simultánea. Nunca debe de aplicarse de manera preventiva, solamente como tratamiento una vez diagnosticada la enfermedad de manera correcta. También se ha confirmado que en las zonas más afectadas se producen reinfecciones en un corto espacio de tiempo, lo cual conlleva la necesidad de realizar estudios más profundos para la búsqueda de medidas integrales de control de esta enfermedad.

#### AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de la junta de comunidades de Castilla-La Mancha (proyecto 05-280/PA47), INIA (proyecto RTA2005-00152) y MAPA (API06-009).

Tampoco se podría haber llevado a cabo sin la ayuda de todas las asociaciones de apicultores, agrarias e instituciones, que han colaborado amablemente en el muestreo.