

2013

Epidemiología de los principales patógenos de interés apícola en Uruguay



Lic. Matilde Anido

Tesis de Maestría PEDECIBA

21/06/2013

Epidemiología de los principales patógenos de interés apícola en Uruguay.

Lic. Matilde Anido Fernández

TESIS DE MAESTRIA, PEDECIBA

ÁREA BIOLOGÍA,

SUB- AREA MICROBIOLOGÍA

2013

Tutor: Dra. Karina Antúnez.

Departamento de Microbiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Co-Tutor: Dr. Pablo Zunino.

Departamento de Microbiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Tribunal: Dr. Juan Arbiza, Dra. Inés Ponce León, Dr. Ciro Invernizzi.

Este trabajo fue financiado por PEDECIBA, proyecto ANII-Fondo Clemente Estable-2009-1903 y ANII-Beca Posgrado Nacional-2010-2363.

La frase mas excitante que se puede oír en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es "¡Eureka!" (¡Lo encontré!) sino 'Es extraño...!.

Isaac Asimov.

Bioquímico y escritor de ciencia ficción, historia y divulgación científica.

Foto de portada tomada y cedida amablemente por el Sr. Diego Venturini.

Agradecimientos

En primer lugar a Pablo Zunino por abrirme las puertas a este mundo de ciencias y abejas.

A Karina Antúnez por darme las herramientas y la formación que me permitió llegar a esta instancia.

¡A las abejitas!: Belén (gracias por tu ayuda con *P. larvae* y por bancar las 1001 preguntas acerca de la apicultura), Daniela (por toda la onda y los horóscopos), Loreley (gracias por tu ayuda con *Nosema* spp.).

A la new generation: Ana, Germán y Majo no tengo palabras, espero sepan lo mucho que significan para mi!

Al resto de la colonia por estar siempre haciendo biofilm. Mención especial para Paola por bancarme la locura después de las 18:00 hs.

A las chiquilinas (Ana, Ale, Lu, Marce, Mary, Micha) por bancarme con «este curro de las abejas» y toda la locura científica que conlleva.

A las otras chiquilinas (Analía, Ceci C., Ceci T., Maité) en especial checho por compartir la carrera desde el 2002 hasta hoy!

A mi familia por estar siempre a mi lado.

Y finalmente a la persona más importante de mi vida, mi gran amor y compañero: Khalil! Todos mis logros son más lindos porque los comparto contigo!

Abreviaturas

ABPV	Virus de la parálisis aguda
Agua mQ	Agua desionizada
Aba	Abaecina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
AP	Alta carga de patógenos
BP	Baja carga de patógenos
BQCV	Virus de las celdas reales negras
CBPV	Virus de la parálisis crónica
COI	Citocromo oxidasa I
Cq	Ciclo de cuantificación
DILAVE	Dirección de Laboratorios Veterinarios
dNTP	Desoxinucleotido trifosfato
DWV	Virus de las alas deformadas
Gld	Glucosa deshidrogenasa
H2O	Agua
H2Od	Agua destilada
Hym	Himenoptecina
IAPV	Virus israelí de la parálisis aguda
KBV	Virus kashmir
KDa	Kilo Daltons
LA	Loque Americana
Lyz	Lizosima
M	Molar
MGAP	Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca
ORs	Odds Ratio
pb	Pares de base
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PO	Fenol oxidasa
PPO	Pro fenol oxidasa
p/v	Peso/volumen
qPCR	PCR en Tiempo Real
RT	Retrotranscripción
SBV	Virus de la cría ensacada
UFC	Unidades formadoras de colonias
Vg	Vitelogenina

Resumen

En Uruguay la apicultura ha experimentado un gran desarrollo durante las últimas décadas, siendo la producción y exportación de miel la principal actividad en el sector. Sin embargo, en los últimos años, la presencia de diferentes patógenos ha afectado significativamente la producción apícola. Las abejas son infectadas por una gran variedad de patógenos, entre ellos: los ácaros *Varroa destructor* y *Acarapis woodi*; los virus ARN ABPV, BQCV, CBPV, DWV, SBV, KBV e IAPV; los microsporidios *Nosema apis* y *Nosema ceranae* y la bacteria *Paenibacillus larvae*. El objetivo del presente trabajo fue analizar la prevalencia y distribución de estos patógenos en Uruguay, así como evaluar su potencial influencia sobre el sistema inmune de la abeja.

En otoño de 2011 se muestrearon 103 apiarios de todo el Uruguay, tomándose muestras de abejas nodrizas, pecoreadoras y miel. A la vez se estimó el tamaño de la colmena y se colectó información del apiario. Las colmenas fueron seleccionadas en forma representativa de acuerdo a la densidad de colmenas por departamento. Se determinó la presencia de los microsporidios *N. ceranae* y *N. apis* mediante PCR múltiple; los virus ABPV, BQCV, CBPV, DWV, SBV, KBV e IAPV mediante RT-PCR en Tiempo Real, la bacteria *P. larvae* mediante cultivo bacteriológico y el ácaro *V. destructor* mediante conteo en lupa.

Los resultados obtenidos muestran que *V. destructor* es uno de los patógenos de mayor prevalencia en nuestro país (78%) y varios departamentos del Uruguay mostraron niveles de infestación peligrosos. A la vez se logró poner a punto la técnica de RT-PCR en Tiempo Real para la detección y cuantificación de los virus ABPV, BQCV, DWV, SBV, KBV e IAPV. Las prevalencias halladas fueron 29%, 87%, 19%, 17% para los virus ABPV, BQCV, DWV, SBV respectivamente, no encontrándose muestras infectadas con KBV o IAPV. Se destaca la amplia distribución y prevalencia que posee el virus BQCV, mientras que el resto de los virus se encuentran mayormente en las principales regiones productivas (litoral oeste del país). Se encontró una asociación significativa ($p < 0,05$) entre el nivel de infestación por *V. destructor* y el nivel de infección por el virus DWV.

N. ceranae fue el único microsporidio detectado en el país (15%); la no detección de *N. apis* sugiere un desplazamiento del último por *N. ceranae*. Se observó a su vez que *P. larvae* presenta una muy baja prevalencia (2%). Esto sugiere que las medidas de control aplicadas para su control han resultado exitosas.

En una segunda parte del trabajo se buscó analizar el impacto de los patógenos en el sistema inmune de las abejas. A partir de muestras previamente analizadas se formaron dos grupos: alta carga de patógenos (AP) y baja carga de patógenos (BP). Las muestras AP eran colonias infectadas con *V. destructor*, *N. ceranae*, BQCV y/o ABPV o DWV, mientras que las muestras BP eran colonias libres de patógenos o infectadas sólo con BQCV. Para evaluar el estado inmune de estos dos grupos se cuantificó la expresión de genes relacionados a la inmunidad mediante RT-PCR en Tiempo Real. Se estudió la expresión de los genes que codifican para péptidos antimicrobianos: abaecina, defensina e himenoptecina (respuesta humoral); genes involucrados en la respuesta celular: (profenol-) fenol oxidasa y glucosa dehidrogenasa; otros genes: lizosima y vitelogenina. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de los genes analizados entre los grupos BP y AP, sugiriendo que la respuesta inmune fue suprimida en el grupo AP probablemente por *V. destructor* o *N. ceranae*. Esto sugiere que estos patógenos podrían ser capaces de evadir la respuesta inmune.

Estos resultados realzan la importancia de controlar *V. destructor* ya que este patógeno es capaz de deprimir el sistema inmune e inocular virus, debilitando la salud de la abeja y abriendo la puerta a infecciones secundarias. Estos resultados serán útiles para el diseño de estrategias de control y prevención de la pérdida de colmenas.

Índice

Agradecimientos	3
Abreviaturas	4
Resumen	5
1. Introducción.....	8
1.1. Importancia de las abejas melíferas.....	8
1.2. Estado actual del sector apícola en el Uruguay	8
1.3. Principales patógenos de importancia apícola	10
1.3.1. <i>Ácaros</i>	10
1.3.2. <i>P. larvae</i>	12
1.3.3. <i>Microsporidios</i>	13
1.3.4. <i>Virus</i>	15
1.4. Presencia y distribución de los principales patógenos en Uruguay.	18
1.4.1. <i>Ácaros</i>	18
1.4.2. <i>P. larvae</i>	18
1.4.3. <i>Microsporidios</i>	19
1.4.4. <i>Virus</i>	20
1.5. Inmunidad de las abejas	20
2. Hipótesis	23
3. Objetivo General	23
4. Objetivos específicos.....	23
5. Materiales y Métodos	24
5.1. Diseño del muestreo y obtención de muestras.	24
5.2. Detección y cuantificación de <i>V. destructor</i>	25
5.3. Determinación de la presencia y distribución de <i>N. ceranae</i> y <i>N. apis</i>	27
5.3.1. <i>Extracción del ADN genómico</i>	27
5.3.2. <i>Amplificación mediante PCR</i>	27
5.3.3. <i>Electroforesis en geles de agarosa</i>	28
5.4. Detección y cuantificación de esporas de <i>P. larvae</i>	28
5.4.1. <i>Detección de esporas</i>	28
5.4.2. <i>Extracción del ADN genómico</i>	29
5.4.3. <i>Identificación mediante PCR y genotipificación de los aislamientos de P. larvae</i>	29
5.5. Detección de <i>A. woodi</i>	30

5.5.1. Extracción de ADN	30
5.5.2. Detección de <i>A. woodi</i> por PCR	31
5.6. Determinación de la presencia y distribución de los virus ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV y SBV.	32
5.6.1. Extracción de ARN viral y obtención de ADN copia	32
5.6.2. Detección de virus por PCR en Tiempo Real (qPCR).....	33
5.6.3. Cuantificación de la carga viral	34
5.7. Análisis de la relación entre la presencia de diferentes patógenos y la expresión de genes de la inmunidad en abejas.....	35
5.7.1. Extracción de ARNm y obtención de ADNc	35
5.7.2. Análisis de genes involucrados en la inmunidad	36
5.7.3. Cuantificación de la expresión génica	37
5.8. Análisis estadísticos	39
6. Resultados	42
6.1. Colección de muestras.....	42
6.2. Determinación de los parámetros de la colmena.	42
6.3. Determinación de la prevalencia y distribución de <i>V. destructor</i>	45
6.4. Determinación de la prevalencia y distribución de <i>A. woodi</i>	48
6.5. Determinación de la presencia y distribución de <i>N. ceranae</i> y <i>N. apis</i>	49
6.6. Determinación de la presencia de los virus ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV y SBV, y cuantificación de la carga viral.....	52
6.7. Determinación de la presencia de esporas de <i>P. larvae</i> en miel.	57
6.8. Análisis de los patrones de co-infección de los diferentes patógenos y evaluación de su relación con el estatus sanitario de la colmena.....	59
6.9. Relación entre la presencia de diferentes patógenos y la expresión de genes de la inmunidad en abejas.	63
7. Discusión.....	66
8. Conclusiones.....	77
9. Perspectivas.....	78
10. Bibliografía.....	79
ANEXO I	99
ANEXO II	102
ANEXO III	107

1. Introducción

1.1. Importancia de las abejas melíferas

La abeja melífera (*Apis mellifera*) es el principal agente polinizador entre las plantas que no son polinizadas por la acción del viento, tanto en los cultivos comerciales como en la flora silvestre. Se ha reportado que 35 % de los cultivos comerciales para alimento (frutas, verduras, semillas oleaginosas, leguminosas y forrajes) dependen en algún grado de la polinización entomófila (Abrol, 2012; Klein *et al.*, 2007). La acción polinizadora de los insectos permite y mejora la obtención, el rendimiento y la calidad de semillas y frutos (Morse & Calderone, 2000). El impacto de *A. mellifera* en la economía mundial vinculado a su acción polinizadora ha sido estimado en 153.000 millones de euros (Gallai *et al.*, 2009).

Por otra parte, la utilización de las abejas para obtener miel como fuente de alimento es milenaria. Durante el año 2010, se produjeron a nivel mundial aproximadamente 1.54 millones de toneladas de miel (FAO, 2013). Si se toma como referencia el precio promedio de exportación de la miel uruguaya en ese año (U\$S 2838 /tonelada), se estima que el valor total de la producción fue de aproximadamente 437.000 millones de dólares.

En base a estos datos se observa la gran importancia que tienen las abejas melíferas a nivel ecológico y productivo.

1.2. Estado actual del sector apícola en el Uruguay

En Uruguay, la apicultura se centra principalmente en la producción de miel, de la cual casi el 90 % es exportada (OPYPA, 2009). Esta actividad no tradicional ha sufrido muchos cambios y altibajos desde el comienzo del presente siglo. Algunos de los desafíos más grandes que presenta el sector son la alta variabilidad climática, el aumento de hectáreas destinadas a monocultivos, lo que obliga a los productores a mover sus apiarios o a trabajar con una oferta polínica y nectarífera menos diversa, el

uso de herbicidas y fitosanitarios en los cultivos agrícolas, así como la presencia de diferentes patógenos (OPYPA, 2009; Uruguay XXI, 2011).

El sector apícola emplea en la actualidad a unas 4.000 personas de forma directa y unas 12.000 de forma indirecta. En el año 2011 se registraron 3.256 apicultores, los cuales manejan un total de 555.450 colmenas. Estos datos implican un descenso en el número de apicultores con respecto al 2009, fenómeno que se registra desde 2005 cuando había cerca de 5.000 (OPYPA, 2006). Por otro lado, el número de colmenas manejadas presenta una tendencia hacia el aumento (en 2005 había 410.000) (OPYPA, 2009; 2006; 2005; Uruguay XXI, 2011).

En cuanto a las ganancias generadas, el sector ha mostrado un importante crecimiento, exportándose 14.180 toneladas de miel durante el 2011 por un total récord de 42 millones de dólares (MGAP, 2012). Sin embargo, no es posible hablar de una clara tendencia ascendente en lo que se refiere a volúmenes de producción, ya que en el período 2002-2011 se registraron importantes oscilaciones (Tabla 1).

Tabla 1- Evolución de la producción de miel en Uruguay, así como el valor de su comercialización (tabla elaborada en base a los Anuarios estadísticos agropecuarios 2010 y 2012 del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP).

Año	Total toneladas	Precio (US\$/tonelada)	Total miles de dólares
2002	5909	1550	9161
2003	6051	2580	15612
2004	12437	2166	26940
2005	8953	1233	11042
2006	12757	1440	18366
2007	14088	1560	21984
2008	10096	2798	28248
2009	6484	2712	17586
2010	8350	2830	23632
2011	14180	2985	42322

1.3. Principales patógenos de importancia apícola

De acuerdo a lo expresado previamente, las abejas, en especial *A. mellifera*, son de gran valor para la humanidad, tanto por los productos generados por las mismas como por su importante función como agente polinizador (Delaplane & Mayer, 1999; vanEngelsdorp *et al.*, 2010)

En los últimos años se ha constatado un declive en la población de abejas melíferas, especialmente en EEUU (61% de colmenas menos entre 1947 y 2005, vanEngelsdorp & Meixner, 2010) y Europa (25% de colmenas menos en Europa central entre 1985 y 2005, Potts *et al.*, 2010). Por estos motivos, existe una creciente preocupación por el estado sanitario de las abejas alrededor del mundo (Oldroyd, 2007; vanEngelsdorp & Meixner, 2010). Es importante mencionar que en Latinoamérica no se han reportado pérdidas masivas de colmenas con la sintomatología y/o la gravedad observada en EEUU y Europa (Vandame & Palacios, 2010).

Entre las posibles causas de la pérdida de colmenas se encuentra la presencia de diferentes patógenos, entre ellos los ácaros *Varroa destructor* y *Acarapis woodi*, la bacteria *Paenibacillus larvae*, diversos virus como el virus de la parálisis aguda (ABPV), el virus de la celda real negra (BQCV), el de la parálisis crónica (CBPV), el de las alas deformadas (DWV), el de la parálisis aguda israelí (IAPV), el Kashmir (KBV) y el de la cría ensacada (SBV) y los microsporidios *Nosema apis* y *Nosema ceranae*.

1.3.1. Ácaros

Los ácaros se encuentran entre los patógenos de mayor relevancia en la apicultura, siendo *V. destructor* (Anderson & Trueman, 2000) y *A. woodi* (Rennie, 1921) los que causan mayores pérdidas.

1.3.1.1. *V. destructor*

V. destructor es un ácaro parásito de aparición relativamente reciente en *A. mellifera* siendo la abeja asiática *Apis cerana* su hospedador original (Boecking & Genersch, 2008; Rosenkranz *et al.*, 2010). El primer reporte de *V. destructor* en abejas europeas fue en la década del cincuenta y actualmente el ácaro se encuentra distribuido a nivel mundial, siendo Australia el único lugar donde no se ha detectado (Rosenkranz *et al.*,

2010). Este ácaro presenta una mayor patogenicidad en *A. mellifera* que en su hospedador original *A. cerana*. En la abeja asiática, *V. destructor* se reproduce solo en las larvas de los zánganos los cuales son producidos de forma intermitente (Rath, 1999), mientras que en la abeja europea, se reproduce todo el año en larvas de zángano y de obrera (Martin, 2001).

La varroosis es la enfermedad más severa que afecta a las abejas hoy en día; en general las colmenas no tratadas con acaricidas mueren, originando grandes pérdidas económicas. Esto ha ocasionado un aumento en las pérdidas invernales de colmenas (Dainat *et al.*, 2012; van Dooremalen *et al.*, 2012).

El ciclo de vida de *V. destructor* posee una fase forética, sobre las abejas adultas, y una fase reproductiva, dentro de las celdas de las larvas (Fig. 1). El ácaro succiona la hemolinfa de las larvas que parasita, provocando el nacimiento de obreras y zánganos con alas deformadas y bajo peso, o incluso, causando la muerte prematura (Shimanuki *et al.*, 1994; van Dooremalen *et al.*, 2012).

Por otro lado, se ha demostrado que este ácaro es capaz de deprimir la respuesta inmune de las abejas facilitando la entrada de diferentes patógenos (Shen *et al.*, 2005; Yang & Cox-Foster, 2005), y actuando como transmisor de virus, entre ellos KBV, SBV, ABPV, IAPV y DWV (Bakonyi *et al.*, 2002; Boecking & Genersch, 2008; Chen *et al.*, 2004a; Yue & Genersch, 2005).

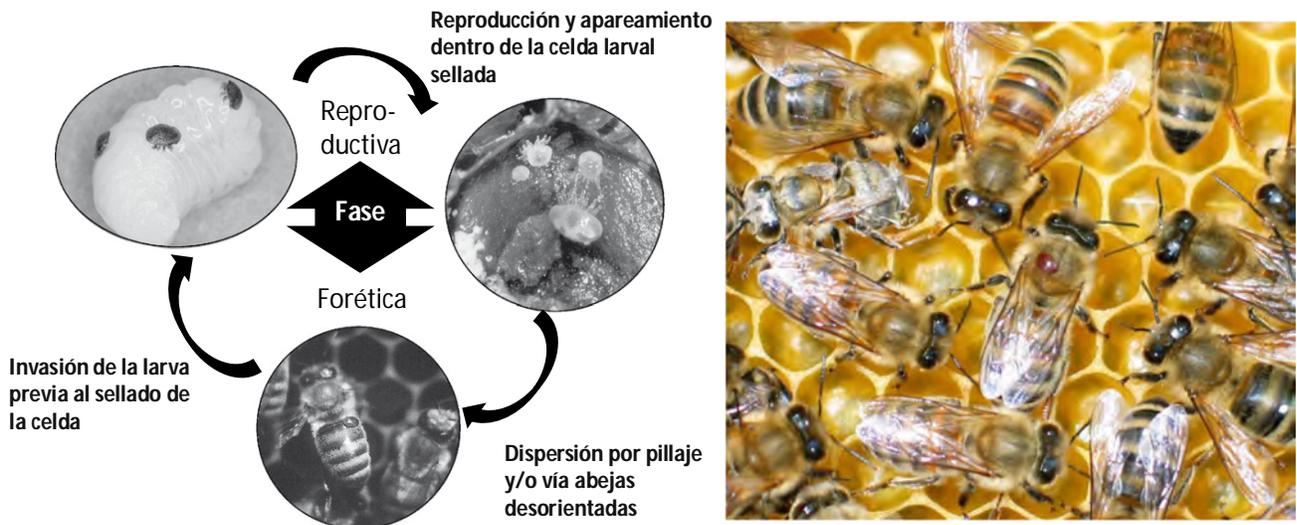


Figura 1- Ciclo de vida resumido de *V. destructor* (izquierda). A la derecha se observa en el centro una abeja con una varroa adulta forética infestando el tórax de una abeja.

1.3.1.2. *A. woodi*

A. woodi es un ácaro que vive en las tráqueas y sacos de aire de las abejas adultas y se alimenta de la hemolinfa de su hospedador. La dificultad para su detección a simple vista, sumado a que no produce síntomas específicos, complica la identificación de este patógeno por el apicultor (Sammatro *et al.*, 2000). Una infestación severa de *A. woodi* puede provocar reducción de la población adulta y de la producción de miel, entre otros efectos. La infestación tiende a aumentar durante el invierno cuando las abejas están confinadas en la colmena. Un estudio reciente realizado por Cox-Foster *et al.* (2007) utilizando métodos moleculares, reportó una prevalencia del 24% en EEUU.

1.3.2. *P. larvae*

Paenibacillus larvae es un bacilo Gram positivo, agente causal de la Loque Americana (LA) (Genersch *et al.*, 2006), la enfermedad bacteriana de mayor severidad que afecta a las abejas (Genersch, 2010). La LA ocasiona la muerte de las larvas y puede provocar la muerte de la colmena si no se realiza tratamiento alguno (Hansen & Brødsgaard, 1999). El síntoma característico de la enfermedad es la degradación de las larvas, las que se transforman en una sustancia viscosa ("*rope*") primero y en escama ("*scale*") más tarde (Hansen & Brødsgaard, 1999) (Fig. 2).

P. larvae es un bacilo formador de esporas, las cuales son muy resistentes al calor, a los agentes químicos y a la desecación, pudiendo conservar su capacidad para germinar durante muchos años, lo que dificulta su eliminación (Dobbelaere *et al.*, 2001; Hansen & Brødsgaard, 1999). Esta enfermedad afecta a las larvas de las abejas, especialmente entre las 12 y 36 hs. de vida (Brødsgaard *et al.*, 1998; Crailsheim & Riessberger-Gallé, 2001; Woodrow, 1942). Las mismas se infectan al ingerir alimento contaminado con esporas de *P. larvae*, que constituyen la forma infecciosa. Las esporas germinan en el intestino larval y las células vegetativas se multiplican de forma masiva en este órgano. Esta proliferación se daría antes de romper y atravesar la membrana peritrófica del intestino hacia el hemocele (Yue *et al.*, 2008). La mayoría de las larvas muere a los 9 días de vida, una vez que las mismas han sido selladas en la celda y se preparan para pupar (Bailey & Lee, 1962).

Las abejas adultas no se infectan al ingerir esporas, pero las mismas permanecen en el tracto digestivo. De esta forma, cuando las abejas nodrizas alimentan a las larvas propagan las esporas dentro de la colonia (Reissberg-Gallé *et al.*, 2001).

P. larvae se caracteriza por secretar varias proteínas, incluyendo proteasas, durante la infección (Antúnez *et al.*, 2009; 2010; 2011a; 2011b; Dancer & Chantawannakul, 1997; Holst, 1946; Holst & Sturtevant, 1940). Se piensa que estas proteasas estarían involucradas tanto en la ruptura de la membrana peritrófica como en la degradación de la larva.



Figura 2- Imágenes de los síntomas de Loque Americana (LA) en las colmenas. A la izquierda se observa la presencia de escamas de LA dentro de las celdas, se las distinguen por ser las que reflejan la luz. A la derecha se puede apreciar la “sustancia viscosa”, caracterizada por adoptar esa forma cuando se le realiza la prueba del palillo (Hansen & BroØdsgaard, 1999). Imágenes tomadas de DEFRA, 2007

1.3.3. Microsporidios

Los microsporidios son hongos unicelulares, parásitos intracelulares obligados. La vida fuera de la célula hospedera ocurre en forma de esporas (estructura de resistencia).

Los microsporidios se destacan por la presencia de un tubo polar, estructura que les permite invadir e infectar las células hospederas (Texier *et al.*, 2010).

Nosema apis (Zander, 1909) y *Nosema ceranae* (Fries *et al.*, 1996) son los dos microsporidios que causan nosemosis en *A. mellifera* (Fries, 2010) (Fig. 3).

N. apis es un parásito cuya presencia en las abejas europeas (*A. mellifera*) es conocida desde principios del siglo XX y es uno de los primeros microsporidios en ser descritos (Klee *et al.*, 2007). Por otro lado, *N. ceranae* fue descubierto en 1995 asociado a la abeja asiática *A. ceranae* (Fries *et al.*, 1996). Aunque los experimentos realizados por Fries & Feng (1997) demostraron que *N. ceranae* era capaz de infectar a *A. mellifera*, no fue hasta el año 2005 cuando se reportaron infecciones naturales de *N. ceranae* en abejas europeas en España (Higes *et al.*, 2006) y Taiwán (Huang *et al.*, 2007). Hoy en día, *N. ceranae* se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial entre las abejas europeas (Giersch *et al.*, 2009; Klee *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2007). Cabe mencionar que estudios recientes señalan que la aparición de *N. ceranae* en *Apis mellifera* habría ocurrido en la década de los 90 (Chen *et al.*, 2008; Invernizzi *et al.*, 2009; Klee *et al.*, 2007).

N. apis y *N. ceranae* infectan a las abejas a través de la ingestión de esporas maduras, las cuales germinan al llegar al intestino medio, e infectan y se reproducen dentro de las células del ventrículo (Fries, 2010, Higes *et al.*, 2010a). Ambas especies de *Nosema* dañan el epitelio ventricular de las abejas afectando las funciones digestivas, lo que conduce a la desnutrición, envejecimiento fisiológico y reducción de la longevidad de las mismas (Higes *et al.*, 2010a).

N. ceranae ha sido señalado como el responsable de los episodios de pérdida masiva de colmenas registrados en España a partir del año 2006 (Higes *et al.*, 2009; 2008; Martín-Hernández *et al.*, 2007), presentando una mayor virulencia que *N. apis* (Higes *et al.*, 2007; 2010b Martín-Hernández *et al.*, 2009). Este es un punto polémico, ya que existen estudios en los cuales no se observan diferencias en cuanto a la virulencia a nivel de abejas individuales (Fries, 2010; Forsgren & Fries, 2010; Paxton, 2010). Asimismo en otros países no se ha podido relacionar la presencia de *N. ceranae* con episodios de despoblación masiva (Chen *et al.*, 2008; Cox-Foster *et al.*, 2007; Gisder *et al.*, 2010).

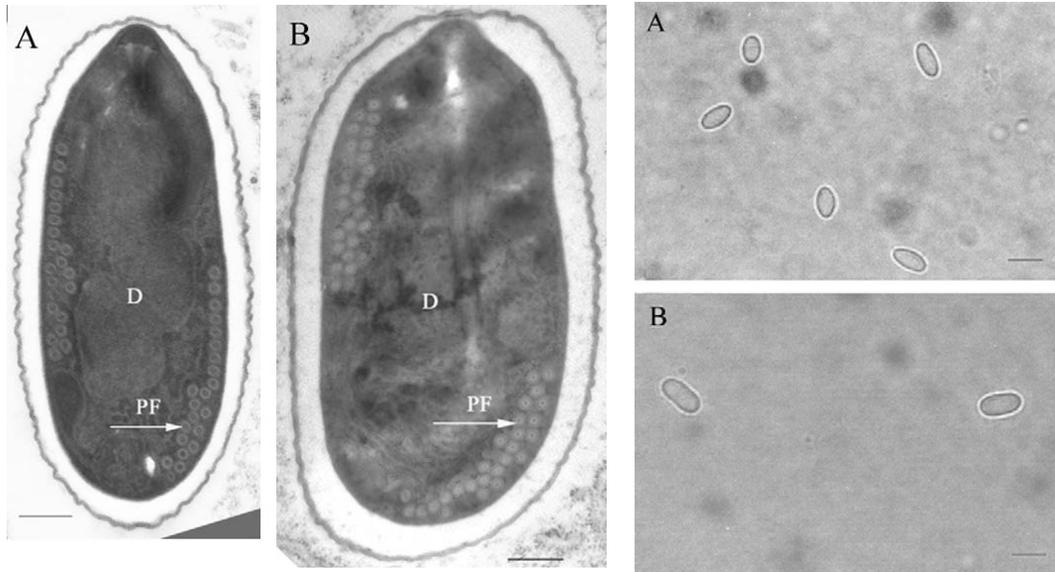


Figura 3- Estructura y morfología de las esporas de *N. apis* y *N. ceranae*. Imágenes tomadas por microscopía de transmisión electrónica (izquierda) y por microscopía de luz (derecha) en la que se pueden observar las diferencias de morfología entre las esporas de *N. ceranae* (A) y *N. apis* (B). Las imágenes tomadas por microscopía de transmisión permiten observar claramente las diferencias entre las esporas, por un lado la forma pero también en el número de vueltas que da el filamento polar en cada espora (señalado PF). La microscopía de luz también permite diferenciar entre esporas de *N. apis* y *N. ceranae*, sin embargo es necesario mucho entrenamiento y en caso de infecciones mixtas es extremadamente difícil. Imágenes tomadas de Fries (2010).

1.3.4. Virus

Se han descrito más de 18 virus ARN que infectan las abejas melíferas (Allen & Ball, 1996). Todos ellos pertenecen a la superfamilia de virus tipo picorna, poseen un genoma simple hebra positiva y están libres de envuelta lipídica (Chen & Siede, 2007). En la actualidad sólo siete virus son considerados de relevancia sanitaria para la apicultura: el virus de la parálisis aguda (ABPV), el virus de las celdas reales negras (BQCV), el virus de la parálisis crónica (CBPV), el virus de las alas deformadas (DWV), el virus israelí de la parálisis aguda (IAPV), el virus kashmir (KBV) y el virus de la cría ensacada (SBV) (Chen & Siede, 2007; vanEngelsdorp & Meixner, 2010). Los virus ABPV, BQCV, KBV e IAPV han sido asignados a la familia Dicistroviridae (Baker & Schroeder, 2008; de Miranda *et al.*, 2010,) mientras que SBV y DWV han sido clasificados como pertenecientes al género *Iflavirus* (Baker & Schroeder, 2008; de Miranda & Genersch,

2010). El virus CBPV no ha sido asignado aún a alguna familia o género (Ribière *et al.*, 2010). La mayoría de estos virus persisten en las abejas como infecciones “no aparentes” (Anderson & Gibbs, 1988), solamente los virus CBPV, SBV y DWV pueden llegar a producir síntomas clínicos que podrían ser identificados por los apicultores (Fig. 4). Incluso los virus que producen síntomas pueden causar infecciones persistentes en colmenas aparentemente sanas (Chen & Siede, 2007; de Miranda & Genersch, 2010; Ribière *et al.*, 2010). Bajo ciertos estímulos la replicación de los virus puede ser activada y/o estimulada, causando infecciones agudas y frecuentemente fatales (Ribière *et al.*, 2010). Esta es una de las razones por las cuales los virus han sido vinculados con las pérdidas de colmenas masivas registradas en EEUU y Europa (vanEngelsdorp & Meixner, 2010).

Los virus pueden transmitirse de manera horizontal, vertical o ambas; la transmisión horizontal ocurre entre individuos de la misma colmena a través de la comida o el aire, tal es el caso de ABPV, BQCV, CBPV, DWV, KBV, SBV (Chen *et al.*, 2006a; Chen & Siede, 2007; Shen *et al.*, 2005; Ribière *et al.*, 2007). La transmisión vertical se da desde la línea maternal hacia la cría a través de la superficie de los huevos, o dentro de los mismos. Esta vía se ha propuesto para los virus BQCV, CBPV, DWV, KBV y SBV (Chen *et al.*, 2006b; Shen *et al.*, 2005; Yue *et al.*, 2007).

Es importante recalcar la asociación entre el  caro *V. destructor* y los diferentes virus. Chantawannakul *et al.* (2006) reportaron la presencia de los virus ABPV, y BQCV, DWV, KBV y SBV en ácaros, pudiendo infectar larvas y abejas adultas cuando se alimentan de la hemolinfa de las mismas. Asimismo se ha visto que la presencia del ácaro puede aumentar la prevalencia de los virus (Martin *et al.*, 2012) así como complicar los cuadros virales (Yang & Cox-Foster, 2005; 2007)

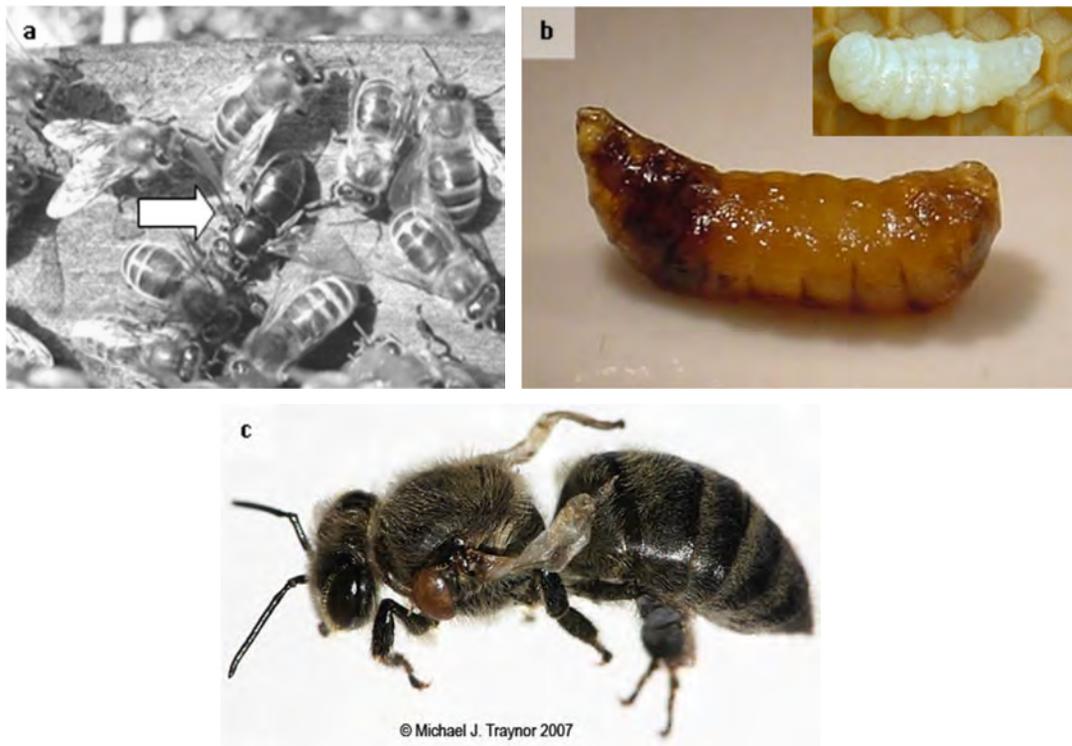


Figura 4- Sintomatología observable de los virus CBPV (a), SBV (b) y DWV (c). En la imagen de la abeja infectada con el virus CBPV, esta abeja ha perdido los pelos por lo cual tiene una apariencia negra y brillante. La larva infectada por SBV presenta los síntomas clásicos: color amarillo pálido, la piel presenta un aspecto y consistencia coriácea y la acumulación de líquido entre el cuerpo de la larva enferma y su piel en forma de saco (la imagen pequeña muestra una larva sana). Finalmente se observa una abeja adulta con alas deformadas producto de la infección con DWV, uno de los ácaros que parasitó a la pupa todavía se encuentra aferrado a la abeja. Imágenes e información tomada de Chen & Siede, 2007; de Miranda & Genersch, 2010; Ribière *et al.*, 2010; http://vbitbws.tcc.edu/~artj13/project_1/lifecycle.html.

1.4. Presencia y distribución de los principales patógenos en Uruguay.

En nuestro país se encuentran presentes los patógenos de mayor importancia apícola, con la excepción de los virus KBV e IAPV (Antúnez *et al.*, 2004; 2005; 2006; Bounous & Boga, 2005; Invernizzi *et al.*, 2009; 2011a; Piccini & Zunino, 2001).

1.4.1. Ácaros

V. destructor constituye en la actualidad el mayor problema sanitario para los apicultores de nuestro país. Se estima que la zona más afectada por este patógeno es el litoral oeste, donde hay mayor concentración de colonias, aunque su presencia está extendida a todos los departamentos. Por otro lado, dada la dificultad en la detección de *A. woodi* no existe información actualizada de su distribución y prevalencia en Uruguay (J. Harriet & J. Campá, comunicación personal).

1.4.2. *P. larvae*

En cuanto a *P. larvae*, la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) informó por primera vez en 1999 acerca de la detección de esporas de esta bacteria en muestras de mieles uruguayas de exportación (OIE, 1999). En el año 2000, Piccini y Zunino aislaron este bacilo a partir de larvas con síntomas clínicos de Loque Americana y de abejas adultas de apiarios que no presentaban estos síntomas (Piccini & Zunino, 2001). En el año 2001 y 2002 en el Departamento de Microbiología del IIBCE se realizó un relevamiento de la presencia de esporas de esta bacteria en mieles de todo el país. Se encontró una prevalencia de 51% y se pudo observar que *P. larvae* se encontraba ampliamente distribuido, siendo la zona más afectada el litoral oeste, especialmente los departamentos de Soriano y Colonia, coincidiendo con las zonas de mayor concentración de colmenas (Fig. 5) (Antúnez *et al.*, 2004). Posteriormente, un estudio epidemiológico demostró la existencia de dos genotipos de *P. larvae* circulantes en nuestro país, el genotipo ERIC I-BOX A de distribución mundial y el genotipo ERIC I-BOX C encontrado sólo en Argentina (Antúnez *et al.*, 2007).

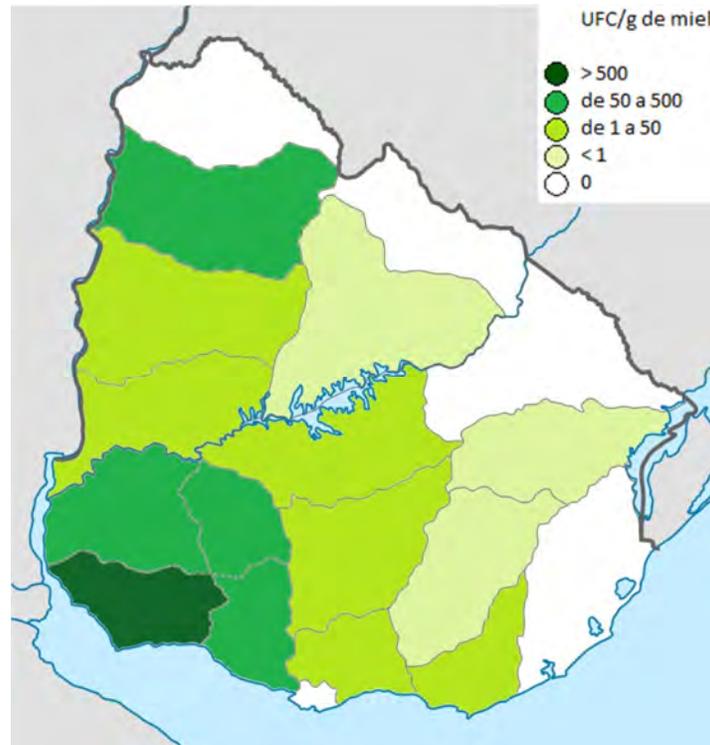


Figura 5- Distribución del número de esporas de *P. larvae* por gramo de miel en Uruguay durante el año 2001, mapa tomado y modificado de Antúnez *et al.* (2004).

1.4.3. Microsporidios

La nosemosis es una enfermedad conocida en nuestro país desde hace muchos años, pero dado que la técnica empleada para su detección se basaba en la búsqueda de esporas, se asumía que se trataba de *N. apis*. Estudios recientes aplicando técnicas moleculares indicaron que *N. ceranae* habría reemplazado a *N. apis* como principal agente causal de nosemosis en Uruguay (Invernizzi *et al.*, 2009; 2011a; 2011b; Mendoza *et al.*, 2013). Esto es sumamente interesante ya que en nuestro país no parecería tener la misma patogenicidad que la observada en otros países (Higes *et al.*, 2010a). Sin embargo, se ha observado que las colmenas que se trasladan a las forestaciones de *Eucalyptus grandis* durante el periodo de floración entre febrero y mayo se infectan con *N. ceranae* (Invernizzi *et al.*, 2011a; 2011b; Mendoza *et al.*, 2012). A su vez se ha reportado que las colmenas que no se retiran de las forestaciones luego de finalizada la floración es muy probable que mueran debido a los elevados

niveles de infección con *N. ceranae* (Invernizzi *et al.*, 2011b; Mendoza, 2012; Mendoza *et al.*, 2013).

1.4.4. Virus

En trabajos previos se detectó la presencia los virus ABPV, BQCV, CBPV, DWV y SBV en muestras de abejas de diferentes zonas geográficas de nuestro país, lo que constituyó la primera detección en Uruguay y Sudamérica (Antúnez *et al.*, 2006; 2005). Estos estudios mostraron que más del 90 % de las muestras analizadas se encontraban infectadas con al menos un virus, encontrándose también un alto nivel de co-infección con diferentes virus.

1.5. Inmunidad de las abejas

Las abejas melíferas son insectos eusociales, cuya vida en comunidad le ha permitido mejorar el *fitness* en cuanto a la eficiencia de forrajeo, el cuidado de la cría, la defensa contra los enemigos y la habilidad de adaptar y modificar el ambiente (Wilson-Rich *et al.*, 2009). Sin embargo, la vida en comunidad también presenta grandes desafíos, especialmente la defensa contra patógenos y el riesgo de transmisión entre individuos (Wilson-Rich *et al.*, 2009), Esto es particularmente importante en el caso de abejas, ya que una colmena puede albergar hasta decenas de miles de individuos, los cuales presentan un alto grado de similitud genética y se encuentran en un ambiente relativamente homeostático (Wilson-Rich *et al.*, 2009; Evans *et al.*, 2006). Paradójicamente, estudios comparativos con la mosca *Drosophila melanogaster* y el mosquito *Anopheles gambiae* han mostrado que *A. mellifera* posee menor cantidad de genes relacionados a la inmunidad innata y a enzimas de detoxificación (Evans *et al.*, 2006; Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006). Una forma de compensar esta reducción a nivel individual de las defensas es el desarrollo de una inmunidad social o colonial (Evans & Spivak, 2010; Wilson-Rich *et al.*, 2009). La inmunidad social surge de interacciones comportamentales entre individuos de una misma colmena,

como el aseo, el comportamiento higiénico y el comportamiento necroforético, entre otros (Evans & Spivak, 2010; Wilson-Rich *et al.*, 2009).

Además de la inmunidad social, la primera línea de defensa de las abejas a nivel individual frente a patógenos son las defensas mecánicas, como ser las barreras epiteliales (cutícula, tráquea e intestino). En los casos en que los patógenos logren franquear estas defensas, se activa el sistema inmune innato (los insectos carecen de sistema inmune adaptativo). La respuesta inmune innata involucra respuestas humorales y celulares. Las respuestas humorales se basan principalmente en la secreción a la hemolinfa de péptidos antimicrobianos producidos por el cuerpo graso (Glinski & Jaroz, 2001; Hoffmann, 2003). En las abejas se han identificado al menos cuatro de estos péptidos: apidecinas (Casteels *et al.*, 1989), abaecinas (Casteels *et al.*, 1990), himenoptecinas (Casteels *et al.*, 1993) y defensinas (Casteels-Jonsson *et al.*, 1994).

Por otro lado, las respuestas celulares están mediadas por los hemocitos, granulocitos y plasmotocitos, que cumplen las tareas de fagocitosis, encapsulación, nodulación y melanización de microorganismos y cuerpos extraños (Cristophides *et al.*, 2002; Govind, 2008; Wilson-Rich *et al.*, 2009).

La melanización es un proceso que está involucrado en la cicatrización de heridas y en el secuestro de agentes invasores (Osta *et al.*, 2004). La misma requiere la activación del zimógeno (profenol-) fenoloxidasa (PPO) en la enzima fenoloxidasa (PO) (Ashida & Brey, 1998; Osta *et al.*, 2004). La PO cataliza la generación de sustancias tóxicas para los microorganismos, favoreciendo su neutralización, así como también participa en la formación de melanina. Esta proteína se adhiere a los cuerpos extraños y los aísla de la hemolinfa (Wilson-Rich *et al.*, 2009). La glucosa deshidrogenasa (GLD) está involucrada en la eliminación de patógenos junto con la PO durante la encapsulación a través de la generación de radicales libres (Yang & Cox-Foster, 2007). La GLD puede ser utilizada también como un marcador de la activación de las respuestas celulares (Lovallo & Cox-Foster, 1999).

Otra enzima importante en la inmunidad de las abejas es la lisozima (LYZ) (Daffre *et al.*, 1994; Lavine & Strand, 2001), por su actividad frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, y su relación con la promoción de la expresión de péptidos antimicrobianos (Imler & Bulet, 2005).

Por último, la vitelogenina (Vg) es una proteína muy importante en la regulación de la respuesta inmune innata, la cual es específica de las hembras. Esta proteína se sintetiza en el cuerpo graso, se libera a la hemolinfa y posteriormente es transportada a los ovarios y otros tejidos (Amdam *et al.*, 2003). Además de su función reguladora en la respuesta inmune, tiene un rol central en la regulación del ciclo vital de este insecto social, estando involucrada en el inicio del forrajeo, la especialización en el forrajeo y la resistencia al estrés oxidativo (Amdam *et al.*, 2004; 2005; Nelson *et al.*, 2007).

Se ha visto que patógenos como *V. destructor* y *N. ceranae* son capaces de suprimir el sistema inmune de las abejas que infectan (Antúnez *et al.*, 2009b; Chaimanee *et al.*, 2012; Yang & Cox-Foster, 2005), así como interferir con la expresión de la Vg (Antúnez *et al.*, 2013a; Dainat *et al.*, 2012). El debilitamiento de las defensas de las abejas por estos patógenos, las deja expuestas a infecciones secundarias y puede activar la replicación viral, lo que constituye un severo riesgo para la salud de las abejas.

2. Hipótesis

La hipótesis de este trabajo postula que los principales patógenos de las abejas se encuentran presentes en las colmenas de nuestro país, pudiendo en algunos casos encontrarse asociados dando lugar a patrones de co-infección y afectando la respuesta inmune.

3. Objetivo General

Estudiar la prevalencia y distribución de los principales patógenos apícolas en Uruguay a partir de muestras recolectadas representativamente en todo el país. Así como evaluar el efecto de los patógenos presentes, en el sistema inmune de las abejas.

4. Objetivos específicos

4.1. Obtener muestras de abejas pecoreadoras, abejas nodrizas y miel de todos los departamentos de Uruguay.

4.2. Determinar la presencia y distribución en Uruguay de los ácaros *V. destructor* y *A. woodi*.

4.3. Determinar la presencia y distribución en Uruguay de los virus ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV y SBV.

4.4. Determinar la presencia y distribución en Uruguay de *N. ceranae* y *N. apis*.

4.5. Determinar la presencia y distribución de la bacteria *P. larvae*.

4.6. Analizar los patrones de co-infección de los diferentes patógenos, la distribución geográfica de los mismos y evaluar su relación con el estatus sanitario de la colmena.

4.7. Estudiar la relación entre la presencia de diferentes patógenos y el estado inmunitario de la abejas.

5. Materiales y Métodos

5.1. Diseño del muestreo y obtención de muestras.

Se llevó a cabo un muestreo representativo de los apiarios de todo el país, que incluyó 103 apiarios de diferentes regiones. El número de apiarios seleccionados por departamento se basó en la densidad de colmena por departamento, según datos del Registro Nacional de Propietarios de Colmenas correspondientes a septiembre de 2010 (Dirección General de la Granja - Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca; DIGEGRA-MGAP). De esta forma, se seleccionaron 2 apiarios de Artigas, 4 de Canelones, 1 de Cerro Largo, 13 de Colonia, 4 de Durazno, 5 de Flores, 6 de Florida, 1 de Lavalleja, 1 de Maldonado, 1 de Montevideo, 11 de Paysandú, 11 de Río Negro, 9 de Rivera, 1 de Rocha, 2 de Salto, 7 de San José, 19 de Soriano, 2 de Tacuarembó y 1 de Treinta y Tres (Tabla 2).

Los apiarios se seleccionaron al azar dentro de cada departamento, y se obtuvo el consentimiento de los apicultores para participar de este muestreo. Los apiarios seleccionados cumplían los siguientes requisitos: estar inscriptos en el Registro Nacional de Propietarios de Colmenas (DIGEGRA - MGAP) y no practicar trashumancia. El muestreo se realizó en marzo de 2011, en un período de 30 días con el fin de evitar la variación estacional. Éste fue llevado a cabo por técnicos de la Sección Apicultura de la Dirección de Laboratorios Veterinarios - MGAP (DILAVE - MGAP), especialistas en el manejo de colmenas y toma de muestras.

En cada apiario visitado se seleccionó una colmena al azar, a partir de la cual se obtuvo una muestra de 150 abejas nodrizas (tomadas de al menos 3 puntos diferentes de la colmena y cerca del nido de cría), 60 abejas pecoreadoras y una muestra de miel. Se consideraron pecoreadoras las abejas del interior, tomadas de la periferia, lejos del nido de cría (Fries *et al.*, 2013). La muestra ideal de abejas pecoreadoras es la que se obtiene de la entrada de la colmena, este método es laborioso y requiere que las condiciones para el vuelo y el forrajeo de las abejas sean las adecuadas (Fries *et al.*, 2013). Se priorizó reducir el tiempo de muestreo para disminuir la variación estacional,

para lo cual se visitaron varios apiarios por día independientemente de si las condiciones vuelo y forrajeo eran las adecuadas. Por esto se optó por tomar muestras de abejas del interior con las características antes mencionadas. Las abejas nodrizas y pecoreadoras se colocaron por separado en recipientes plásticos con alcohol para evitar su descomposición y permitir su almacenamiento hasta el momento del análisis. Una sub-muestra de las abejas nodrizas (alrededor de 50 abejas) se colocaron en bolsas de papel y se mantuvieron vivas hasta llegar al laboratorio donde se almacenaron a -80°C, con el fin de evitar la degradación del ARN viral.

A su vez, en cada apiario se estimaron diferentes parámetros de la colmena (población de abejas adultas, cantidad de cría, cantidad de miel y polen, y si presentaban síntomas de enfermedad) con el fin de determinar su fortaleza y estado sanitario al momento de la toma de la muestra. Se incluyó otra información de relevancia, como densidad de colmenas en el apiario muestreado, georreferenciación, tipo de vegetación del ambiente así como fecha y tipo de tratamiento contra *V. destructor*.

5.2. Detección y cuantificación de *V. destructor*.

Las muestras de abejas nodrizas conservadas en alcohol 70% se enviaron para su análisis a la Sección Apicultura del DILAVE - MGAP. Para realizar el análisis se tomaron aproximadamente 100 abejas y se sometieron a agitación en agua caliente para provocar el desprendimiento de los ácaros adheridos. Luego las abejas se separaron con un colador y la solución se filtró con un tamiz donde se recogieron los ácaros. El nivel de infestación se obtuvo del cociente entre el número de ácaros obtenidos y el número de abejas analizadas, multiplicado por cien (Dietemann *et al.*, 2013). Este método es el recomendado tanto por la OIE como por el "COLOSS BEEBOOK, Volume II: standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research" para el diagnóstico en campo (Dietemann *et al.*, 2013; OIE, 2012).

Tabla 2- Localización geográfica y número de las muestras utilizadas en este trabajo.

Muestra	Departamento	Lat Sur	Long W	Muestra	Departamento	Lat Sur	Long W
1	Artigas	30° 25' 57,5"	56° 29' 31,2"	52	Río Negro	32° 51' 30,0"	57° 27' 55,9"
67	Artigas	30° 32' 58,2"	57° 33' 04"	75	Río Negro	32° 50' 11,1"	57° 34' 31,6"
31	Canelones	34° 43' 47,68"	55° 47' 10,87"	91	Río Negro	33° 17' 50,2"	58° 16' 10,2"
36	Canelones	34° 36' 32,84"	55° 50' 55,60"	92	Río Negro	33° 16' 36,6"	58° 16' 04,3"
39	Canelones	34° 37' 19,39"	56° 01' 53,32"	99	Río Negro	33° 18' 39,7"	58° 16' 46,3"
42	Canelones	34° 42' 24,31"	55° 46' 32,29"	100	Río Negro	33° 10' 54"	58° 17' 58,0"
59	Canelones	34° 39' 41,34"	56° 03' 12,40"	101	Río Negro	33° 20' 31,1"	58° 17' 17,0"
70	Cerro Largo	32° 23' 36,47"	54° 13' 48,48"	102	Río Negro	33° 12' 03,6"	58° 17' 51,3"
80	Cerro Largo	32° 28' 51,52"	54° 04' 56,14"	103	Río Negro	33° 09' 50,1"	58° 19' 19,8"
17	Colonia	34° 16' 03,7"	57° 40' 22,4"	66	Río Negro	32° 49' 48,0"	57° 34' 49,1"
18	Colonia	34° 16' 49,0"	57° 34' 20,7"	94	Río Negro	33° 12' 16,2"	58° 16' 52,9"
26	Colonia	34° 17' 46,9"	57° 30' 43,4"	2	Rivera	31° 12' 10,3"	55° 45' 10,1"
27	Colonia	34° 18' 26,9"	57° 48' 25,2"	3	Rivera	31° 14' 13,8"	55° 41' 25,6"
30	Colonia	34° 13' 57,3"	57° 53' 10,0"	4	Rivera	31° 13' 23,4"	55° 45' 19,0"
33	Colonia	34° 15' 28,0"	57° 52' 44,7"	5	Rivera	31° 13' 42,9"	55° 45' 12,8"
34	Colonia	34° 17' 45,8"	37° 45' 41,7"	6	Rivera	31° 10' 05,7"	55° 39' 0,35"
35	Colonia	34° 12' 53,1"	57° 49' 12,4"	7	Rivera	31° 08' 54,6"	55° 39' 11,3"
38	Colonia	34° 12' 21,0"	57° 50' 20,0"	8	Rivera	30° 56' 44,7"	55° 32' 33,4"
49	Colonia	34° 20' 49,4"	57° 36' 30,5"	9	Rivera	31° 01' 17,7"	55° 30' 57,6"
58	Colonia	34° 17' 35,2"	57° 43' 13,6"	10	Rivera	31° 07' 13,9"	55° 25' 53,9"
43	Durazno	33° 22' 55,8"	56° 30' 47,5"	11	Rivera	31° 08' 07,5"	55° 24' 00,9"
60	Durazno	33° 20' 18,5"	56° 28' 37,9"	37	Rocha	34° 36' 7,03"	54° 08' 56,16"
61	Durazno	33° 19' 43,7"	56° 26' 02,2"	48	Rocha	34° 34' 14,01"	54° 7' 37,79"
63	Durazno	33° 21' 05,8"	56° 31' 30,7"	54	Salto	31° 21' 41,8"	57° 52' 31,4"
12	Flores	33° 32' 17,9"	56° 52' 19,6"	55	Salto	31° 20' 26,0"	57° 56' 35,3"
13	Flores	33° 33' 49,6"	56° 56' 58,8"	56	Salto	31° 21' 17,1"	57° 56' 17,5"
14	Flores	33° 31' 04,8"	56° 49' 34,5"	19	San José	34° 21' 42,2"	56° 43' 58,1"
15	Flores	33° 30' 09,8"	56° 56' 04,6"	20	San José	34° 18' 19,7"	56° 52' 17,8"
16	Flores	33° 32' 40,80"	56° 54' 40,80"	21	San José	34° 14' 0,27"	56° 58' 38,2"
24	Florida	33° 41' 30,9"	56° 10' 16,1"	23	San José	34° 07' 02,7"	56° 59' 16,4"
44	Florida	33° 43' 18,6"	56° 26' 12,7"	28	San José	34° 24' 33,2"	56° 33' 55,2"
45	Florida	33° 47' 10,3"	56° 13' 36,8"	29	San José	34° 22' 38,7"	56° 40' 38,0"
46	Florida	33° 44' 13,1"	56° 18' 41,3"	32	San José	34° 25' 44,3"	56° 52' 32,1"
47	Florida	33° 33' 29,8"	56° 22' 11,5"	53	San José	34° 28' 58,7"	56° 54' 10,2"
64	Florida	33° 51' 56,7"	56° 23' 07,2"	50	Soriano	33° 37' 29,0"	57° 40' 29,5"
41	Lavalleja	34° 24' 38,08"	55° 21' 37,85"	51	Soriano	33° 34' 59,3"	57° 40' 53,6"
40	Maldonado	34° 03' 58,17"	55° 08' 29,49"	62	Soriano	33° 44' 31,8"	57° 34' 15,4"
65	Montevideo	34° 48' 27,07"	56° 03' 55,86"	71	Soriano	33° 35' 40,4"	57° 44' 39,8"
57	Paysandú	-	-	72	Soriano	33° 21' 26,1"	58° 10' 21,5"
68	Paysandú	32° 21' 49,0"	57° 52' 10,2"	73	Soriano	33° 27' 04,4"	57° 47' 28,7"
69	Paysandú	32° 10' 07,3"	57° 58' 05,9"	74	Soriano	33° 29' 17,9"	58° 03' 23,4"
76	Paysandú	32° 07' 00,6"	58° 01' 40,4"	81	Soriano	33° 24' 22,6"	58° 14' 46,7"
77	Paysandú	32° 28' 51,52"	54° 04' 56,14"	82	Soriano	33° 23' 43,4"	58° 19' 16,7"
78	Paysandú	32° 06' 45,9"	58° 01' 20,6"	83	Soriano	33° 32' 20,7"	58° 14' 45,3"
79	Paysandú	32° 21' 43,3"	57° 55' 47,8"	84	Soriano	33° 31' 05,5"	58° 04' 20,5"
85	Paysandú	32° 17' 18,4"	58° 03' 08,1"	90	Soriano	33° 35' 23,1"	57° 45' 02,3"
86	Paysandú	31° 59' 04,1"	57° 49' 59,8"	93	Soriano	33° 21' 04,5"	58° 10' 43,9"
87	Paysandú	32° 21' 41,5"	57° 55' 52,2"	97	Soriano	33° 35' 31,1"	57° 45' 39,8"
88	Paysandú	31° 59' 43,2"	57° 50' 22,7"	120	Tacuarembó	31° 46' 02,3"	55° 58' 24,1"
89	Paysandú	31° 58' 48,5"	57° 50' 19,2"	121	Tacuarembó	31° 59' 18,1"	55° 56' 08,8"
96	Paysandú	32° 09' 54,4"	57° 58' 42,0"	95	Treinta y Tres	33° 08' 36,10"	54° 19' 03,82"
98	Paysandú	32° 09' 50,7"	57° 57' 57,5"				

5.3. Determinación de la presencia y distribución de *N. ceranae* y *N. apis*.

5.3.1. Extracción del ADN genómico

Se tomaron 20 abejas pecoreadoras de cada muestra y se las homogeneizó en 10 mL de agua destilada (H₂O_d) estéril durante 2 min a máxima velocidad en un homogeneizador *Stomacher 80 LabBlender* (Seward, London, UK). Los homogeneizados se colocaron cuidadosamente en tubos para minimizar la cantidad de restos de abeja. Luego se centrifugaron a 10.000 g durante 15 min a 20 °C para concentrar las esporas de *Nosema* spp., se descartó el sobrenadante y las esporas se resuspendieron en 400 µL de H₂O_d estéril. A partir de dicho material se realizó la extracción de ADN, para lo cual se emplearon dos kits comerciales: *Genomic DNA Purification kit* (Fermentas™) de acuerdo a las indicaciones del fabricante, y *Qiamp Viral RNA mini Kit* (Qiagen™). En este último procedimiento se realizaron modificaciones al protocolo del fabricante, se omitió la utilización del *RNA carrier* y la elución del ADN se realizó en H₂O_d estéril.

5.3.2. Amplificación mediante PCR

Se realizó la detección y diferenciación de especie entre *N. apis* y *N. ceranae* mediante PCR múltiple. La PCR amplifica de forma simultánea un fragmento del gen que codifica para el ARN 16S de *N. apis* (utilizando los *primers* NapisF y NapisR) y de *N. ceranae* (empleando los *primers* NcerF y NcerR). Tanto los *primers* como el protocolo de la reacción de PCR fueron diseñados por Martín-Hernández *et al.* (2007) y actualmente es la metodología recomendada a nivel internacional para la detección de estos microsporidios (Fries *et al.*, 2013). En la tabla 3 se muestra la secuencia de los *primers*, así como el tamaño predicho de los fragmentos amplificados.

La mezcla de reacción consistió en 0,4 mM de dNTPs, 3 mM MgCl₂, 0,4 µM de cada primer, 2 U de Taq ADN polimerasa, 1X buffer de la enzima, 5 µL de ADN y agua mQ estéril en un volumen final de 50 µL. Se empleó el kit de PCR de *Invitrogen*™. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador *ESCO Swift Mini*™. El programa de ciclado contó con una desnaturalización inicial de 2 min a 94 °C, seguido de 10 ciclos de 15 seg a 94 °C, 30 seg a 61.8°C y 45 seg a 72°C; 20 ciclos de 15 seg a

94°C, 30 seg a 61.8°C y 50 seg at 72°C con 5 seg adicionales en la elongación en cada ciclo sucesivo, y una extensión final durante 7 min a 72°C. En todas las corridas se incluyeron controles negativos, así como controles positivos para *N. apis* y *N. ceranae* (cedidos por el Dr. Mariano Higes del Centro Apícola Regional, Marchamalo, España).

5.3.3. Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2% en TBE (Tris 5.4 g, ácido bórico 2.75 g, EDTA 0.5 M PH 8 2 mL por litro de H₂O) a 120V durante 40 a 80 min (Sambrook *et al.*, 1989). Las bandas se visualizaron mediante tinción con Bromuro de etidio 0,5 µg/mL, se analizaron en un transiluminador de luz UV (Biometra T13) y se fotografiaron con una cámara Kodak (DC290). Para estimar el tamaño y cantidad de ADN presente en las bandas se utilizó el marcador de tamaño molecular *Gene Ruler* 1Kb (*Fermentas™*).

5.4. Detección y cuantificación de esporas de *P. larvae*.

5.4.1. Detección de esporas

La detección de esporas se realizó a partir de las muestras de miel. Se tomaron 20 mL de miel, se agregaron 20 mL de H₂O estéril y la mezcla se homogeneizó vigorosamente. Se centrifugó a 6.000g durante 45 min a temperatura ambiente con el fin de concentrar las esporas. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en un volumen final de 1mL de H₂O estéril. Se realizaron diluciones seriadas 1/10 y 1/100 en H₂O estéril, y tanto las diluciones como la muestra sin diluir se incubaron a 80 °C durante 20 min para activar las esporas de *P. larvae* y eliminar otras bacterias. Se sembraron 200 µL de cada dilución por triplicado en el medio semi selectivo J (0.5 g triptona, 1.5 g extracto de levadura, 0.2 g K₂H₂PO₄, 0.3 g glucosa, 1.8 g agar en 100 mL de H₂O) (Hornitzky & Nicholls, 1993) y se incubaron a 37 °C durante 4 días en condiciones de microaerofilia (Nordström & Fries, 1995). Las colonias obtenidas se analizaron mediante microscopía óptica y se realizó el ensayo bioquímico de catalasa. Se consideraron presuntos positivos las colonias que presentaron la morfología

característica de *P. larvae* y que resultaran catalasa negativos. En esos casos se realizó el recuento de las unidades formadoras de colonias. Posteriormente dichos aislamientos se conservaron a -20° C para confirmar su identidad mediante PCR.

5.4.2. Extracción del ADN genómico

A partir de los aislamientos presuntamente identificados como *P. larvae*, se inocularon 5 mL de caldo J y se incubaron a 37 °C hasta el día siguiente. Luego los cultivos se centrifugaron a 6000 g durante 10 min en una centrífuga *Thermo Sorvall RT1*, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 500 µL de H₂O estéril. La suspensión se calentó a 95 °C durante 15 min y se centrifugó a 8.000 g durante 5 min con el fin de conservar el sobrenadante. Este ADN genómico (ADNg) se utilizó para la amplificación de un fragmento de 700 pb del gen que codifica para el ARNr 16S de *P. larvae*, lo que permitió la identificación de los aislamientos. En los casos en que se confirmó la identidad, se realizó una nueva extracción de ADNg utilizando el kit comercial *GeneElute Bacterial Genomic DNA kit*, siguiendo las instrucciones del fabricante para bacterias gram +. Este nuevo ADNg se empleó para la genotipificación del aislamiento.

5.4.3. Identificación mediante PCR y genotipificación de los aislamientos de *P. larvae*

Se amplificó un fragmento específico de 700 pb del gen que codifica para el ARN 16S de *P. larvae* empleando los *primers* PL4 y PL5 (tabla 3) y las condiciones de reacción diseñadas por Piccini *et al.* (2002). La mezcla de reacción consistió en 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 0,4 µM de cada cebador, 1 U de Taq ADN polimerasa, 1X buffer de la enzima, 2 µL de ADN y agua mQ estéril en un volumen final de 25 µL. Se empleó el kit de PCR de *Invitrogen™*. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador *ESCO Swift Mini™*. El programa de ciclado contó con una desnaturalización inicial de 1 min a 95 °C, 30 ciclos de 1 min a 93 °C, 30 seg a 60 °C, 1 min a 72 °C y una extensión final durante 10 min a 72 °C.

Los aislamientos identificados como *P. larvae* por PCR, se tipificaron mediante la técnica de *rep*-PCR utilizada previamente por Antúnez *et al.*, (2007) para tipificar las cepas circulantes en el Uruguay durante el año 2002. Además, esta metodología es la recomendada por el "COLOSS BEEBOOK, Volume II: standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research" para la caracterización genética de esta bacteria (de Graaf *et al.*, 2013). Con este fin, se emplearon los *primers* ERIC (ERIC1R y ERIC2) y BOX (BOXA1R) (Versalovic *et al.*, 1994) (Tabla 3). La mezcla de reacción consistió en 0,2 mM de dNTPs, 5mM de MgCl₂, 3 μM de cada *primer* (en el caso de BOX se utilizó el doble ya que era uno sólo), 1 U de Taq ADN Polimerasa, 1X buffer de la enzima, 1 μL de ADN y agua mQ estéril en un volumen final de 25 μL. Se empleó el kit de PCR de *Invitrogen*[™]. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador *ESCO Swift Mini*[™]. El programa de ciclado contó con una desnaturalización inicial 5 min a 94 °C, 40 ciclos de: 1 min a 94 °C, 2 min a 40 °C, 8 min a 65 °C y una extensión final a 65°C durante 16 min. Se utilizaron como controles positivos, ADN de *P. larvae* previamente caracterizados y pertenecientes a diferentes genotipos (Antúnez *et al.*, 2007). También se incluyeron controles negativos, sin el agregado de ADN.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% en TBE de acuerdo a lo descrito e el punto 5.3.3.

5.5. Detección de *A. woodi*.

5.5.1. Extracción de ADN

Se ensayaron distintos métodos de extracción de ADNg de *A. woodi*, a partir de cortes de tórax de abejas infectadas con el ácaro. Dichas muestras fueron cedidas por el Dr. Matías Maggi del Laboratorio de Artrópodos de la Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP).

Por un lado se usó un protocolo de extracción de ADNg de artrópodos basado SDS/NaCl descrito por Margan *et al.* (2010). Para ello se tomaron entre 10 y 20 mg de tejido y se trituraron a temperatura ambiente. Luego se agregaron 400 μL de Buffer de extracción de ADN (1% SDS, 0,5 M NaCl); la solución se preparó en el momento a partir

de soluciones stock: SDS 10% (p/v) y NaCl 5 M, y se homogeneizó vigorosamente durante 20 seg. Se centrifugó a 11.500 g durante 1 min a temperatura ambiente en una centrifuga *microSpin Eppendorf™*, el sobrenadante se transfirió a un tubo *eppendorf* nuevo y se agregaron 400 µL de isopropanol. Se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó nuevamente a 11.500 g durante 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y se lavó el *pellet* de ADN con 500 µL de etanol 70% (v/v). Se descartó el etanol y se procuró remover el alcohol restante mediante secado. El ADN se disolvió en 100 µL de agua mQ estéril y se conservó a -20 °C hasta su uso. Con el fin de ensayar otra metodología, se utilizó el kit comercial *QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen™)*, (el kit co-purifica ADNg y ARN total). Se realizaron dos modificaciones al protocolo de los fabricantes: la omisión del uso del *RNA carrier* y la elución del ADN en H₂Od estéril.

5.5.2. Detección de *A. woodi* por PCR

Se utilizaron los *primers* diseñados por Kojima *et al.* (2011) para amplificar de forma específica un fragmento de 220 pb del gen que codifica para la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI) de *A. woodi* (tabla 3). La mezcla de reacción consistió en 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 0,4 µM de cada cebador, 1 U de Taq ADN polimerasa, 1X buffer de la enzima 2,5 µL de ADN y agua mQ estéril en un volumen final de 25 µL. Se empleó el kit de PCR de *Invitrogen™*. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador *Multigene Optimax (Labnet™)*. La PCR se realizó con gradiente de temperatura con el fin de ensayar distintas temperaturas de *annealing*, se probaron 50 °C, 52 °C, 55 °C, 56 °C, 58 °C y 60 °C. El programa de ciclado incluyó una desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C, 35 ciclos de 45 seg a 94 °C, 30 seg de *annealing* (temperatura variable según lo descrito anteriormente), 1 min a 72 °C y una extensión final durante 10 min a 72 °C.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2% en TBE de acuerdo a lo descrito e el punto 5.3.3.

5.6. Determinación de la presencia y distribución de los virus ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV y SBV.

5.6.1. Extracción de ARN viral y obtención de ADN copia

A partir de las muestras de abejas nodrizas mantenidas a -80 °C se seleccionaron de forma aleatoria 10 abejas de cada muestra (Anido *et al.*, datos no publicados) y se homogeneizaron en 10 mL de PBS 1X frío (NaCl 8.2 g, Na₂HPO₄ 1.7 g, KH₂PO₄ 0.41 g por litro de H₂O) durante 2 minutos a alta velocidad en un homogeneizador *Stomacher 80 Lab Blender (Seward, London, UK)*. El homogeneizado resultante se centrifugó a 1.500 g durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante se recuperó y se centrifugó nuevamente a 12.000 g durante 15 min a 4 °C. Ciento cuarenta µl del sobrenadante final se utilizaron para la extracción de ARN viral. Tanto la homogeneización como la centrifugación se realizaron en frío con el fin de evitar la degradación del ARN (Chen *et al.*, 2007). El mismo, se extrajo utilizando el kit comercial *QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen™)* de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Cinco µL del ARN obtenido (co-purificado con ADNg) fueron sujetos a la digestión del ADNg y a retrotranscripción mediante el kit comercial *QuantiTect reverse transcription Kit (Qiagen™)* siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit utiliza una mezcla de oligo-dT y *random primers* para la retrotranscripción del ARN, permitiendo la retrotranscripción tanto de fragmentos de ARN viral como de ARN mensajero. El ADNc obtenido se diluyó 1/10 en a H₂O estéril libre de RNasa/DNasa, y se almacenó a -20 °C.

Tabla 3- *Primers* utilizados para la detección de los patógenos *N. apis*, *N. ceranae*, *P. larvae* y *A. woodi*. También se muestran los *primers* utilizados para realizar *fingerprinting* de los aislamientos de *P. larvae* hallados en este trabajo.

Primer	Secuencia 5'-3'	gen	Organismo	Tamaño predicho del amplicón	Referencia
NapisF	GGGGGCATGTCTTTGACGTA	ARNr 16S	<i>N. apis</i>	218-219	Martín-Hernández <i>et al.</i> , 2007
NapisR	GGGGGGCGTTTAAATGTGAAACA				
NcerF	CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTA	ARNr 16S	<i>N. ceranae</i>	321	Martín-Hernández <i>et al.</i> , 2007
NcerR	CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG				
PL4	TCAGTTATAGGCCAGAAAGC	ARNr 16S	<i>P. larvae</i>	700	Piccini <i>et al.</i> , 2002
PL5	CGAGCGGACCTTGTTCC				
ERIC1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	-	-	-	Versalovic <i>et al.</i> , 1994
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG				
BOXA1R	CTACCGCAAGGCGACGCTGACG	-	-	-	Versalovic <i>et al.</i> , 1994
AWF	TCTTCAATTTAATTATACGT	COI	<i>A. woodi</i>	220	Kojima <i>et al.</i> , 2011
AWR	CAAAAATCAGAATAAATGTTGAAATA				

5.6.2. Detección de virus por PCR en Tiempo Real (qPCR)

Para la detección de virus en abejas, se utilizó el kit comercial de PCR *QuantiTect SYBR PCR Kit (Qiagen™)* y *primers* específicos para los diferentes virus (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, KBV, IAPV y SBV, Tabla 4). Como gen de referencia se empleó el gen que codifica para la β -actina de la abeja (tabla 4). La mezcla de reacción consistió en 1x *QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*, 0,5 μ M de cada par de *primers* (un par de *primers* por reacción), agua libre de RNAasas y 5 μ L de ADNc en un volumen final de 50 μ L. En todas las corridas se incluyeron controles negativos y un estándar apropiado (para cada virus y para la β -actina). El mismo se generó realizando diluciones seriadas 1/10 a partir del ADNc de una muestra positiva para cada virus. La inclusión de esta curva es necesaria para que el *software (Rotor-Gene™ 6000 real-time rotary analyzer* versión 1.7) pueda calcular el *threshold* o umbral y la eficiencia de reacción.

Las reacciones de PCR en Tiempo Real se realizaron en un termociclador *Rotor Gene 6000* (Corbett Research™). El programa de ciclado consistió en una activación inicial a 50 °C durante 2 min y 95 °C durante 15 min, y 40 ciclos de 94 °C por 15 seg, 50 °C por 30 seg y 72 °C por 30 seg. La especificidad de la reacción se verificó mediante la inclusión de una curva de desnaturalización o *melting* de los productos amplificados (de 65 a 95 °C).

5.6.3. Cuantificación de la carga viral

En primer lugar, y con el fin de confirmar la identidad de los amplicones obtenidos, se realizó una electroforesis en geles de agarosa 2% con los productos de PCR, determinándose el tamaño de los mismos. Posteriormente se seleccionó un producto de PCR de cada virus y se lo secuenció *Macrogen* (Korea). Cada producto de PCR posee una temperatura de desnaturalización específica determinada por la secuencia de nucleótidos, que es calculada por el *software* y registrada. Una vez confirmada la identidad de los amplicones, se utilizó la temperatura de *melting* (desnaturalización) de dichos amplicones para confirmar la identidad del resto de los productos obtenidos. Los resultados de las amplificaciones para los distintos virus y para la β -actina se expresaron como valores de ciclo de cuantificación (Cq). El Cq representa el número de ciclos necesarios para generar una señal de fluorescencia mayor a un valor umbral predeterminado (*threshold*). La determinación del valor umbral se realiza de forma automática por el *software*. De forma paralela se obtuvo la eficiencia de reacción para la amplificación de los diferentes genes, y esta información se empleó para estimar la carga viral de cada muestra, utilizando el método de Pfaffl (2001). Los valores obtenidos se transformaron usando la fórmula $\text{Log}(x+1)$ para visualizar mejor las diferencias en los gráficos y para los análisis estadísticos.

Tabla 4- *Primers* utilizados para la detección y cuantificación de virus mediante qPCR.

Primer	Secuencia 5'-3'	Virus /gen	Tamaño predicho del amplicón	Referencia
ABPV1	ACCGACAAAGGGTATGATGC	ABPV	124	Johnson <i>et al.</i> , 2009
ABPV2	CTTGAGTTTGCGGTGTTCCT			
DWV1	CTGTATGTGGTGTGCCTGGT	DWV	260	Kukielka <i>et al.</i> , 2008
DWV2	TTCAAACAATCCGTAATATAGTGT			
BQCV1	AAGGGTGTGGATTCGTCAG	BQCV	305	Kukielka <i>et al.</i> , 2008
BQCV2	GGCGTACCGATAAAGATGGA			
CBPV3	CGCAAGTACGCCTTGATAAAGAAC	CBPV	250	Blanchard <i>et al.</i> , 2008
CBPV4	ACTACTAGAACTCGTCGCTTCG			
CBPV5	TCTGGCTCTGTCTTCGCAAA	CBPV	58	Chantawannakul <i>et al.</i> , 2006
CBPV6	GATACCGTCGTCACCCTCATG			
SBV1	GGGTCGAGTGGTACTGGAAA	SBV	105	Johnson <i>et al.</i> , 2009
SBV2	ACACAACACTCGTGGGTGAC			
KBV1	TGAACGTCGACCTATTGAAAAA	KBV	127	Stoltz <i>et al.</i> , 1995
KBV2	TCGATTTCCATCAAATGAGC			
IAPV1F	CCAGCCGTGAAACATGTTCTTACC	IAPV	226	Palacios <i>et al.</i> , 2008
IAPV1	ACATAGTTGCACGCCAATACGAGAAC			
IAPV2	AATGGACCAATGGATTTYTCWATWGCT	IAPV	137	Palacios <i>et al.</i> , 2008
IAPV2R	CGAACAGTTTTACTCCAGTCYTGAGARTAC			
IAPV3	CGAACTTGGTGAAGG	IAPV	114	Palacios <i>et al.</i> , 2008
IAPV4	GCATCAGTCGCTTCCAGGT			
BACTIN1	ATGCCAACACTGTCCTTCTGG	β -actina	148	Yang & Cox-Foster, 2005
BACTIN2	GACCCACCAATCCATACGGA			

5.7. Análisis de la relación entre la presencia de diferentes patógenos y la expresión de genes de la inmunidad en abejas.

5.7.1. Extracción de ARNm y obtención de ADNc

En primer lugar se conformaron dos grupos de colmenas basados en los resultados obtenidos en la primera parte de esta tesis. Se formó un grupo con 11 colmenas que presentaban los siguientes patógenos: *V. destructor*, *N. ceranae*, BQCV, y/o los virus

ABPV, DWV y SBV (grupo con alta carga de patógenos) (Tabla 5). El segundo grupo se formó con 8 colmenas que no presentaban ninguno de los patógenos analizados o sólo presentaban el virus BQCV (grupo con baja carga de patógenos) (Tabla 5). Dado que el virus BQCV presentó una altísima prevalencia en este estudio (cerca del 89%), hubo muy pocas muestras libres de todo patógeno analizado. Es por esta razón que se decidió usar como muestra sin patógenos, muestras que contenían sólo el virus BQCV.

A partir de las muestras de abejas nodrizas mantenidas a -80 °C se seleccionaron de forma aleatoria 50 abejas de cada muestra, de acuerdo a lo recomendado por B. Dainat (comunicación personal) y se homogeneizaron en 20 mL de PBS 1X frío (NaCl 8,2 g, Na₂HPO₄ 1,7 g, KH₂PO₄ 0,41 g por litro de H₂O) durante 2 min a alta velocidad en un homogeneizador *Stomacher 80 Lab Blender (Seward, London, UK)*. El homogeneizado resultante se centrifugó a 1.500 g durante 10 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante y el mismo se centrifugó nuevamente a 12.000 g durante 15 min a 4 °C. 100 µL del sobrenadante final se utilizaron para la extracción de ARN mensajero. Tanto la homogeneización como la centrifugación se realizaron en frío con el fin de evitar la degradación del ARN (Chen *et al.*, 2007). El ARN se extrajo utilizando el kit comercial *RNeasy Plus MiniKit (Qiagen™)* según las instrucciones del fabricante. Cinco µL de ARN se sometieron a retrotranscripción empleando el kit comercial *QuantiTect reverse transcription Kit (Qiagen™)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Al ADNc obtenido se le realizó una dilución 1/10 en agua libre de RNasa/DNasa, y se almacenó a -20 °C.

5.7.2. Análisis de genes involucrados en la inmunidad

Se utilizó el kit comercial de PCR *QuantiTect SYBR PCR Kit (Qiagen™)* y *primers* específicos para la amplificación del ADNc que codifica para diferentes proteínas relacionadas con el sistema inmune de *A. mellifera* (abaecina, defensina, himenoptecina, vitelogenina, glucosa deshidrogenasa, (profenol-) fenoloxidasas, lisozima, Tabla 6). Se emplearon 2 genes de referencia, el gen que codifica para la β-actina y el gen que codifica la proteína ribosomal S5 (Tabla 6). La mezcla de reacción consistió en 1x *QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen™)*, 0,5 µM de cada *primer* (un par de *primers* por reacción), agua libre de RNAsas y 5 µL de ADNc en un

volumen final de 50 µL. En todas las corridas se incluyeron controles negativos y un estándar apropiado para cada gen. El mismo se generó realizando diluciones seriadas 1/10 a partir del ADNc de una muestra positiva. La inclusión de esta curva es necesaria para que el *software* (*Rotor-Gene™ 6000 real-time rotary analyzer versión 1.7*) pueda calcular el *threshold* o umbral y la eficiencia de reacción. Las reacciones de PCR se corrieron en un termociclador en Tiempo Real *Rotor Gene™ 6000 (Corbett Research™)*, el programa de ciclado consistió en una activación inicial a 50 °C durante 2 min y 95 °C durante 15 min, y 40 ciclos de 94 °C por 15 seg, 50 °C por 30 seg y 72 °C por 30 seg. La especificidad de la reacción se verificó mediante la inclusión de una curva de desnaturalización o *melting* de los productos amplificados (de 65 a 95 °C).

5.7.3. Cuantificación de la expresión génica

Los resultados de las amplificaciones para los genes analizados se expresaron como valores de ciclo de cuantificación (Cq). Como se mencionó en la sección 5.6.3, el Cq se determina de forma automática por el *software*. De forma paralela se obtuvo la eficiencia de reacción para la amplificación de los diferentes genes, y esta información se empleó para estimar la expresión génica de cada muestra, utilizando el método de Pfaffl (2001). Para normalizar la expresión de los genes de inmunidad se utilizó la media geométrica de los dos genes de referencia (β -actina y RPS5) (Vandesompele *et al.*, 2012).

Tabla 5- Grupos conformados para analizar la expresión diferencial de genes de inmunidad entre abejas con baja o alta carga de patógenos.

Colmena	Grupo con baja carga de patógenos	Colmena	Grupo con alta carga de patógenos
5	BQCV	7	<i>V. destructor</i> , <i>N. ceranae</i> , BQCV
9	BQCV	10	<i>V. destructor</i> , <i>N. ceranae</i> , BQCV
13	BQCV	33	<i>V. destructor</i> , <i>N. ceranae</i> , BQCV, ABPV, DWV, SBV
37	BQCV	34	<i>V. destructor</i> , <i>N. ceranae</i> , BQCV, ABPV, DWV, SBV
60	-	46	<i>V. destructor</i> , <i>N. ceranae</i> , BQCV, ABPV
67	BQCV	50	<i>V. destructor</i> , <i>N. ceranae</i> , BQCV, SBV
92	BQCV	63	<i>V. destructor</i> , <i>N. ceranae</i> , BQCV
98	BQCV	68	<i>V. destructor</i> , <i>N. ceranae</i> , BQCV, DWV
		75	<i>V. destructor</i> , <i>N. ceranae</i> , BQCV
		86	<i>V. destructor</i> , <i>N. ceranae</i> , BQCV
		121	<i>V. destructor</i> , <i>N. ceranae</i> , BQCV

Tabla 6- *Primers* utilizados para cuantificar la expresión génica de genes relacionados con la inmunidad de las abejas

Primer	Secuencia 5'-3'	gen	Referencia
Abaecin- F	CAGCATTGCGATACGTACCA	Abaecina	Evans, 2006
Abaecin- R	GACCAGGAAACGTTGGAAAC		
Defensin- F	TGTCGGCCTTCTCTCATGG	Defensina	Yang & Cox-Foster, 2005
Defensin- R	TGACCTCCAGCTTTACCCAAA		
Hymenopt- F	CTCTTCTGTGCCGTTGCATA	himenoptecina	Evans, 2006
Hymenopt- R	GCGTCTCCTGTCATTCCATT		
VgMC-F	AGTTCCGACCGACGACGA	Vitelogenina	Corona <i>et al.</i> , 2009
VgMC-R	TTCCTCCACGGAGTCC		
GLD- F	CTGCACAACCACGTCTCGTT	Glucosa deshidrogenasa	Yang & Cox-Foster, 2005
GLD- R	ACCGCCGAAGAAGATTTGG		
PO- F	AATCCATTACCTGAAATTGATGCTTAT	(Profenol-) fenoloxidasas	Yang & Cox-Foster, 2005
PO-R	TAATCTCCAATAATTCATACGCTCTT		
LYS-F	ACACGGTTGGTCACTGGTCC	Lisozima	Yang & Cox-Foster, 2005
LYS-R	GTCCACGCTTTGAATCCCT		
RPS5-F	AATTATTTGGTCGCTGGAATTG	Proteína Ribosomal S5	Evans, 2006
RPS5-R	TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA		
BACTIN1	ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG	β -actina	Yang & Cox-Foster 2005
BACTIN2	GACCCACCAATCCATACGGA		

5.8. Análisis estadísticos

Para analizar los parámetros de fortaleza de la colmena (población, cría y reservas de miel) se calculó el promedio nacional y se lo expresó como media \pm desvío estándar.

Por otro lado, se calculó la prevalencia a nivel nacional de cada uno de los patógenos analizados (casos positivos/total de casos analizados) con el intervalo de confianza del 95% según lo reportado por vanEngelsdorp *et al.* (2013).

Posteriormente se evaluó si los datos obtenidos cumplían los supuestos para el uso de la estadística paramétrica. Para ello se evaluó la normalidad utilizando el test de

Kolmogorov-Smirnov (incluyendo la corrección Lilliefors) y la homogeneidad de varianza utilizando el test de Levene.

Con el fin de evaluar la asociación entre la carga de distintos patógenos y también con los parámetros de fortaleza de la colmena, se utilizó el test no paramétrico de Correlación de rangos de Spearman. En el caso de *Nosema* spp., para el que solo se estableció presencia/ausencia y no nivel de infección, se generaron dos grupos, uno con presencia de *Nosema* spp. y otro con ausencia. Posteriormente se comparó la carga de los otros patógenos así como los parámetros de la colmena entre ambos grupos, mediante el test no paramétrico Mann-Whitney

Por otra parte se analizó si existía dependencia entre la presencia de dos patógenos, para ello se aplicó el test de χ^2 . En los casos en que la frecuencia esperada era menor a 1 se aplicó el test de χ^2 con la Corrección de Yates.

También se analizaron los *Odds ratio* (ORs), este análisis permite calcular el grado de asociación entre la exposición a un factor y el estado de una enfermedad. En otras palabras, mide la fuerza de asociación o la falta de independencia entre dos valores de datos binarios (en este caso presencia/ausencia de patógeno) y permite cuantificar el riesgo de aparición de una enfermedad en presencia de un determinado factor. La significancia del ORs se determina en base al cálculo de los valores del intervalo de confianza de 95 %, si hay valores menores a 1 el ORs se considera no significativo (vanEngelsdorp *et al.*, 2013). Posteriormente se analizó la diferencia entre los niveles de infestación de *V. destructor* según los tratamientos acaricidas aplicados durante el año anterior al muestreo, utilizando el test no paramétrico Kruskal – Wallis; así como la diferencia entre colmenas con y sin tratamientos, empleando test no paramétrico Mann – Whitney.

Por último, se analizó si existían diferencias en la expresión de genes vinculados a la inmunidad entre el grupo con baja carga de patógenos y el grupo con alta carga de patógenos. Para los datos obtenidos de cada gen se evaluó en primer lugar la normalidad (Kolmogorov-Smirnov, corrección Lilliefors) y homogeneidad de varianza (test de Levene). En los casos en que no se cumplieron los supuestos paramétricos, se procedió a aplicar una transformación de los datos $\text{Log}(x+1)$ y se repitieron los test de normalidad y homogeneidad de varianza. En los casos que los datos cumplieron los supuestos para el uso de la estadística paramétrica se empleó el test t de Student para

comparar entre ambos grupos; en los casos en los que esto no fue posible, se empleó el test de no paramétrico, Mann-Whitney.

En todos los casos se estableció que los valores de p menores a 0,05 eran significativos. Los análisis de normalidad y los gráficos de dispersión tipo *box-plot* se realizaron utilizando el *software* Gnumeric 1.10.9. Para el resto de los gráficos, las prevalencias con sus intervalos de confianza de los patógenos, los ORs con los intervalos de confianza, las medias de los parámetros de la colmena con sus desvíos estándar y el test de χ^2 y el test de χ^2 con la corrección de Yates, se utilizó el *software* Excel 2010. El resto de los análisis aquí mencionados se realizaron con el *software* PAST versión 2.15 (Hammer *et al.*, 2001).

6. Resultados

6.1. Colección de muestras.

Se colectaron 103 muestras provenientes de 103 apiarios distintos de todo el Uruguay (1 colmena por apiario). De cada colmena se obtuvo además un formulario que contenía información acerca de la fortaleza de la misma, así como otros parámetros productivos de importancia.

6.2. Determinación de los parámetros de la colmena.

Los datos acerca de la cantidad de población adulta se midieron en cantidad de cuadros, mientras que las reservas de miel y de cría operculada se midieron en octavos de cuadro. Los datos que se presentan se convirtieron a número de abejas adultas, y superficie en cm^2 (miel y cría) en base a los parámetros publicados por Delaplane *et al.* (2013). El valor promedio de abejas adultas por colmena a nivel nacional se calculó en 22.844 ± 7.927 . En la figura 7 se muestra la mediana y dispersión de los datos por departamento y a nivel nacional, y a su vez se indica la población de abejas adultas recomendadas previa a la invernada (aproximadamente 17.600 abejas o 10 cuadros completos cubiertos por abejas) (Harriet y Campá comunicación personal).

También se evaluó la superficie cubierta por cría, la que se estimó en $5.441 \pm 2.908 \text{ cm}^2$ ($25 \pm 13,2$ octavos de cuadro) (Fig. 8). Finalmente se calcularon las reservas de miel de las colmenas al momento de realizar el muestreo. El promedio nacional se estimó en $7.177 \pm 5.560 \text{ cm}^2$ ($4,1 \pm 3,2$ octavos de cuadro) (Fig. 9).

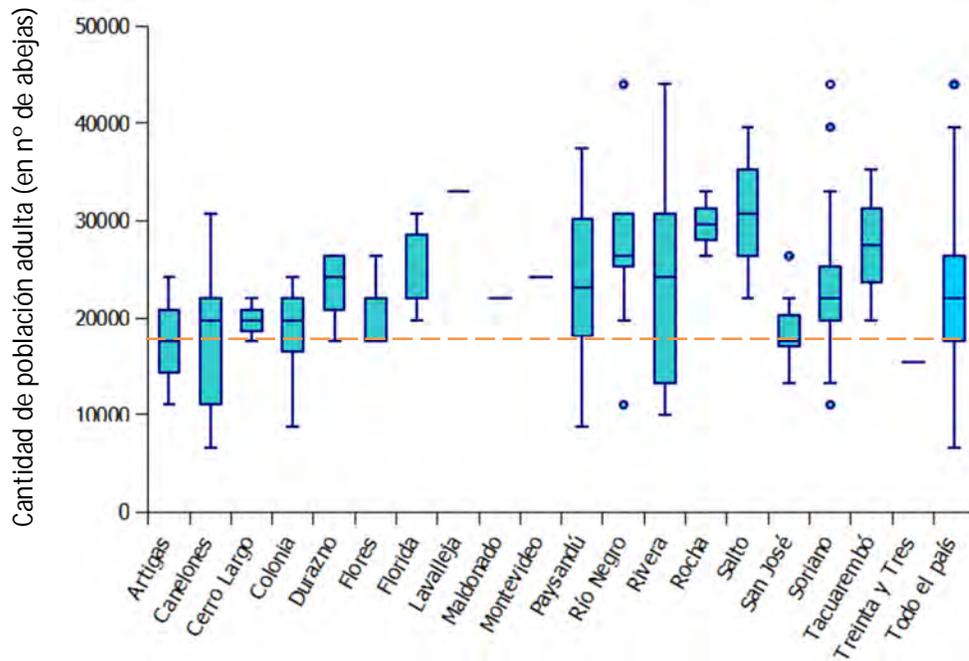


Figura 7- Población adulta (número de individuos) de las colmenas analizadas, tanto a nivel nacional como departamental. La línea naranja indica el valor mínimo recomendado de población que es apropiado para que la colmena pueda invernar (J. Harriet, Comunicación personal). Las cajas del gráfico muestran la dispersión intercuartil de los datos (contiene el 50% central de los datos de la distribución). En el interior del rectángulo se marca la posición de la mediana.

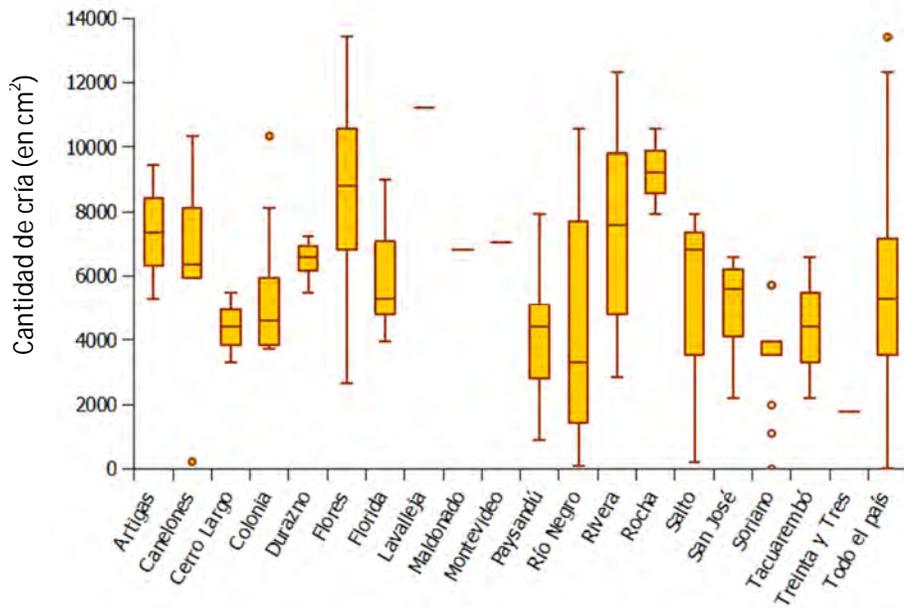


Figura 8- Cantidad de cría (cm²) en las colmenas analizadas, tanto a nivel nacional como departamental. Las cajas del gráfico muestran la dispersión intercuartil de los datos (contiene el 50% central de los datos de la distribución). En el interior del rectángulo se marca la posición de la mediana.

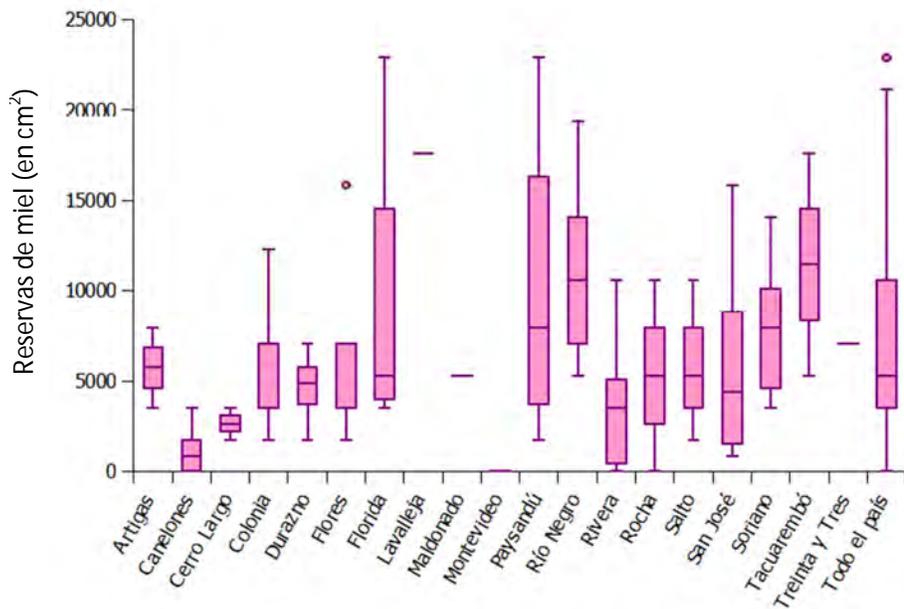


Figura 9- Reservas de miel (cm²) en las colmenas analizadas, tanto a nivel nacional como departamental. Las cajas del gráfico muestran la dispersión intercuartil de los datos (contiene el 50% central de los datos de la distribución). En el interior del rectángulo se marca la posición de la mediana.

6.3. Determinación de la prevalencia y distribución de *V. destructor*.

En primer lugar se determinó la prevalencia nacional \pm IC 95% de *V. destructor* tanto en abejas nodrizas como en pecoreadoras, la cual fue de $75,7\% \pm 8,4$ y $83,5\% \pm 7,2$ respectivamente. Los resultados muestran una alta prevalencia y amplia distribución del patógeno en todo el país (Fig. 10). También se determinó el nivel de infestación de las muestras en abejas nodrizas y en pecoreadoras, no encontrando diferencias significativas entre ambas (Mann-Whitney, $p= 0,723$). En los análisis de co-infección se utilizaron los valores provenientes de las abejas nodrizas ya que es el tipo de muestra recomendado para el análisis de este patógeno. En los gráficos de dispersión *box plot*, se señala en azul los departamentos cuyas medianas de infestación fueron superiores a 4%, este valor se ha reportado como el nivel de infestación umbral para daño irreversible en la colmena si no es tratada con acaricidas (Fig. 11). Para las abejas nodrizas esto se observó en los departamentos de Canelones, Florida, Lavalleja, San José y Tacuarembó. En celeste se marcan los departamentos que presentaron al menos una muestra con valor superior al 4%, los mismos fueron: Artigas, Cerro Largo, Colonia, Paysandú, Río Negro y Soriano (por más información ver tabla a en Anexo I).

En base a la información obtenida en la encuesta realizada junto con el muestreo, se observó que del total de colmenas muestreadas el 82,5% había sido tratada contra varroa el año anterior, mientras que al 17,5% no se le había aplicado tratamiento alguno. Del total de colmenas el 71,8% había sido tratada al menos una vez con un acaricida de síntesis, mientras que el 10,7% había sido tratado sólo con acaricidas orgánicos. Los acaricidas sintéticos utilizados en la temporada anterior fueron amitraz (60,2%), flumetrina (9,7%), cumafós (1%), mientras que los acaricidas orgánicos fueron ácido oxálico (7,8%) y timol (2,9%) (Fig. 12). Se analizó si los diferentes tratamientos habían incidido en los niveles de infestación hallados en este estudio, mediante el test no paramétrico Kruskal – Wallis. Al comparar los niveles de infestación de varroa en nodrizas en las muestras con un sólo tratamiento anual con acaricida sintético ($n=54$), un sólo tratamiento anual orgánico ($n=11$), dos tratamientos anuales (uno sintético y otro orgánico) ($n=20$) y sin tratar ($n=18$) no se hallaron diferencias significativas entre los grupos ($p=0,88$). Posteriormente se analizó, si había diferencias en los niveles de infestación entre las colmenas tratadas sin importar el tipo de tratamiento y las

colmenas sin tratar. Se aplicó el test no paramétrico Mann – Whitney y no se hallaron diferencias significativas ($p=0,55$).

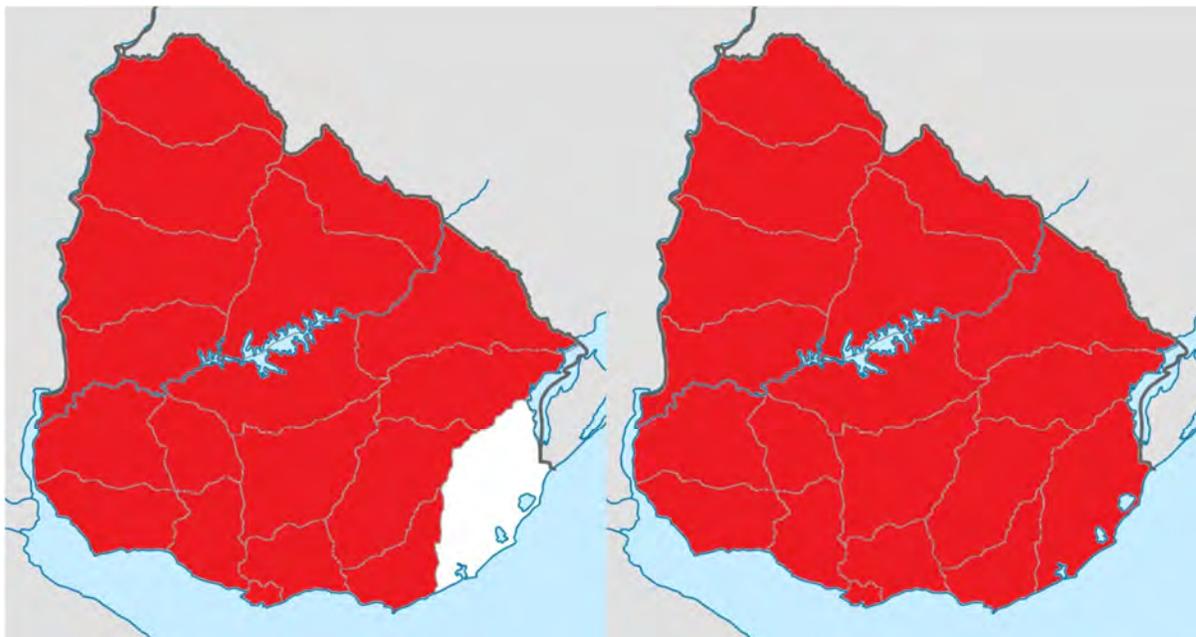


Figura 10- Distribución y prevalencia del ácaro *V. destructor* en Uruguay. En el mapa se indica en color los departamentos en los que se detectó la presencia del ácaro. A la izquierda se muestra la distribución de *V. destructor* observada en abejas nodrizas y a la derecha la distribución observada en abejas pecoreadoras.

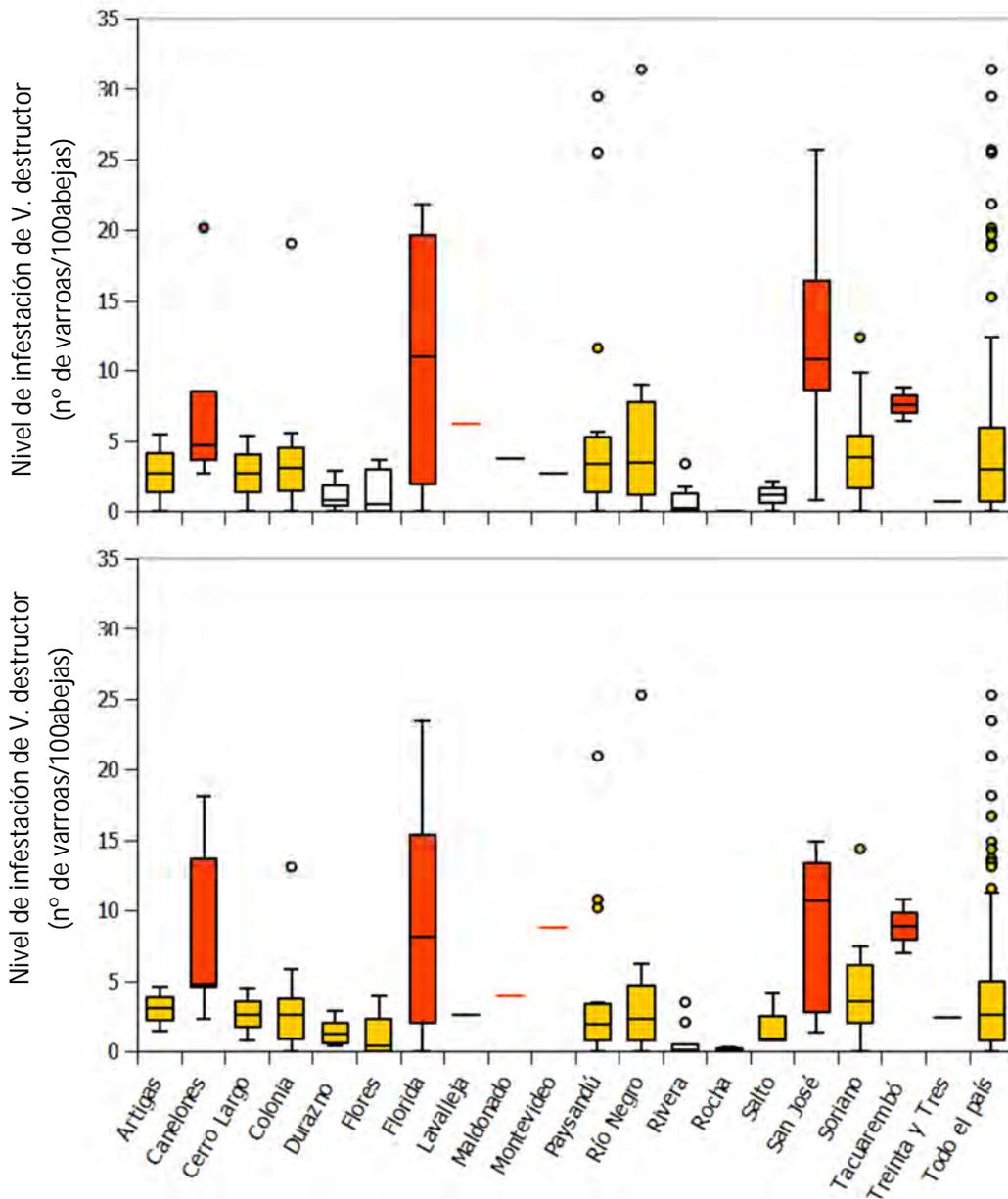


Figura 11- Niveles de infestación de *Varroa destructor*, tanto a nivel nacional como departamental. En la gráfica superior se muestran los valores de infestación (%) obtenidos de abejas pecoreadoras y en la gráfica inferior los valores de infestación (%) en abejas nodrizas. En azul se indican los departamentos que presentaron medianas de niveles de infestación superiores al 4%, colmenas con valores de infestación superiores a dicho valor que no sean tratadas no podrán sobrevivir al invierno. En celeste se indican los departamentos que presentaron valores puntuales mayores al 4%. Las cajas del gráfico muestran la dispersión intercuartil de los datos (contiene el 50% central de los datos de la distribución). En el interior del rectángulo se marca la posición de la mediana.

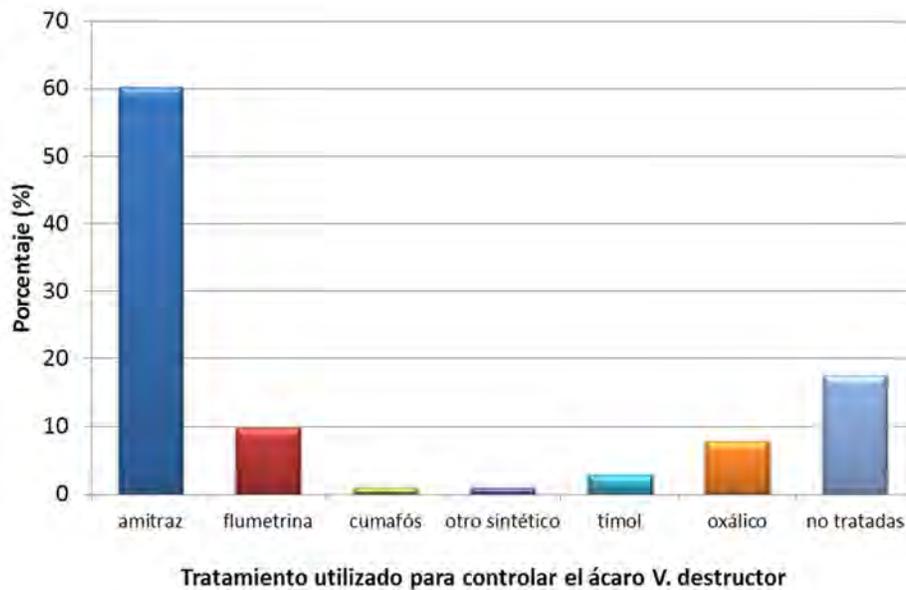


Figura 12- Tipos de tratamientos aplicados para el control del ácaro *V. destructor*. El amitraz, la flumetrina y el cumafós son acaricidas de origen sintético; mientras que el timol y el ácido oxálico son acaricidas de origen orgánico. Estos tratamientos se aplicaron el año anterior al muestreo. En las colmenas en las que se aplicaron dos tratamientos al año (el primero con sintético y el segundo con orgánico), se contabilizó en este gráfico como tratamiento con sintético.

6.4. Determinación de la prevalencia y distribución de *A. woodi*.

Se emplearon muestras de abejas con presencia del ácaro *A. woodi* confirmada por microscopía, para poner a punto la técnica de extracción de ADN. Se ensayaron dos metodologías distintas para extraer ADN, un método basado en SDS y otro utilizando un kit comercial que ya había sido utilizado para la extracción de ADN de otros patógenos (*QIAamp Viral RNA Mini Kit*, *Qiagen™*).

Posteriormente, se intentó amplificar un fragmento específico del gen que codifica para la sub-unidad I de la Citocromo Oxidasa (COI) de *A. woodi*, a partir del ADN obtenido con los métodos antes descritos. Se utilizó un gradiente de temperatura de *annealing* (50, 52, 55, 56, 58 y 60 °C) para ensayar diversas condiciones de PCR. No se logró amplificar el fragmento de 220 pb esperado, a pesar de que se ensayaron

reactivos de diferentes marcas y diferentes equipos de PCR. La técnica de detección molecular no pudo ser puesta a punto.

6.5. Determinación de la presencia y distribución de *N. ceranae* y *N. apis*.

En primer lugar se puso a punto la extracción de ADNg de *Nosema* spp. a partir de abejas infectadas, así como la PCR múltiple desarrollada por Martín-Hernandez *et al.* (2007) para la detección simultánea de *N. apis* y *N. ceranae*.

De acuerdo a lo mencionado en el punto 5.3 de Materiales y métodos se realizó la extracción de ADNg utilizando dos kits comerciales, empleando para ello 6 muestras de abejas pertenecientes a la colección del laboratorio, con el fin de poner a punto la técnica. En la figura 13 se muestra el resultado obtenido con la PCR múltiple utilizando ambos ADNg. Como se puede observar en la figura, el ADNg obtenido utilizando el kit de extracción de ARN viral fue de mejor calidad ya que se logró obtener una banda definida. El producto amplificado presentó el tamaño esperado.

De las 103 muestras analizadas se detectó la presencia de *N. ceranae* en 15 de ellas, mientras que en ninguna de las muestras analizadas se detectó la presencia de *N. apis* (Fig. 14). En todos los casos se verificó que los controles positivos amplificaran correctamente, así como la ausencia de amplicones en los controles negativos. Los positivos obtenidos se compararon con los controles positivos. Dos muestras positivas (46 y 50) fueron seleccionadas al azar con el fin de secuenciar el producto amplificado. La identidad de los amplicones se verificó mediante una búsqueda *blast* en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Ambas secuencias (46 y 50) presentaron un 100% de similitud y un porcentaje de cobertura de 95 y 99% respectivamente con la secuencia parcial del gen ARN ribosomal 16S de la cepa N063-10 de *N. ceranae* (HM859898.1), lo que permitió confirmar la identidad de los fragmentos.

La prevalencia nacional \pm IC 95% de *N. ceranae* se calculó en 14,6% \pm 6,8. No se observó una amplia distribución de *N. ceranae*, sino que estuvo restringida a los

departamentos de Colonia, Durazno, Florida, Paysandú, Río Negro, Rivera, Rocha, Salto y Soriano (fig. 15).

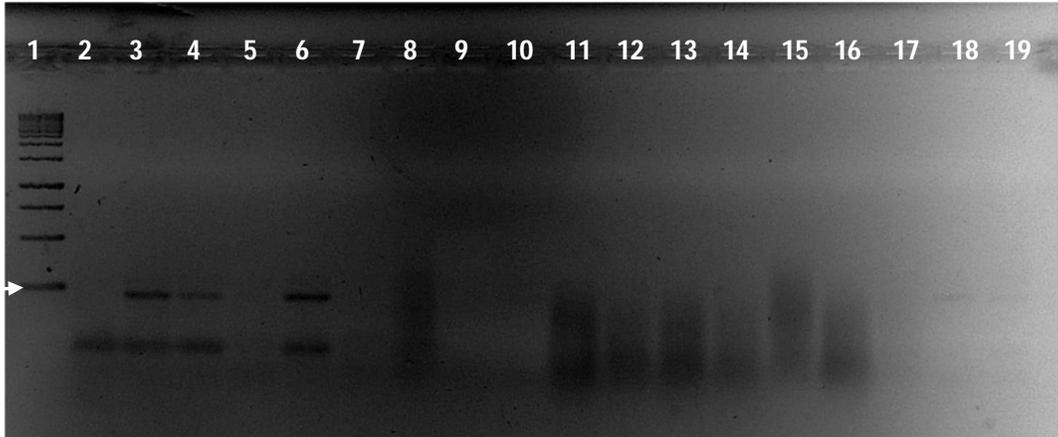


Figura 13- Comparación de dos kits comerciales para la obtención de ADNg de *Nosema* spp. a partir de homogeneizados de abejas. En el carril 1 está marcador de peso molecular *Gene Ruler 1 Kb*, (*Fermentas™*). Carriles 2 al 7, PCR realizado con ADN obtenido con el *Qiamp Viral RNA mini Kit*, (*Qiagen™*) a partir de abejas de la colección del laboratorio; carriles 11 a 16 PCR realizado con ADN obtenido con el kit *Genomic DNA Purification kit*, (*Fermentas™*). Las muestras de abejas de donde se extrajo ADNg son las mismas y se cargaron en el mismo orden. En el carril 18 y 19 se corrieron los controles positivos para *N. ceranae*. El fragmento amplificado para *N. ceranae* se estimó en 218 pb y el de *N. apis* en 321 pb. La flecha indica la banda que pesa 250 pb.

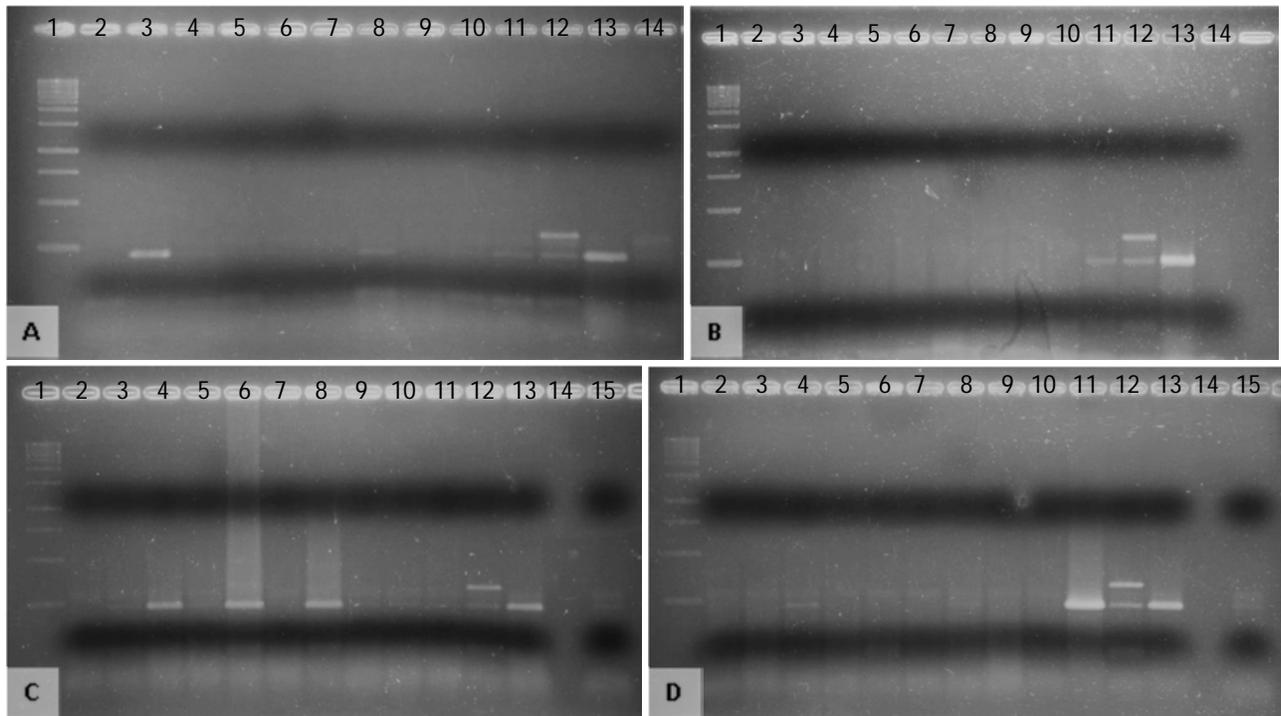


Figura 14- Amplificación de fragmentos del gen ARNr 16S de *N. ceranae* y *N. apsis* utilizando *primers* específicos para estos microsporidios. El fragmento amplificado para *N. ceranae* se estimó en 218 pb y el de *N. apsis* en 321 pb. En todos los casos se utilizó el marcador de peso molecular *Gene Ruler 1 Kb Fermentas™*. Las muestras subrayadas son positivas a *N. ceranae*.

Gel A: carriles del 2 al 11 se indica origen geográfico y número de muestra: Artigas (1), Rivera (2), Rivera (3), Rivera (4), Rivera (5), Rivera (6), Rivera (7), Rivera (8), Rivera (9), Rivera (10), Carril 12, Control positivo para *N. apsis*; carril 13, Control positivo para *N. ceranae* y carril 14, Control negativo.

B: carriles del 2 al 11 se indica origen geográfico y número de muestra: San José (21), San José (23), Florida (24), Colonia (26), Colonia (27), San José (28), San José (29), Canelones (31), San José (32), Colonia (33). Carril 12, Control positivo para *N. apsis*; carril 13, Control positivo para *N. ceranae* y carril 14, Control negativo.

C: carriles del 2 al 11 se indica origen geográfico y número de muestra: Florida (44), Florida (45), Florida (46), Florida (47), Rocha (48), Colonia (49), Soriano (50), Soriano (51), Río Negro (52), San José (53). Carril 12, Control positivo para *N. apsis*; carril 13, Control positivo para *N. ceranae* y carril 15, Control negativo.

D: carriles del 2 al 11 se indica origen geográfico y número de muestra: Salto (54), Salto (55), Salto (56), Paysandú (57), Colonia (58), Canelones (59), Durazno (60), Durazno (61), Soriano (62), Durazno (63), Carril 12, Control positivo para *N. apsis*; carril 13, Control positivo para *N. ceranae* y carril 15, Control negativo.

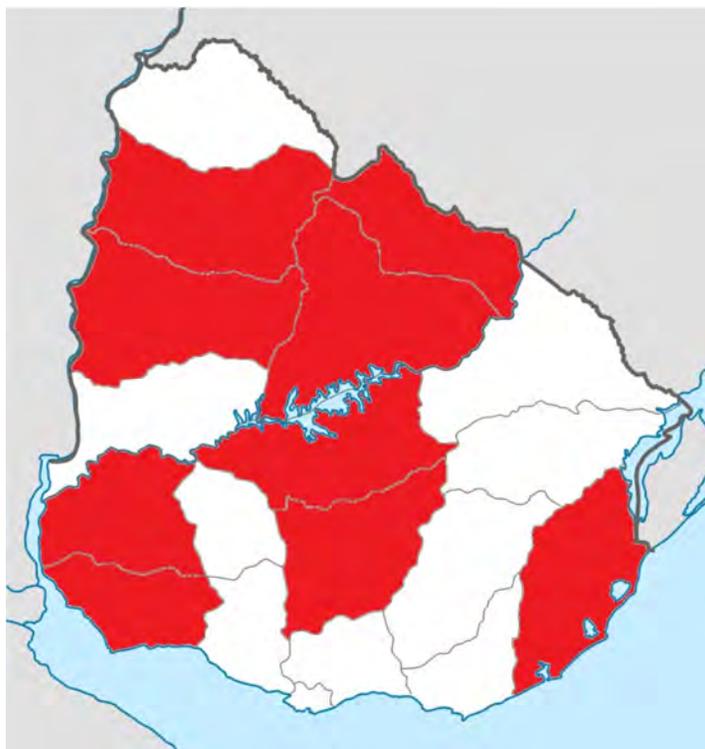


Figura 15- Distribución y prevalencia del hongo microsporidio *N. ceranae* en Uruguay. En el mapa se indica en color los departamentos en los que se detectó la presencia del microsporidio.

6.6. Determinación de la presencia de los virus ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV y SBV, y cuantificación de la carga viral.

Una vez que se realizó la extracción de ARN total y la obtención de ADN copia, se procedió en primer lugar a analizar mediante qPCR el gen de referencia que codifica para la β -actina en las abejas. En las muestras en las que no se detectó dicho gen, se repitió la extracción de ARN total y la posterior obtención de ADN copia. Se analizaron los virus ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV y SBV. En el caso del virus CBPV no fue posible poner a punto la qPCR. A pesar de haber ensayado dos pares de *primers* diferentes a partir de la literatura y haber realizado diferentes variaciones en las concentraciones de reactivos y condiciones de amplificación, ninguno logró amplificar un producto específico correspondiente al virus (datos no mostrados). Con el resto de

los virus no se encontraron inconvenientes y se aplicó la técnica de manera satisfactoria.

Se detectó exitosamente la presencia de los virus ABPV, BQCV, DWV y SBV en las muestras de diferentes regiones. Se seleccionó un amplicón por virus y se verificó el tamaño de los amplicones mediante electroforesis en geles de agarosa. En todos los casos los fragmentos presentaron el tamaño esperado. Posteriormente y con el fin de confirmar su identidad fueron secuenciados. Las secuencias obtenidas presentaron un alto porcentaje de similitud con las secuencias publicadas para los diferentes virus, confirmando su identidad (Tabla 7). Se registró la temperatura de *melting* de dichos productos, y se corroboró que los productos amplificados en todas las muestras presentaran la temperatura de *melting* esperada (Tabla 7). En la tabla 7 también se incluye el promedio de las eficiencias de reacción \pm desvío estándar.

Tabla 7- Identidad, temperatura de *melting* y eficiencia de reacción de los diferentes fragmentos amplificados.

Virus	Temp. <i>melting</i> (°C)	% Similitud	Identificación	Promedio Eficiencia
ABPV	81,5-82,2	97%	gen de proteína de la cápside de ABPV (AY763414.1)	112% \pm 15
BQCV	81,5-82,5	97%	gen de una poliproteína estructural de BQCV (AY626246.1)	95% \pm 9
DWV	81,5-82,8	97%	gen de una poliproteína de DWV (DQ385507.1)	103% \pm 20
SBV	77,5-78,2	97%	gen de una poliproteína de SBV (FJ347141.1)	99% \pm 23

No se lograron detectar los virus IAPV y KBV. Al analizar la prevalencia nacional \pm IC 95% de los diferentes virus, el BQCV fue el que presentó mayor prevalencia a nivel nacional, (87,4% \pm 6,4). El resto de los virus mostraron prevalencias mucho menores: 14,6% \pm 6,8 el ABPV, 29,1% \pm 8,8 el DWV y 19,4% \pm 7,6 el SBV.

El virus BQCV mostró una amplia distribución, detectándose altas prevalencias en todos los departamentos (Fig. 16), mientras que los restantes virus se concentraron

preferencialmente en el sur-oeste y en el litoral oeste del país. En dichas zonas se encontraron tasas de prevalencia medias y medias altas (Fig. 16).

Posteriormente se analizaron los resultados de la cuantificación de la carga viral de los distintos virus en cada muestra. Los datos de Cq obtenidos se procesaron de acuerdo a lo sugerido por Pfaffl (2001), de manera que se muestran de forma relativa a la muestra con menor carga viral del presente estudio.

Este procedimiento se realizó para cada uno de los virus analizados y en todos los casos se encontró una alta variabilidad en la carga viral. El caso más extremo fue el del virus DWV, con diferencias de hasta 9 órdenes de magnitud entre muestras. Debido a esto, los datos de incremento relativo fueron logaritmizados utilizando la fórmula $\text{Log}_{10}(x+1)$; los datos sin logaritmizar se muestran en la tabla b y c del Anexo I.

La distribución de las cargas virales por departamento se muestra la figura 17. Los virus ABPV y SBV presentaron una alta variabilidad en los niveles de infección entre departamentos, mientras que los virus BQCV y DWV mostraron niveles de infección más similares entre departamentos. El BQCV no sólo es el virus de mayor prevalencia a nivel nacional sino que a su vez las muestras positivas presentan cargas virales de moderadas a altas.

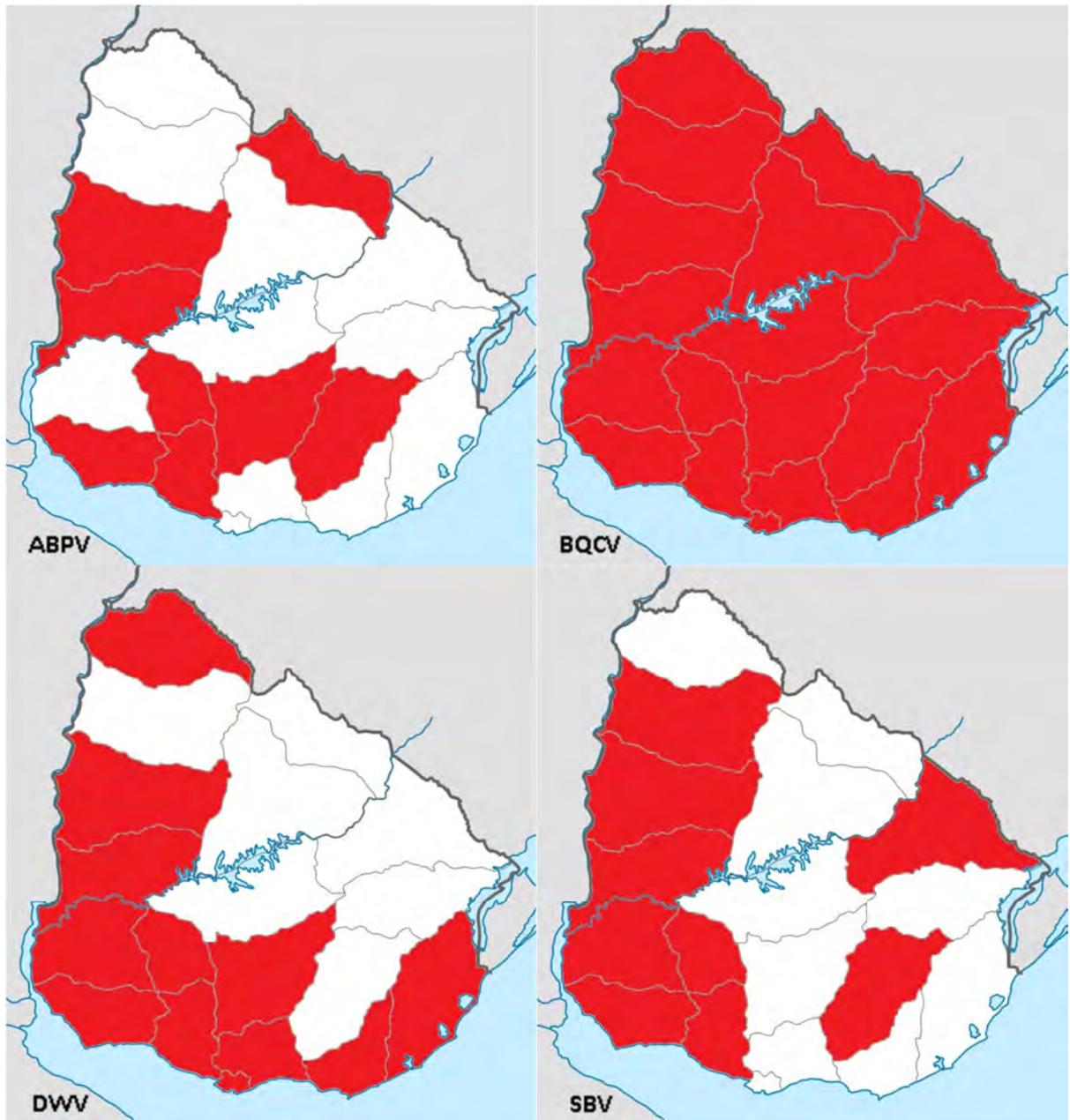


Figura 16- Distribución y prevalencia de los virus encontrados en Uruguay. En el mapa se indica en color los departamentos en los que se detectó la presencia de los distintos virus.

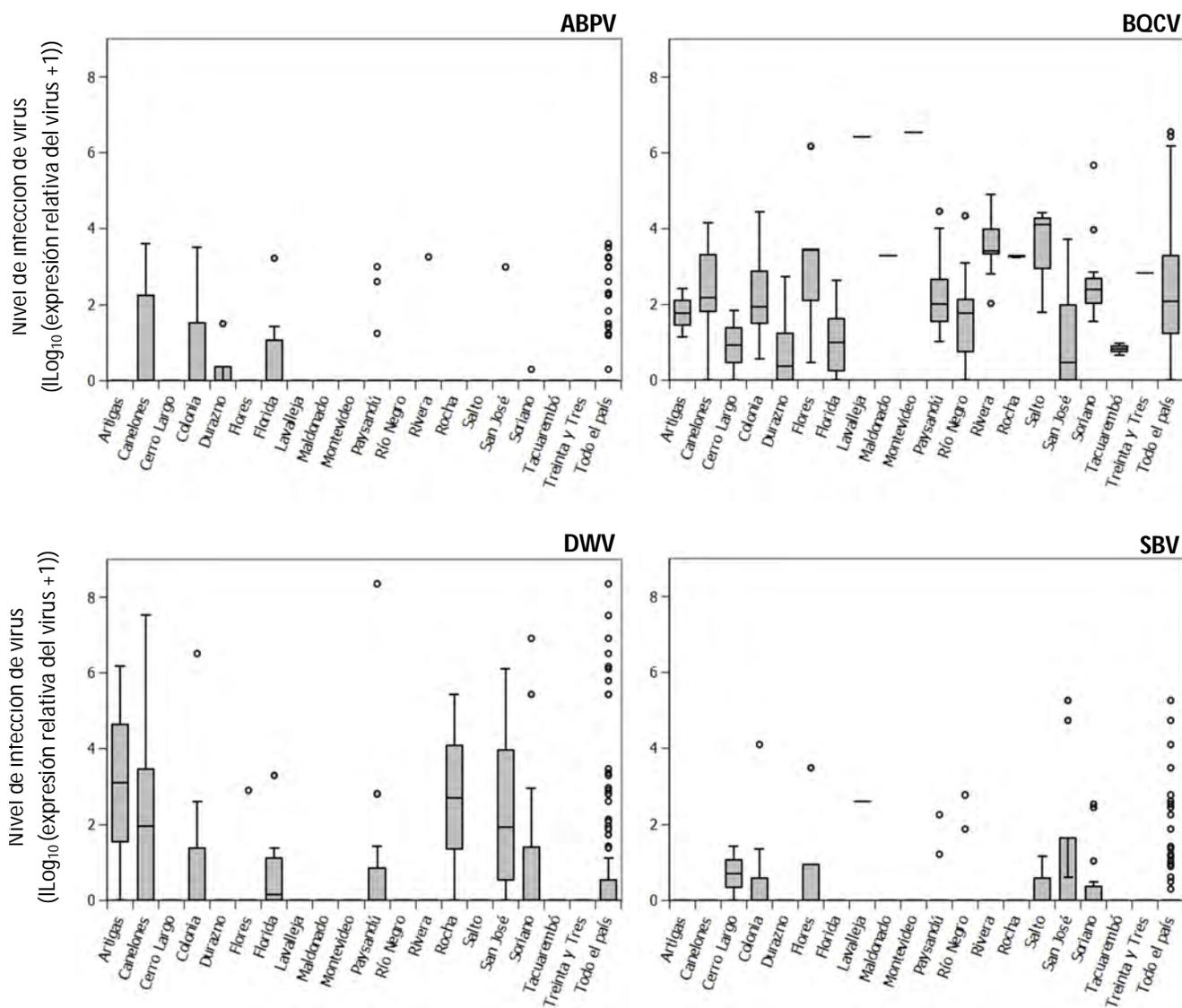


Figura 17- Gráfico tipo *Box plot* que muestra la dispersión de los niveles de infección de los virus encontrados en Uruguay, tanto a nivel nacional como departamental. Los valores que se presentan son los datos de expresión relativa logaritmizados. Las cajas del gráfico muestran la dispersión intercuartil de los datos (contiene el 50% central de los datos de la distribución). En el interior del rectángulo se marca la posición de la mediana.

6.7. Determinación de la presencia de esporas de *P. larvae* en miel.

Se evaluó la presencia de esporas de *P. larvae* mediante cultivo bacteriológico en 101 muestras de miel. Cabe mencionar que ninguna de las colonias evaluadas presentó la sintomatología de la Loque americana. Del total de muestras analizadas, sólo en dos muestras provenientes de Soriano se obtuvieron aislamientos que presentaron la morfología esperada y el resultado negativo del ensayo de la catalasa.

La confirmación de la identidad de dichos aislamientos se realizó mediante amplificación de un fragmento específico de 700 pb del ARN 16S de *P. larvae* (Fig. 18).

Una vez confirmada la identidad de los aislamientos, se calculó la cantidad de esporas por gramo de miel que presentaban las mieles. La muestra 71 presentó 303 esporas/g miel, mientras que la muestra 82 presentó 161 esporas/g miel. En la figura 19a se muestra la media departamental de la carga de esporas/g de miel. Por otro lado se calculó la prevalencia a nivel nacional \pm IC 95% de *P. larvae* en $2,0\% \pm 2,7$ (Fig. 19b).

Con el fin de continuar la caracterización de los aislamientos se procedió a realizar su genotipado, empleando para ello la técnica de *rep* PCR con los *primers* ERIC y BOX PCR. Los dos aislamientos encontrados en el presente trabajo mostraron el perfil ERIC I BOX A (Fig. 20).

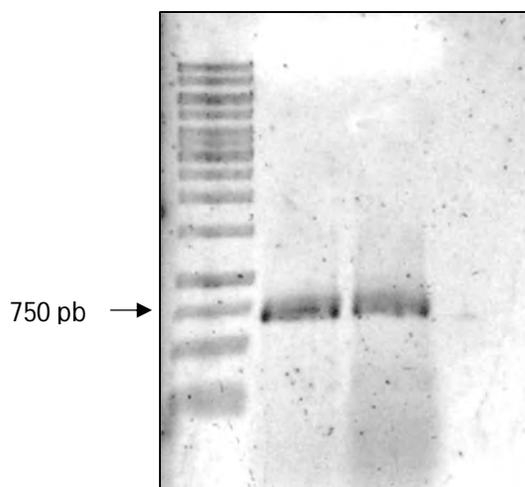


Figura 18- Identificación de los aislamientos de *P. larvae*, mediante PCR. Gel de agarosa 0,8% donde se corrieron los productos de la PCR específica para *P. larvae*. De izquierda a derecha: marcador de peso molecular *Gene Ruler 1Kb*, (*Fermentas™*), muestra 71, muestra 82 y control negativo. La banda esperada pesa 700 pb. La flecha

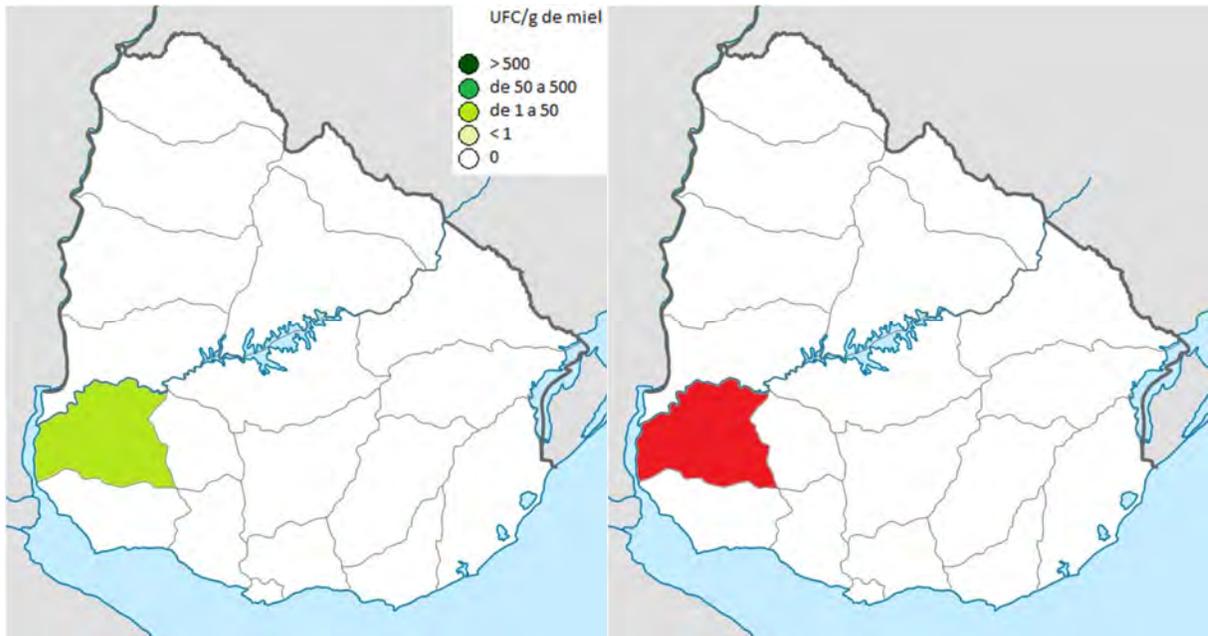


Figura 19- Distribución y nivel de infección de la bacteria *P. larvae*. En el mapa de la izquierda se señala en nivel de infección (promedio departamental del n° esporas de *P. larvae* por gramo de miel). A la derecha se presenta en color los departamentos en los que se detectó la presencia de esporas de la bacteria en miel.

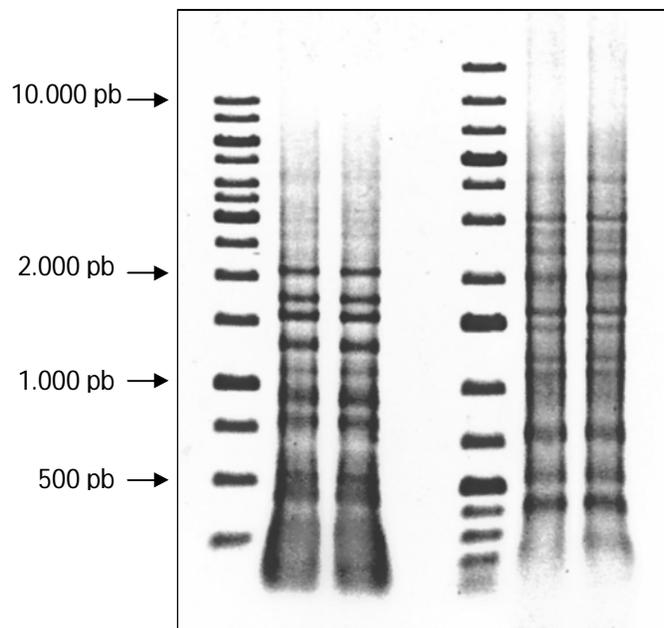


Figura 20- Genotipificado de los aislamientos de *P. larvae* mediante *rep* PCR utilizando *primers* ERIC y BOX. Gel de agarosa 0.8% con los productos amplificados, de izquierda a derecha: marcador de peso 1Kb *Gene Ruler Fermentas™*. ERIC muestra 71, ERIC muestra 82, marcador de peso *Gene Ruler 1Kb plus, (Fermentas™)*, BOX muestra 71, BOX muestra 82.

6.8. Análisis de los patrones de co-infección de los diferentes patógenos y evaluación de su relación con el estatus sanitario de la colmena.

En primer lugar se evaluó si la presencia de alguno de los patógenos era independiente de la presencia de otro. Para ello se emplearon dos análisis: test de Chi^2 y el test de *Odds Ratio*. En el caso de Chi^2 se eligió para evaluar la significancia el valor de p sin corrección de Yates para todas las variables, excepto para los que involucraban a *P. larvae*. Ninguno de los patógenos analizados presentó una relación de dependencia significativa entre sí, ni un riesgo de presencia mayor significativo en presencia de otro (ORs). En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos con el test de Chi^2 y los valores de riesgo obtenidos con el test de *Odds Ratio* así como los intervalos de confianza de los mismos.

Dado que las variables que implicaban la carga de los diferentes patógenos no cumplieron con los supuestos paramétricos, las asociaciones entre ellas se analizaron mediante el test no paramétrico de Correlación de rangos de Spearman (Tabla 9). A continuación se detallan sólo las asociaciones que resultaron significativas. Se encontró una fuerte asociación positiva entre el nivel de infestación por varroa en abejas nodrizas y en abejas pecoreadoras ($r_s = 0,85$), así como una asociación baja entre el nivel de infestación de varroa en nodrizas y la carga viral de DWV ($r_s = 0,39$), y entre la carga viral de DWV y la carga de esporas de *P. larvae* ($r_s = 0,25$) (Tabla 9). Además, se encontró una asociación baja y negativa entre el nivel de infección por varroa tanto en abejas pecoreadoras como en nodrizas, y la carga viral del virus BQCV ($r_s = -0,24$ y $r_s = -0,30$ respectivamente).

Por otra parte se analizó una posible asociación entre la carga de los patógenos antes mencionados y los parámetros de fortaleza de la colmena en estudio (cantidad de población adulta, cantidad de cría y reservas de miel). Sólo se encontró una relación negativa y significativa entre la cantidad de población adulta y la carga viral del virus DWV. La intensidad de esta asociación fue débil a baja ($r_s = -0,25$). El resto de los coeficientes de asociación y sus " p " se muestran en la tabla 10.

Tabla 8- Evaluación de la independencia y asociación entre la presencia de dos patógenos. Se utilizó por un lado el test estadístico de χ^2 y χ^2 con la corrección de Yates, la significancia se estableció si $p < 0,05$. Por otro lado se aplicó el test estadístico de *Odds ratio* (ORs). Cuando el intervalo de confianza del ORs incluyó valores menores a 1, el ORs fue no significativo. En la tabla se indica como indeterminados (ind), los ORs o IC que no pudieron ser determinados por cuestiones matemáticas.

Interacción analizada	Chi² p valor	Odds Ratio (IC 95%)
<i>P. larvae</i> – varroa nod	0,94 (Chi ² corr. Yates)	0,29 (0,02 - 4,76)
<i>P. larvae</i> – <i>N. ceranae</i>	0,68 (Chi ² corr. Yates)	0 (ind)
<i>P. larvae</i> – ABPV	0,68 (Chi ² corr. Yates)	0 (ind)
<i>P. larvae</i> – BQCV	0,52 (Chi ² corr. Yates)	ind
<i>P. larvae</i> – DWV	0,14 (Chi ² corr. Yates)	ind
<i>P. larvae</i> – SBV	0,85 (Chi ² corr. Yates)	ind
varroa nod – <i>N. ceranae</i>	0,81 (Chi ²)	1,18 (0,30 - 4,58)
varroa nod – ABPV	0,27 (Chi ²)	0,51 (0,16 - 1,69)
varroa nod – BQCV	0,73 (Chi ²)	0,75 (0,15 - 3,75)
varroa nod – DWV	0,38 (Chi ²)	1,64 (0,55 - 4,91)
varroa nod – SBV	0,75 (Chi ²)	0,83 (0,27 - 2,59)
<i>N. ceranae</i> – ABPV	0,35 (Chi ²)	0,38 (0,05 - 3,11)
<i>N. ceranae</i> – BQCV	0,59 (Chi ²)	1,79 (0,21 - 5,15)
<i>N. ceranae</i> – DWV	0,82 (Chi ²)	0,87 (0,21 - 5,15)
<i>N. ceranae</i> – SBV	0,95 (Chi ²)	1,04 (0,26 - 4,11)
ABPV – BQCV	0,59 (Chi ²)	1,79 (0,21 - 15,15)
ABPV – DWV	0,11 (Chi ²)	2,47 (0,81 - 7,58)
ABPV – SBV	0,44 (Chi ²)	1,64 (0,46 - 5,80)
BQCV – DWV	0,36 (Chi ²)	0,45 (0,13 - 1,60)
BQCV – SBV	0,36 (Chi ²)	2,60 (0,31 - 21,61)
DWV – SBV	0,08 (Chi ²)	2,42 (0,88 - 6,64)

Tabla 9- Evaluación de la fuerza de asociación entre los niveles de infección o infestación de los distintos patógenos cuantificados. Para ello se utilizó el test no paramétrico Correlación de rangos de Spearman. A continuación se presentan en la parte coloreada los coeficientes de asociación (r_s) encontrados. En la parte inferior no coloreada se indican los valores de p para cada asociación. El nivel de significancia se estableció en $p < 0,05$.

Coef. Spearman (r_s) p valor	Varroa nod	Varroa pec	<i>P. larvae</i>	ABPV	BQCV	DWV	SBV
Varroa nod	*	0,85	-0,01	-0,11	-0,30	0,39	-0,03
Varroa pec	p<0,001	*	0,07	-0,08	-0,24	0,35	-0,09
<i>P. larvae</i>	0,90	0,51	*	0,11	0,01	0,25	-0,07
ABPV	0,27	0,43	0,26	*	-0,06	-0,01	-0,07
BQCV	p<0,01	p<0,05	0,89	0,55	*	-0,06	0,11
DWV	p<0,001	p<0,001	p<0,05	0,91	0,58	*	0,10
SBV	0,78	0,38	0,49	0,45	0,27	0,32	*

Tabla 10- Evaluación de la fuerza de asociación entre el nivel de infección o infestación de los patógenos cuantificados y los parámetros de la colmena: cantidad de población adulta, de cría y de miel. Para ello se utilizó el test no paramétrico Correlación de rangos de Spearman. El nivel de significancia se estableció en $p < 0,05$.

Interacción analizada	Coefficiente de Spearman (r_s)	p valor
varroa nod – Pob. adulta	-0,03	0,77
varroa nod – Cantidad cría	-0,06	0,54
varroa nod – Reservas miel	0,09	0,39
<i>P. larvae</i> – Pob. adulta	0,04	0,68
<i>P. larvae</i> – Cantidad cría	-0,09	0,36
<i>P. larvae</i> – Reservas miel	0,03	0,75
ABPV – Pob. adulta	-0,09	0,35
ABPV – Cantidad cría	-0,04	0,68
ABPV – Reservas miel	-0,12	0,24
BQCV – Pob. adulta	0,03	0,76
BQCV – Cantidad cría	0,16	0,11
BQCV – Reservas miel	-0,11	0,25
DWV – Pob. adulta	-0,25	p < 0,05
DWV – Cantidad cría	-0,01	0,94
DWV – Reservas miel	-0,08	0,42
SBV – Pob. adulta	-0,02	0,86
SBV – Cantidad cría	0,05	0,64
SBV – Reservas miel	0,13	0,20

Debido que no se cuantificó el nivel de infestación de *N. ceranae*, este patógeno no pudo ser incluido en los análisis de correlaciones antes mencionados. En cambio se analizó si había diferencias en la distribución de los otros patógenos entre las muestras que resultaron positivas y negativas para *N. ceranae*. También se comparó si había una distribución diferencial en cuanto a los parámetros de la colmena: Población adulta, cantidad de cría y cantidad de miel. Ninguna de las variables analizadas presentó diferencias significativas entre las colmenas infectadas y no infectadas. En la tabla 11 se muestran los valores de “p” obtenidos mediante el test no paramétrico Mann – Whitney.

Tabla 11- Distribución de parámetros de la colmena y de patógenos entre colonias con y sin *N. ceranae*. También se evaluó posibles diferencias en los parámetros de la colmena entre muestras con y sin *N. ceranae*. Los dos grupos de colonias se compararon utilizando el test no paramétrico Mann – Whitney. En la tabla se muestran los valores de p hallados, el nivel de significancia se estableció en $p < 0,05$.

Mann – Whitney (p valor)	Población adulta	Cría	Miel	varroa nod	<i>P. larvae</i>	ABPV	BQCV	DWV	SBV
<i>N. ceranae</i>	0,81	0,45	0,30	0,36	0,57	0,18	0,87	0,90	0,94

6.9. Relación entre la presencia de diferentes patógenos y la expresión de genes de la inmunidad en abejas.

A partir de los resultados obtenidos en la primera parte de este trabajo se seleccionaron y formaron dos grupos de colmenas con el fin de evaluar si la presencia de patógenos afectaba la expresión de genes de la inmunidad en las abejas. Tal como se mencionó en la sección 5.7 de Materiales y métodos se formó un grupo de colmenas con baja carga de patógenos (n=8) y otro con alta carga de patógenos (n=11).

Se realizaron nuevas extracciones de ARNm, se retrotranscribió a ADNc y se amplificaron los genes de referencia (β actina y RPS5) así como los genes relacionados con la inmunidad (abaecina, defensina, himenoptecina, vitelogenina, lisozima, profenol oxidasa, glucosa deshidrogenasa). Las curvas de amplificación y disociación de las muestras analizadas se muestran en el Anexo II. Los resultados obtenidos se procesaron de acuerdo a lo descrito por Pfaffl (2001), permitiendo la obtención de valores de expresión relativa del ARNm (Anexo III). Se utilizó el test paramétrico test t de Student para comparar la expresión de estos genes en ambos grupos. En la figura 21 se muestran los resultados así como los valores de significancia obtenidos. La expresión de ninguno de los genes estudiados presentó diferencias significativas entre el grupo con baja carga de patógenos y el grupo con alta carga.

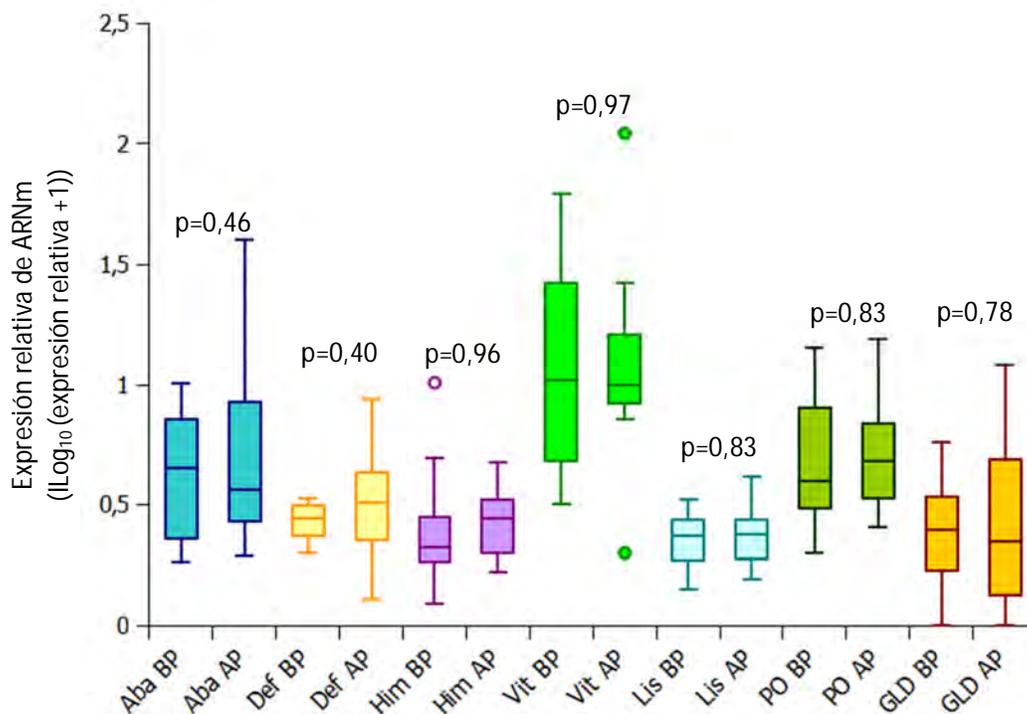


Figura 21- Expresión relativa del ARNm de los genes relacionados con al inmunidad en las abejas de los grupos con baja carga de patógenos (BP) y con alta carga de patógenos (AP). De izquierda a derecha abaecina, defensina, himenoptecina, vitelogenina, lisozima, pro fenol oxidasa y glucosa deshidrogenasa. Se comparó si había diferencias en los niveles de expresión utilizando el test paramétrico test de t de Student. Los valores de "p" obtenidos se encuentran en el gráfico. Los valores graficados corresponden al logaritmo de la expresión relativa del ARNm, el nivel de significancia se estableció en $p < 0,05$. Las cajas del gráfico muestran la dispersión intercuartil de los datos (contiene el 50% central de los datos de la distribución). En el interior del rectángulo se marca la posición de la mediana.

7. Discusión

Este estudio constituye la primera aproximación epidemiológica en nuestro país que aborda el estudio simultáneo de los principales patógenos de relevancia apícola. Estudios anteriores realizados en Uruguay permitieron detectar diferentes patógenos en determinadas zonas del país Antúnez *et al.*, 2004; 2005; 2006; Invernizzi *et al.*, 2009; 2011a). Este trabajo, a diferencia de los anteriores, se basó en la obtención de muestras de todo el país, representativas de la densidad de colmenas por departamento. La evaluación de la prevalencia y la distribución de los patógenos a partir de muestras tomadas al azar y de forma representativa de todo el país, permite establecer patrones de distribución geográfica y de co-infección de patógenos.

Durante este trabajo, se obtuvo también información sobre los parámetros de fortaleza de las colmenas muestreadas (población adulta, cría y cantidad de miel), así como acerca del manejo de la colmena. Esta información nos permitió analizar el efecto potencial de los patógenos en estos parámetros. En una segunda parte se analizó el impacto de los patógenos en la inmunidad de las abejas.

La información obtenida en este estudio es de gran importancia para el sector apícola uruguayo y sienta antecedentes sustanciales para futuros trabajos epidemiológicos en nuestro país y para el diseño de estrategias de control y prevención de los patógenos estudiados.

Es importante mencionar que existen pocos trabajos epidemiológicos de estas características en zonas geográficas donde no se hayan reportado episodios de despoblación masiva de colmenas (Neumann & Carrick, 2009; vanEngelsdorp & Meixner 2010). La información obtenida en este trabajo podría permitir la comparación de estos resultados, con otros países con casos de despoblación y colaborar en la dilucidación de este grave problema. A la vez, son escasos los trabajos que involucran el estudio de patógenos en abejas africanizadas. En este caso, y de acuerdo a estudios recientes realizados con las mismas muestras, se encontró que la mayoría de las colmenas se encuentran africanizadas (cerca del 80 %) (Branchiccela *et al.*, datos no publicados).

En primer lugar se procesó la información obtenida del relevamiento de parámetros que se realizó para cada colmena muestreada, se así como información acerca del manejo de la colmena. Uno de los primeros parámetros en ser analizados fue la fortaleza de la colmena. El parámetro cantidad de población adulta medida previo a la invernada de 2011 fue auspicioso, ya que la mayoría de las colmenas analizadas presentaron poblaciones superiores al mínimo recomendado para una buena invernada en Uruguay (10 cuadros cubiertos de abejas o aproximadamente 17600 individuos) (J. Harriet & J. Campá, comunicación personal). Esto indica que la mayoría de las colmenas que formaron parte de este trabajo, fueron colmenas “fuertes”, con alta probabilidad de sobrevivir la invernada.

Uno de los primeros patógenos que se analizó fue el ácaro *V. destructor*. En este estudio se corroboró que el mismo se encontraba ampliamente distribuido en el país, no detectando departamentos libres de *V. destructor*. Este ácaro se ha posicionado como el patógeno de mayor importancia para la apicultura y diversos trabajos señalan su papel en las pérdidas invernales de colmenas, en especial cuando no se aplican los tratamientos adecuados (Garrido-Bailón, 2012; Genersch *et al.*, 2010; Tentcheva *et al.*, 2004).

El nivel de infestación encontrado en las colmenas uruguayas fue relativamente elevado, considerando que valores tan bajos como de 4 a 7 varroas cada 100 abejas pueden provocar daños irreversibles en las colmenas si no son tratadas (Genersch *et al.*, 2010; Liebig, 2001; Rennich *et al.*, 2011). En Uruguay se recomienda el tratamiento inmediato previo a la invernada si los niveles de infestación en abejas nodrizas son mayores a 5 varroas cada 100 abejas (Bounous & Boga, 2005). Nuestro estudio coincide con el período de mayor infestación en el año y fue realizado en esa fecha con el fin de poder observar los valores previos a la aplicación de acaricidas (Antúnez *et al.*, 2013b). Los resultados obtenidos confirman la necesidad del tratamiento contra varroa previo a la invernada, con el fin de disminuir su nivel de infestación. Esto es sumamente importante, en vista que un porcentaje no menor de apicultores (17,5%) declaró no haber realizado tratamiento contra *V. destructor* durante el año anterior. Dado que en este trabajo no se recolectó información acerca de la edad de la reina de

la colmena muestreada ni se realizó seguimiento de las mismas luego de la invernada, no se pudo evaluar la pérdida de colmenas debidas a varroasis.

En la actualidad, se encuentran habilitados por el MGAP cuatro acaricidas de síntesis (Fluvalinato, Flumetrina; Amitraz; Cumafos) y tres acaricidas orgánicos (Ácido oxálico, Timol y Timol combinado con otros compuestos orgánicos) para su uso como tratamiento contra *V. destructor*.

De acuerdo a la encuesta realizada, el amitraz fue el acaricida más utilizado durante el año previo al muestreo. Esto coincide con que anualmente las autoridades recomiendan el uso de un acaricida de síntesis para el tratamiento pre invernada. Trabajos de Mendoza & Ramallo (2007) mostraron que este acaricida era muy efectivo contra *V. destructor* tanto en el norte (Salto), como el en sur-oeste (Colonia) del país. Es importante realizar ensayos de campo que confirmen la efectividad de los acaricidas de síntesis, dado que diversos estudios han mostrado que *V. destructor* ha adquirido resistencia frente a ciertos compuestos (Elzen *et al.*, 2000; Maggi *et al.*, 2009; 2010; Mathieu & Faucon, 2000). En nuestro país ya se ha observado resistencia frente al fluvalinato y el cumafós (DILAVE, 2009; Maggi *et al.*, 2011; Mendoza & Ramallo, 2007). Esto reduce el espectro de moléculas disponibles contra este ácaro. Es por esto que es sumamente importante, en vista del riesgo de adquisición de nuevas resistencias, seguir las recomendaciones del MGAP, que consisten en rotar el uso de acaricidas, aplicar las cantidades adecuadas y chequear la eficacia del tratamiento aplicado (DILAVE, 2009).

Además de *V. destructor*, otro ácaro parásito de las abejas melíferas es *A. woodi*, este ácaro es el causante de la acariosis. Esta enfermedad ha sido poco estudiada, en parte debido a que la misma no presenta una sintomatología clara y también a que el método tradicional de detección es muy laborioso y necesita de personal muy experimentado (J. Harriet & J. Campá, comunicación personal). Diversos autores han desarrollado exitosamente técnicas moleculares de detección de *A. woodi* (Evans *et al.*, 2007; Garrido-Bailón *et al.*, 2012; Kojima *et al.*, 2011). En España utilizando técnicas moleculares, se detectó una prevalencia nacional mayor a la esperada de ese ácaro (entre 10 y 15%) (Garrido-Bailón *et al.*, 2012). En Uruguay se realizaron dos estudios que involucraron este ácaro. Uno de ellos evaluó la presencia de *A. woodi* utilizando

muestras de abejas provenientes de zonas con historial de acariosis. Este trabajo realizó la detección del ácaro usando la técnica clásica de observación de tráqueas, no detectándose muestras positivas. Esto podría indicar una prevalencia extremadamente baja, por debajo del nivel de detección del muestreo o una ausencia del patógeno (Villalba, 2012). Sin embargo, en otro estudio que implicó el monitoreo estacional de dos apiarios utilizando técnicas moleculares se logró detectar la presencia de *A. woodi*, pero con una prevalencia muy baja, entre 1 y 2,7% (Antúnez *et al.*, 2013b).

En vista de los antecedentes recién mencionados, se intentó poner a punto la técnica de extracción de ADNg y amplificación del ácaro, a partir de abejas con acariosis detectada por métodos tradicionales. Sin embargo a pesar que se ensayaron dos técnicas de extracción distintas y se realizaron modificaciones al protocolo de PCR, no fue posible detectar *A. woodi*. Sería necesario evaluar otros métodos de extracción y/o ensayar otros *primers* que se puedan adaptar al uso con grandes cantidades de muestras.

Otro de los patógenos de importancia apícola es *P. larvae*, agente causal de la Loque americana, una bacteria que tuvo un gran impacto negativo en la apicultura uruguaya al principio de la década pasada, debido a su alta patogenicidad, fácil propagación y pérdidas económicas al causar muerte de la colmena. Este trabajo mostró que en la actualidad *P. larvae* tiene una prevalencia muy baja (2%), lo cual es sensiblemente menor a lo observado en 2001 (51%) (Antúnez *et al.*, 2004). Ambos trabajos se basaron en la detección y cuantificación de esporas en miel. Si bien este dato no es un indicador de la enfermedad propiamente dicha, da una idea de la potencialidad de la misma (Lindstrom *et al.*, 2008), ya que las esporas de esta bacteria permanecen viables durante años y son muy resistentes a la desecación (Dobbelaere *et al.*, 2001; Hansen & Brødsgaard, 1999). Cabe mencionar que ninguna de las dos colonias en las que se confirmó la presencia de esporas de *P. larve* en miel presentaba síntomas de Loque americana. Estos resultados coinciden con una disminución paulatina de la incidencia anual de Loque americana desde el 2001 a la fecha (Harriet & Campá, 2012).

Los aislamientos hallados de *P. larvae* en el presente trabajo pertenecieron al genotipo ERIC I-BOX A, genotipo también encontrado circulando en el 2001 (Antúnez *et al.*, 2007). Este genotipo posee amplia distribución a nivel mundial (Alippi *et al.*, 2004). Es

importante destacar que existen otros genotipos de *P. larvae* y que se han reportado diferencias en la virulencia de los mismos (Forsgren *et al.*, 2008; Genersch *et al.*, 2006; 2005; Rauch *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la aplicación de las medidas de control contra *P. larvae* recomendadas por el MGAP ha surtido el efecto esperado. Sin embargo, el agente causal no ha sido erradicado por lo que es necesario continuar controlando la enfermedad y evitar el ingreso de variantes de *P. larvae* potencialmente más virulentas.

En cuanto a los microsporidios patógenos de abejas, *N. ceranae* y *N. apis* han sido objeto de numerosos estudios, en especial a partir del hallazgo de *N. ceranae* (parásito originario de la abeja asiática *A. cerana*) infectando la abeja europea *A. mellifera* (Higes *et al.*, 2008; 2006; Huang *et al.*, 2007). La aparición de *N. ceranae* en las abejas melíferas fue considerado como uno de los factores causantes de los episodios de despoblación masiva de colmenas en España y se desarrollaron diversos estudios para conocer la presencia e impacto de este microsporido en diferentes países (Cox-Foster *et al.*, 2007; Genersch *et al.*, 2010; Higes *et al.*, 2008; Martín-Hernández *et al.*, 2011).

En este trabajo se logró poner a punto la técnica de detección de *N. ceranae* y *N. apis* de PCR múltiple diseñado por Martín-Hernández *et al.*, (2007). Este método de detección es uno de los recomendados por la OIE y el "COLOSS BEEBOOK – Standard Methods for *Apis mellifera* research" (Fries *et al.*, 2013; OIE, 2012), en parte porque es una técnica sensible, sencilla y rápida, y permite en un mismo procedimiento detectar la presencia de los microsporidios y diferenciar las especies presentes (Fries *et al.*, 2013; OIE, 2012). En Uruguay la técnica de rutina para la detección de *Nosema* spp. es la observación y conteo de esporas al microscopio, a partir de un homogeneizado de abejas. La dificultad de esta técnica es que el operador precisa de un importante entrenamiento para lograr diferenciar entre las esporas de ambos microsporidios, en especial en los casos de infecciones mixtas y dificulta el procesamiento de grandes cantidades de muestra.

Una de las observaciones más importantes de este trabajo fue que solo se detectó la presencia de *N. ceranae*, no detectándose muestras positivas para *N. apis*. En nuestro país, como se mencionó anteriormente, solo se realizaba el análisis del conteo de

esporas, sin determinar especie ya que se asumía que el único microsporidio presente aquí era *N. apis* (Mendoza, 2012). El aparente reemplazo total de *N. apis* por *N. ceranae* ya había sido sugerido en Uruguay (Invernizzi *et al.*, 2009). Este reemplazo ha sido observado también en otros países como Argentina, EEUU, España, Francia, Chile, China, Japón y Taiwán (Chauzat *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009; Martín-Hernández *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2012; Medici *et al.*, 2012; Traver & Fell, 2011). Esto podría deberse a una mayor virulencia de *N. ceranae* con respecto a *N. apis* en las abejas melíferas, aunque este punto es controvertido (Forsgren & Fries, 2010; Fries, 2010; Paxton, 2010).

La prevalencia de *N. ceranae* hallada en nuestro trabajo es relativamente baja (15%) en comparación con el 30% reportado por el DILAVE- MGAP (J. Harriet, comunicación personal). Esto puede deberse por un lado a que la toma de muestras se realizó a fines de verano y principio de otoño, época que no se corresponde con la de mayor incidencia de *N. ceranae* (Antúnez *et al.*, 2013b). Estudios realizados a nivel de apiario mostraron que durante esta época del año la prevalencia en un apiario era del orden del 10% (Antúnez *et al.*, 2013b). Por otra parte, las muestras de este trabajo provinieron de apiarios que eran fijos y por ende no practicaban la trashumancia. El traslado de colmenas o trashumancia es una práctica que busca mejorar el rendimiento de miel, a través del traslado de colmenas a regiones con ofertas polínicas y nectaríferas (Invernizzi *et al.*, 2011b). En los últimos años en Uruguay ha aumentado el número de apicultores que mueven sus colmenas, en especial hacia las forestaciones de *Eucalyptus grandis*, en busca de mejores rendimientos y extender la temporada apícola. Se ha reportado que esta práctica favorece la aparición de *N. ceranae* y que si las colmenas no se retiran a tiempo de las plantaciones, colapsan a causa de este microsporidio (Mendoza, 2012).

Los departamentos en donde se detectó *N. ceranae* (Rivera, Colonia, Durazno, Florida, Soriano, Salto, Paysandú, Río Negro y Tacuarembó), coinciden con las áreas de mayor densidad de forestaciones de *E. grandis* del país (Dirección General Forestal MGAP – FAO, 2010). Esto podría confirmar lo comunicado por Mendoza (2012), quien observó que las colmenas que invernan en las forestaciones de *E. grandis* son más propensas a infectarse con *Nosema* spp. La baja prevalencia hallada en este trabajo no cuestiona el

papel que tiene *N. ceranae* en la apicultura uruguaya como enfermedad emergente, en particular considerando las nuevas formas de producción.

El último grupo de patógenos de importancia apícola son los virus ARN. Su estudio ha cobrado relevancia durante los últimos años, en parte debido a que han sido señalados como factores importantes en el desarrollo del síndrome de despoblación masiva de colmenas (CCD por sus siglas en inglés) (vanEngelsdorp & Meixner, 2010; Oldroyd, 2007). Por otro lado, el desarrollo de técnicas moleculares más sensibles, y de fácil aplicación en estudios a gran escala ha permitido su detección en diferentes países. Trabajos anteriores han reportado las prevalencias virales en base a muestras tomadas en distintas épocas del año. Es importante tener esto en cuenta en vista que se ha observado, tanto para virus como para otros patógenos, que muchos presentan una marcada estacionalidad (Antúnez *et al.*, 2013b; Dainat *et al.*, 2012; Rennich *et al.*, 2012; Tentcheva *et al.*, 2004).

En este trabajo se logró poner a punto la técnica de detección y cuantificación por qPCR para cuatro de los siete virus en estudio (ABPV, BQCV, DWV, SBV). El virus CBPV no pudo ser amplificado a pesar de que se ensayaron diversos juegos de *primers*. La presencia de este virus en nuestro país ya ha sido confirmada y es frecuente observar abejas con la sintomatología característica del virus CBPV previo a la invernada (Antúnez *et al.* 2006; 2005; C. Invernizzi, comunicación personal). La alta variabilidad existente entre las secuencias genómicas de cepas del virus obtenidas en Europa (en base a las cuales se diseñaron los *primers*) y de Sudamérica (Blanchard *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2008) podría explicar el fallo en la detección.

En cuanto al virus de las celdas reales negras (BQCV), fue el patógeno más prevalente ya que cerca del 90 % de las colmenas analizadas se encontraban infectadas. Estos valores están en concordancia con lo reportado anteriormente en Uruguay por Antúnez *et al.*, (2006) y Antúnez *et al.*, (2013b). La prevalencia de este virus es en general alta, fluctuando entre 50 y 90 % en diferentes países (Forgach *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2011; Rennich *et al.*, 2012; Tentcheva *et al.*, 2004), excepto en Brasil (30%) y España (10%) (Teixeira *et al.*, 2008; Antúnez *et al.* 2012). Teixeira *et al.*, (2008) proponen que la baja prevalencia de este virus en Brasil se debe a los bajos niveles de infestación con *V. destructor* que presentan las abejas africanizadas.

El resto de los virus hallados (ABPV, DWV, SBV), presentaron prevalencias menores y una distribución más acotada a las regiones con mayor densidad de colmenas. ABPV presentó una prevalencia similar a la hallada previamente en Uruguay (Antúnez *et al.*, 2006). DWV y SBV presentaron prevalencias de 19,4% y 7,6% respectivamente, mucho menores a las reportadas anteriormente, esto puede deberse a que el tamaño muestral utilizado por Antúnez *et al.* (2006) fue pequeño. Considerando la asociación reportada entre el virus de las alas deformadas y el ácaro *V. destructor*, esta prevalencia moderada (29%) fue llamativa; en especial si se observa la alta prevalencia de *V. destructor* (75%) (Boecking & Genersch, 2008; Yang & Cox-Foster, 2005). Sin embargo a nivel regional las prevalencias de este virus fueron similares: 14% (Chile) y 20% (Brasil) (Rodríguez *et al.*, 2012; Texeira *et al.*, 2008). Es importante mencionar que los factores climáticos, como regímenes de lluvia, temperatura, viento, tienen un fuerte impacto en la incidencia anual y estacional de los virus. Estos factores afectan no solo el comportamiento de la colmena sino también la oferta nectarífera y polínica. Se ha observado en diversos estudios longitudinales, una variación considerable anual y estacional en la incidencia de los virus (Antúnez *et al.*, 2012; 2013b; Dainat *et al.*, 2012; Genersch *et al.*, 2010; Rennich 2011; 2012, Tentcheva *et al.*, 2004).

Por otro lado, no se logró detectar la presencia del virus KBV, coincidiendo con lo reportado por Antúnez *et al.* (2006). De todos modos sería conveniente utilizar nuevos *primers* para futuras detecciones del virus, ya que se ha reportado que los *primers* diseñados por Stoltz *et al.* (1995), tendrían reactividad cruzada con el virus ABPV dando lugar a falsos positivos (de Miranda *et al.*, 2010). De todos modos, en nuestro trabajo y a pesar de que el virus ABPV se encuentra en nuestro país, no hubo muestras positivas para el virus KBV. En el caso del IAPV, este es el primer trabajo que buscó detectar su presencia en nuestro país, no encontrándose muestras positivas. Este virus ha sido asociado al síndrome de despoblación de colmenas, aunque es un punto en discusión (Chen & Evans, 2007; Cox-Foster *et al.*, 2007; Stokstad, 2007). Es importante destacar que la presencia de este virus ya ha sido reportada durante el 2009 y 2010 en Argentina, con una prevalencia relativamente alta (41%) (Reynaldi *et al.*, 2011).

Los análisis de asociación mostraron que *V. destructor* y DWV se encontraban correlacionados positivamente. Esta correlación ha sido ampliamente descrita en los

últimos años y se cree que justamente *V. destructor* es el responsable de dispersar y aumentar la prevalencia de diversos virus, en especial el DWV (Chantawannakul *et al.*, 2006; Chen & Siede, 2007, de Miranda & Genersch, 2010; Locke *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2012; Tentcheva *et al.*, 2004). Sin embargo, ha sido más recientemente que se han abordado las implicancias de esta asociación en la salud de la abeja; se ha observado que la presencia de *V. destructor* y el virus DWV genera mayores daños en las abejas que la presencia aislada de los mismos (Möckel *et al.*, 2010; Yang & Cox-Foster, 2007; 2005). A nivel de colonia, la presencia conjunta de estos patógenos tendría un rol importante en las grandes pérdidas invernales observadas en el hemisferio norte (Dainat *et al.*, 2012; 2013; Genersch *et al.*, 2010). Dainat & Neumann (2013) reportaron que el riesgo de muerte en el invierno en presencia de estos dos patógenos se ve aumentado cuando la colmena es pequeña del punto de vista poblacional (Dainat & Neumann, 2013; vanEngelsdorp *et al.*, 2009). Si bien en el presente trabajo no se estudió si las colmenas monitoreadas finalmente colapsaban, sí se observó que las colmenas con poblaciones más pequeñas presentaban significativamente mayores títulos de virus DWV.

Las asociaciones significativas halladas en este trabajo fueron débiles o moderadas, a diferencia de lo observado por otros autores que reportaron asociaciones fuertes entre el virus DWV y *V. destructor* (Dainat & Neumann, 2013; Dainat *et al.*, 2012). Esto y el hecho que no se encontraran ORs significativos, puede deberse a que este estudio fue realizado en colmenas al azar, sin sesgos de sintomatología.

La asociación entre la carga viral DWV y el número de esporas en miel *P. larvae*, es un resultado interesante que debería ser analizado en profundidad en futuros estudios, ya que aunque resultó significativa, se construyó con un bajo número de casos positivos de la bacteria. De todas formas ya se ha reportado que la inyección con bacterias en abejas puede aumentar la replicación viral (Yang & Cox-Foster, 2005).

Otro resultado interesante es una baja pero significativa asociación negativa entre el virus BQCV y el ácaro *V. destructor* (Chen & Siede, 2007). No se ha confirmado que este virus sea transmitido por *V. destructor* aunque se ha detectado su presencia en el ácaro (Chantawannakul *et al.*, 2006). La presencia del virus parece ser independiente de *V. destructor*, ya que el tratamiento con acaricidas no afecta su prevalencia, al contrario de lo que sucede con el virus DWV (Antúnez *et al.*, 2013b; Locke *et al.*, 2012).

Debido a que la asociación observada es débil, sería necesario realizar más estudios con el fin de confirmar o descartar esta asociación.

La presencia de esporas de *N. ceranae* no tuvo un impacto en la presencia o ausencia de los otros patógenos en estudio. Quizás sería importante realizar estudios cuantificando la proporción de abejas infectadas, ya que se ha visto que esto es un mejor indicador de la nosemosis que el conteo de esporas (Botías *et al.*, 2012).

La segunda parte de este trabajo tuvo como objetivo evaluar si la presencia y coexistencia de diferentes patógenos tenían un efecto en la inmunidad de las abejas. A diferencia de trabajos anteriores que analizaban la inmunidad de forma individual, se decidió aplicar la técnica descrita por Dainat *et al.* (2012). En la misma los análisis se realizan a partir de un *pool* de abejas y ha permitido poner de manifiesto diferencias en la expresión de genes de la inmunidad. Esta técnica disminuye el tiempo de trabajo, permite disminuir costos y se pueden utilizar muestras tomadas a campo, sujetas a una correcta preservación.

No se logró observar diferencias en los patrones de expresión de genes vinculados a la inmunidad entre el grupo de abejas con baja carga de patógenos (sólo infectadas con BQCV) y el grupo con alta carga de patógenos (*V. destructor*, *N. ceranae* y más de un virus. Se ha reportado que tanto el ácaro *V. destructor* como el microsporidio *N. ceranae* son capaces de deprimir la respuesta inmune de *A. mellifera* (Antúnez *et al.*, 2009; Chaimanee *et al.*, 2012; Yang & Cox-Foster, 2005). Estos resultados sugieren que estos patógenos podrían ser capaces de evadir la respuesta inmune.

Recientemente se ha reportado que existen umbrales de daño, según el nivel de infección del patógeno (Möckel *et al.*, 2010; Liebig, 2010). Sería interesante conocer si estos umbrales de daño tienen incidencia en la expresión de los genes de la inmunidad en las abejas melíferas.

Otro punto interesante, pero no abordado en profundidad en este trabajo es el origen racial de las abejas en estudio. La mayoría de los trabajos en inmunidad de abejas, son realizados usando abejas europeas. Sin embargo, gran parte de las abejas en Uruguay y América Latina está africanizada (Branchiccela *et al.*, datos no publicados; Burgett *et al.*, 1995; Collet *et al.*, 2006; Scott-Schneider *et al.*, 2004). Si bien no se conocen trabajos hasta el momento que estudien la respuesta inmune frente a las infecciones

según el origen racial o subespecie de *A. mellifera*, se ha visto que abejas de distintas especies presentan respuestas inmunes diferentes frente a un mismo patógeno (Chaimanee *et al.*, 2013), por lo cual sería importante estudiar más en profundidad este tema.

La mayoría de los patógenos que son considerados de importancia para la apicultura a nivel mundial han sido detectados en nuestro país. Las múltiples infecciones encontradas ponen énfasis en el delicado equilibrio de salud en la que se encuentran nuestras abejas. Es por esto que es importante continuar con el estudio de los patógenos y realizar esfuerzos para su control de forma racional y planificada.

8. Conclusiones

La mayoría de los patógenos de importancia para la apicultura se encuentran presentes en nuestro país.

V. destructor se posiciona como uno de los patógenos de mayor relevancia en Uruguay. Esto confirma la necesidad de controlar adecuadamente y de forma racional el ácaro *V. destructor*, el cual puede ser la vía de entrada de otros patógenos como los virus.

Los virus, con excepción del BQCV que está ampliamente distribuido, se concentraron en la región oeste y litoral oeste del país, en coincidencia con las regiones de mayor densidad apícola del Uruguay.

N. ceranae es un patógeno que no parece tener la misma prevalencia y relevancia que en otros países como España, al menos en el contexto productivo de apiarios estacionarios, estudiados en este trabajo.

P. larvae, una bacteria de gran prevalencia e impacto económico al principio de la década pasada, ha disminuido drásticamente su prevalencia. Esto pone de manifiesto que las medidas aplicadas para su control han sido efectivas.

Se reafirmó la asociación positiva reportada entre el virus de las alas deformadas (DWV) y el ácaro *V. destructor*.

Con respecto a la inmunidad, las abejas infectadas con alta carga de patógenos, no presentaron diferencias en la expresión de genes vinculados a la inmunidad respecto al grupo de abejas con baja carga de patógenos. Esto sugiere que estos patógenos podrían ser capaces de evadir la respuesta inmune.

9. Perspectivas

A partir de los resultados del presente trabajo, se plantean nuevas perspectivas:

Realizar un nuevo estudio de similares características que incluya un seguimiento de las colmenas post invernada. De forma de evaluar nuevamente la prevalencia y poder estudiar el impacto de la carga de patógenos en la supervivencia de la colmena.

Estudiar los haplotipos circulantes de *V. destructor* con el fin de conocer la diversidad en Uruguay, ya que se sabe que hay diferencias en la virulencia de los mismos.

Evaluar el nivel de daño irreversible de *V. destructor* en colmenas de nuestro país.

Estudiar en condiciones de laboratorio la respuesta inmune de las abejas africanizadas frente a patógenos como *V. destructor*, *N. ceranae* y los virus.

10. Bibliografía

Abrol, D.P., 2012. Pollination Biology, Biodiversity Conservation and Agricultural Production. DOI: 10.1007/978-94-007-1942-2. Ed Springer Netherlands.

Aizen, M.A., Garibaldi, L.A., Cunningham, S.A., Klein, A.M., 2008. Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency. *Curr. Biol.* 18: 1572-1575.

Alippi, A.M., Reynaldi, F.J., Lopez, A.C., De Giusti, M.R., Aguilar, O.M., 2004. Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae larvae* and incidence of American foulbrood in Argentinean honeys from Buenos Aires province. *J. Api. Res.* 43: 135-143.

Allen, M.F. & Ball, B.V., 1996. The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World* 77: 141-162.

Amdam, G.V., Norberg, K., Hagen, A., Omholt, S.W., 2003. Social exploitation of vitellogenin. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.* 100: 1799-1802.

Amdam, G.V., Simões, Z.L., Hagen, A., Norberg, K., Schrøder, K., Mikkelsen, Ø., Kirkwood, T.B.L., Omholt, S.W., 2004. Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Exp. Gerontol.* 39: 767-773.

Amdam, G.V., Aase, A.L.T., Seehuus, S.C., Kim Fondrk, M., Norberg, K., Hartfelder, K., 2005. Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Exp. Gerontol.* 40: 939-947.

Anderson, D.L. & Gibbs, A.J., 1988. Inapparent virus infections and their interactions in pupae of honey bee (*Apis mellifera Linnaeus*) in Australia. *J. Gen. Virol.* 69: 1617–1625.

Antúnez, K., D'Alessandro, B., Piccini, C., Corbella, E., Zunino, P., 2004. *Paenibacillus larvae larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey. *J. Invertebr. Pathol.* 86: 56-58.

Antúñez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E., Zunino, P., 2005. Detection of chronic bee paralysis virus and acute bee paralysis virus in Uruguayan honeybees. *J. Invertebr. Pathol.* 90: 69-72.

Antúñez, K., D'Alessandro, B., Piccini, C., Corbella, E., Zunino, P., 2006. Honeybee viruses in Uruguay. *J. Invertebr. Pathol.* 93: 67-70.

Antúñez, K., Piccini, C., Castro-Sowinski, S., Rosado, A.S., Seldin, L., Zunino, P., 2007. Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus larvae* isolates. *Vet. Microbiol.* 124: 178-183.

Antúñez, K., Anido, M., Schlapp, G., Evans, J.D., Zunino, P., 2009a. Characterization of secreted proteases of *Paenibacillus larvae*, potential virulence factors involved in honeybee larval infection. *J. Invertebr. Pathol.* 102: 129-32.

Antúñez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., Higes, M., 2009b. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Enviro. Microbiol.* 11: 2284-2290.

Antúñez, K., Anido, M., Evans, J. D., Zunino, P., 2010. Secreted and immunogenic proteins produced by the honeybee bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Vet. microbiol.* 141: 385-389.

Antúñez, K., Anido, M., Arredondo, D., Evans, J. D., Zunino, P., 2011a. *Paenibacillus larvae* enolase as a virulence factor in honeybee larvae infection. *Vet. microbiol.* 147: 83-89.

Antúñez, K., Arredondo, D., Anido, M., Zunino, P., 2011b. Metalloprotease production by *Paenibacillus larvae* during the infection of honeybee larvae. *Microbiology.* 157: 1474-1480.

Antúñez, K., Anido, M., Garrido-Bailón, E., Botías, C., Zunino, P., Martínez-Salvador, A., Martín-Hernández, R., Higes, M., 2012. Low prevalence of honeybee viruses in Spain during 2006 and 2007. *Res. Vet. Sci.* 93: 1441-1445.

Antúnez, K., Mendoza, Y., Santos, E., Invernizzi, C., 2013a. Differential expression of vitellogenin in honeybees (*Apis mellifera*) with different degrees of *Nosema ceranae* infection. J. Api. Res. En prensa.

Antúnez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campá, J., Martin-Hernández, R., Higes, M., Zunino, P. 2013b. Despoblación de colmenas. Proyecto FPTA-258 Despoblación de colmenas: determinación de sus causas en Uruguay. Serie FPTA-INIA 41.

Anderson, D.L. & Trueman, J.W., 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. Exp. Appl. Acarol. 24: 165-189.

Ashida, M., & Brey, P., 1998. Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects. Brey, P.T., and Hultmark, D. (eds). London, UK: Chapman and Hall, pp. 135–172.

Bakonyi, T., Farkas, R., Szendroi, A., Dobos-Kovacs, M., Rusvai, M., 2002. Detection of acute bee paralysis virus by RT-PCR in honey bee and *Varroa destructor* field samples: rapid screening of representative Hungarian apiaries. Apidologie. 33: 63-74.

Bailey, L., & Lee, D.C., 1962. *Bacillus larvae*: its cultivation in vitro and its growth in vivo. J. Gen. Microbiol. 29: 711-717.

Blanchard, P., Ribière, M., Celle, O., Lallemand, P., Schurr, F., Olivier, V., Iscache, A.L., Faucon, J.P., 2007. Evaluation of a real-time two-step RT-PCR assay for quantitation of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome in experimentally-infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony. J. Virol. Methods. 141: 7-13.

Blanchard, P., Schurr, F., Olivier, V., Celle, O., Antúnez, K., Bakonyi, T., Berthoud, H., Haubruge, E., Higes, M., Kasprzak, S., Koeglberger, H., Krygeri, P., Thiérya, R., Ribière, M., 2009. Phylogenetic analysis of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and a predicted structural protein (pSP) of the Chronic bee paralysis virus (CBPV) isolated from various geographic regions. Virus Res. 144: 334-338.

- Boecking, O., & Genersch, E., 2008.** Varroosis - the Ongoing Crisis in Bee Keeping. J. Verbr. Lebensm. 3: 221-228.
- BroØdsgaard, C.J., Ritter, W., Hansen, H., 1998.** Response of in vitro reared honey bee larvae to various doses of *Paenibacillus larvae larvae* spores. Apidologie. 29: 569-578.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Meana, A., Higes, M., 2012.** Critical aspects of the *Nosema* spp. diagnostic sampling in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. Parasitol. Res. 110: 2557-61.
- Bounous, C., & Boga, V., 2005.** Fundamentos para el control de Varroa y Loque Americana. INIA, Boletín de divulgación nº 87.
- Burgett, M., Shorney, S., Cordara, J., Gardiol, G., Sheppard, W. S., 1995.** The present status of Africanized honey bees in Uruguay. Am. Bee J. 135: 328-330.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaek, M., Tempst, P., 1989.** Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. EMBO J. 8: 2387-2391.
- Casteels, P., Ampe, C., Riviere, L., Damme, J., Elicone, C., Fleming, M., Jacobs, F., Tempst, P., 1990.** Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). Eur. J. Biochem. 187: 381-386.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Tempst, P., 1993.** Functional and chemical of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). J. Biol. Chem. 268: 7044-7054.
- Casteels-Jonsson K., Zhang W., Capaci T., Casteels P., Tempst, P., 1994.** Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire posttranslational conversion of the precursor structures. J. Biol. Chem. 269: 28569-28575.
- Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y.P., Evans, J.D., Pettis, J.S., 2012.** Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. J. Insect. Physiol. doi: 10.1016/j.jinsphys.2012.04.016

- Chaimanee, V., Pettis, J. S., Chen, Y., Evans, J. D., Khongphinitbunjong, K., & Chantawannakul, P., 2013.** Susceptibility of four different honey bee species to *Nosema ceranae*. *Vet. Parasitol.* 193: 260–265.
- Chantawannakul, P., Ward, L., Boonham, N., Brown, M., 2006.** 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. *J. Invertebr. Pathol.* 91: 69-73.
- Chauzat, M.P., Higes, M., Martín-Hernández, R., Meana, A., Cougoule, N., Faucon, J. P., 2007.** Presence of *Nosema ceranae* in French honey bee colonies. *J. Api. Res.* 46: 127-128.
- Chen, Y.P., Pettis, J.S., Evans, J.D., Kramer, M., Feldlaufer, M.F., 2004a.** Molecular evidence for transmission of Kashmir bee virus in honey bee colonies by ectoparasitic mite, *Varroa destructor*. *Apidologie.* 35: 441-448.
- Chen, Y., Zhao, Y., Hammond, J., Hsu, H.T., Evans, J., Feldlaufer, M., 2004b.** Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. *J. Invertebr. Pathol.* 87: 84-93.
- Chen, Y.P., Evans, J.D., Feldlaufer, M., 2006a.** Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* 92, 152–159.
- Chen, Y.P., Pettis, J.S., Collins, A., Feldlaufer, M.F., 2006b.** Prevalence and transmission of honey bee viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 606–611.
- Chen, Y.P., & Siede, R., 2007.** Honey bee viruses. *Adv. Virus Res.* 70: 33-80.
- Chen, Y.P., Smith, B., Evans, J.D., Pettis, J.S., 2008.** *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J. Invertebr. Pathol.* 97: 86–188.
- Chen, Y., Evans, J., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., Litkowski, A.M., Pettis, J., 2009.** Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 101, 204–209.

Christophides, G.K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P.T., Collins, F.H., Danielli, A., Dimopoulos, G., Hetru, C., Hoa, N.T., Hoffmann, J.A., Kanzok, S.M., Letunic, I., Levashina, .EA., Loukeris, T.G., Lycett, G., Meister, S., Michel, K., Moita, L.F., Müller, H.M., Osta, M.A., Paskewitz, S.M., Reichhart, J.M., Rzhetsky, A., Troxler, L., Vernick, K.D., Vlachou, D., Volz, J., von Mering, C., Xu, J., Zheng, L., Bork, P., Kafatos, F.C., 2002. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science*. 298: 159-165.

Corona, M., Velarde, R., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K.A., Robinson, G.E., 2007. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signalling, and queen honey bee longevity. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A*. 104: 7128–7133.

Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.-L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., vanEngelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S., Lipkin, W.I., 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*. 318: 283-287.

Crailsheim, K. & Riessberger-Gallé, U., 2001. Honey bee age-dependent resistance against American foulbrood. *Apidologie*. 32: 91-103.

Collet, T., Ferreira, K.M., Arias, M.C., Soares, A.E.E., Del Lama, M.A., 2006. Genetic structure of Africanized honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI–COII patterns. *Heredity*. 97: 329-335.

Daffre, S., Kylsten, P., Samakovlis, C., Hultmark, D., 1994. The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Mol. Gen. Genet*. 242: 152-162.

Dainat, B., Evans, J. D., Chen, Y. P., Gauthier, L., & Neumann, P., 2012. Predictive markers of honey bee colony collapse. *PloS one*, 7: e32151.

DEFRA Department for Environment Food and Rural Affairs, 2007. Foulbrood disease of honey bees recognition and control. www.defra.gov.uk/hort/Bees/pdf/foulbrood.pdf.

De Graaf, D.C., Alippi, A.M., Antúnez, K., Aronstein, K.A., Budge, G., De Koker, D., De Smet, L., Dingman, D.W., Evans, J.D., Foster, L.J., Fünfhaus, A., García-González, E., Gregorc, A., Human, H., Murray, K.D., Nguyen, B.K., Poppinga, L., Spivak, M., vanEngelsdorp, D., Wilkins, S., Genersch, E., 2013. Standard methods for American foulbrood research. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume II: standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. J. Api. Res. 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.11>

de Miranda, J.R., Cordoni, G., Budge, G., 2010. The acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus complex. J. Invertebr. Pathol. 103, S30-S47.

Delaplane, K.S. & Mayer, D.F., 1999. Crop pollination by bees. Pp 1-6. Ed CABI publishing.

Delaplane, K.S, Van der Steen, J., Guzman, E., 2013. Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. Journal of Apicultural Research 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.03>

Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S.J., Anderson, D., Locke, B., Delaplane, K.S., Wauquiez, Q., Tannahill, C., Frey, E., Ziegelmann, B., Rosenkranz, P., Ellis, J.D., 2013. Standard methods for varroa research. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume II: standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. J. Apicult. Res. 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.09>

DILAVE, 2009. Pautas Sanitarias para manejar correctamente la varroasis. Campá, J., Harriet, J., Mendoza, Y. Cartilla n°5.

Dobbelaere, W., de Graaf, D.C., Reybroeck, W., Desmedí, E., Peeters, J.E., Jacobs, F.J., 2001. Disinfection of wooden structures contaminated with *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores. J. Appl. Microbiol. 91: 212-216.

Elzen, P.J., Baxter, J.R., Spivak, M., Wilson, W.I., 2000. Control of *Varroa jacobsoni* Oud. resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos. Apidologie, 31: 437-442.

Evans, J.D., 2006. Beepath: an ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *J. Invertebr. Pathol.* 93: 135-9.

Evans, J.D., Aronstein, K., Chen, Y. P., Hetru, C., Imler, J.L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G.J., Zou, Z., Hultmark, D., 2006. Immune pathways and defense mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect. Mol. Biol.* 15: 645-656.

Evans, J.D., Pettis, J.S., Smith, I.B., 2007. A diagnostic genetic test for the honey bee tracheal mite. *J. Apic. Res.* 46: 195–197.

Evans, J.D., & Spivak, M., 2010. Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 103: S62-S72.

FAO Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). FAOSTAT. <<http://faostat.fao.org>>.

Forgách, P., Bakonyi, T., Tapaszi, Z., Nowotny, N., Rusvai, M., 2008. Prevalence of pathogenic bee viruses in Hungarian apiaries: situation before joining the European Union. *J. Invertebr. Pathol.* 98: 235-238.

Forsgren, E., & Fries, I., 2010. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Vet. Parasitol.* 170: 212-217.

Forsgren, E., Stevanovic, J., Fries, I., 2008. Variability in germination and in temperature and storage resistance among *Paenibacillus larvae* genotypes. *Vet. Microbiol.* 129: 342-349.

Fries, I., 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 103: S73-S79.

Fries, I., Chauzat, M-P., Chen, Y-P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., Higes, M., McMachon, D.P., Martín-Hernández, R., Natsopoulou, M., Paxton, R.J., Tanner, G., Webster, T.C., Williams, G.R., 2013. Standard methods for nosema research. In V Dietemann; J D Ellis, P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard*

methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. J. Apicult. Res. 51:
<http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.14>

Fries, I., & Feng, F., 1995. Crossinfectivity of *Nosema apis* in *Apis mellifera* and *Apis cerana*. In: Proceedings of the Apimondia 34th International Apicultural Congress. Bucharest, Romania, pp. 151-155.

Fries, I., Feng, F., Silva, A.D., Slemenda, S.B., Pieniazek, N.J., 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). Eur. J. Protistol. 32: 356-365.

Gallai, N., Salles, J.M., Settele, J., Vaissière, B.E., 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. Ecol. Econ. 68: 810-821.

Garrido-Bailón, E., Bartolomé, C., Prieto, L., Botías, C., Martínez-Salvador, A., Meana, A., Martín-Hernández, R., Higes, M., 2012. The prevalence of *Acarapis woodi* in Spanish honey bee (*Apis mellifera*) colonies. Exp. Parasitol. 132: 530-536.

Genersch, E., Forsgren, E., Pentikäinen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J., Fries, I., 2006. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. Int. J. Syst. Evol. Microbio. 56: 501-11.

Genersch, E., Ashiralieva, A., Fries, I., 2005. Strain-and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees. App. Environ. Microb. 71: 7551-7555.

Genersch, E., 2010. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. J. Invertebr. Pathol. 103 (S1): S10-S19.

Genersch, E., von der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Büchler, R., Berg, S., Ritter, W., Mühlen, W., Gisder, S., Meixner, M., Liebig, G., Rosenkranz, P., 2010.

The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*, 41: 332-352.

Giersch, T., Berg, T., Galea, F., Hornitzky, M., 2009. *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia, *Apidologie*. 40: 117-123.

Gisder, S., Hedtke, K., Möckel, N., Frielitz, M. C., Linde, A., Genersch, E., 2010. Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 3032-3038.

Gregorc, A. & Bowen, I.D., 1998. Histopathological and histochemical changes in honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) after infection with *Bacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood disease. *Cell Biol. Int.* 22: 137-144.

Govind, S., 2008. Innate immunity in *Drosophila*: Pathogens and pathways. *Insect. Sci.* 15: 29-43.

Hammer, O., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis, Version 2.15. *Palaeontol. Electron.* 4: 9.

Hansen, H. & Broodsgaard, C., 1999. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World.* 80: 5-23.

Harriet, J., & Campá, J., 2012. Loque americana: situación actual. Jornada de Apicultura (2012, San José de Mayo, UY). "Avances sobre el manejo de la colmena". La Estanzuela, INIA. Serie Actividades de Difusión no. 683

Higes, M., Martín, R., Meana, A., 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J. Invertebr. Pathol.* 92, 81–83.

Higes, M., Garcia-Palencia, P., Martin-Hernandez, R., Meana, A., 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invertebr. Pathol.* 94: 211-217.

- Higes, M., Martín-Hernandez, R., Meana, A., 2010a.** *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie*. 41: 375-392.
- Higes, M., Palencia, P.G., Botías, C., Meana, A., Martín-Hernandez, R., 2010b.** The differential development of microsporidia infecting worker honey bee (*Apis mellifera*) at increasing incubation temperature. *Environ. Microbiol. Reports*. 2: 745-748.
- Higes, M., Martín-Hernandez, R., Botías, C., Bailón, E.G., Gonzales-Porto, A., Barrios, L., del Nozal, M.J., Palencia, P.G., Meana, A., 2008.** How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol.* 10: 2659-2669.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E.G., Gonzales-Porto, A., Palencia, P.G., Meana, A., del Nozal, M.J., Mayo, R., Bernal, J., 2009.** Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ. Microbiol. Reports*. 1: 110-113.
- Hoffmann, J.A., 2003.** The immune response of *Drosophila*. *Nature*. 426: 33-38.
- Holst, E.C., 1946.** A simple field test for American foulbrood. *Am. Bee J.* 86, 34.
- Holst E.C. & Sturtevant A.P., 1940.** Relation of proteolytic enzymes to phase of life cycle of *Bacillus larvae* and two new culture media for this organism. *Bacteriol.* 40: 723-731.
- Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006.** Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*. 443: 931-949.
- Hong, I. P., Woo, S.O., Choi, Y.S., Han, S.M., Kim, N.S., Kim, H.K., Han, S.H., Lee, M.Y., Lee, Byeon, K.H., 2011.** Prevalence of *Nosema* and Virus in Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Colonies on Flowering Period of Acacia in Korea. *Mycobiology*. 39: 317-320.
- Hornistky, M.A.Z., & Nicholls, P.J., 1993.** J medium is superior to Sheep Blood Agar and Brain Heart Infusion for the isolation of *Bacillus larvae* form honey samples. *J. Apicult. Res.* 32: 51-52.
- Huang, W., Jiang, J., Chen, Y., Wang, C., 2007.** A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie*. 38: 30–37.

- Imler, J., & Bulet, P., 2005.** Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Chem. Immunol. Allergy.* 86: 1-21.
- Invernizzi, C., Abud C., Tomasco, I., Harriet, J., Ramallo, G., Campá, J., Katz, H., Gardiol, G., Mendoza, Y., 2009.** Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *J. Invertebr. Pathol.* 101: 150-153.
- Invernizzi, C., Antúnez, K., Campa, J. P., Harriet, J., Mendoza, Y., Santos, E., Zunino, P. 2011a.** Situación sanitaria de las abejas melíferas en Uruguay. *Veterinaria.* 47: 15-27.
- Invernizzi, C., Santos, E., García, E., Daners, G., Di Landro, R., Saadoun, A., Cabrera, C. 2011b.** Sanitary and nutritional characterization of honeybee colonies in *Eucalyptus grandis* plantations in Uruguay. *Arch. Zooteca.* 60: 1303-1314.1
- Johnson, R.M., Evans, J.D., Robinson, G.E., Berenbaum, M.R., 2009.** Changes in transcript abundance relating to colony collapse disorder in honey bees (*Apis mellifera*). *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.* 106, 14790-95.
- Klee, J., Besana, A., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D.Q., Chinh, T.X., Puerta, F., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I., Paxton, R., 2007.** Widespread dispersal of the microsporidium *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* 96: 1-10.
- Klein, A.M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tscharntke, T., 2007.** Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. Roy. Soc. Lond., B.* 274, 303–313.
- Kojima, Y., Yoshiyama, M., Kimura, K., Kadowaki, T., 2011.** PCR-based detection of a tracheal mite of the honey bee *Acarapis woodi*. *J. Invertebr. Pathol.* 108: 135-7.
- Kukielka, D., Esperón, F., Higes, M., Sánchez-Vizcaíno, J.M., 2008.** A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. *J. Virol. Methods.* 147, 275-81.
- Lavine, M.D. & Strand, M.R., 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 32: 1295-1309.

- Liebig, G., 2001.** How many *Varroa destructor* mites can be tolerated by a honey bee colony? *Apidologie*, 32: 482-484.
- Lindström, A., Korpela, S., Fries, I., 2008.** The distribution of *Paenibacillus larvae* spores in adult bees and honey and larval mortality, following the addition of American foulbrood diseased brood or spore-contaminated honey in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *J. Invertebr. Pathol.* 99: 82.
- Lovallo, N., & Cox-Foster, D.L., 1999.** Alteration in FAD–glucose dehydrogenase activity and hemocyte behavior contribute to initial disruption of *Manduca sexta* immune response to *Cotesia congregata* parasitoids. *J. Insect. Physiol.* 45: 1037-1048.
- Maggi, M.D., Ruffinengo, S.R., Negri, P., Eguaras, M.J., 2010.** Resistance phenomena to amitraz from populations of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* of Argentina. *Parasitol. Res.* 107: 1189-1192.
- Maggi, M.D., Ruffinengo, S.R., Damiani, N., Sardella, N.H., Eguaras, M.J., 2009.** First detection of *Varroa destructor* resistance to coumaphos in Argentina. *Exp. Appl. Acarol.* 47: 317-320.
- Maggi, M.D., Ruffinengo, S.R., Mendoza, Y., Ojeda, P., Ramallo, G., Floris, I., Eguaras, M.J., 2011.** Susceptibility of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) to synthetic acaricides in Uruguay: Varroa mites' potential to develop acaricide resistance. *Parasitol. Res.* 108: 815-821.
- Mathieu, L., & Faucon, J. P., 2000.** Changes in the response time for *Varroa jacobsoni* exposed to amitraz. *J. Api. Res.* 39: 155-158.
- Martin, S., 2001.** *Varroa destructor* reproduction during the winter in *Apis mellifera* colonies in UK. *Exp. Appl. Acarol.* 25: 321-325.
- Martin, S.J., Highfield, A.C., Brettell, L., Villalobos, E.M., Budge, G.E., Powell, M., Nikaido, S., Schroeder, D.C., 2012.** Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science.* 336: 1304-1306.

Martínez, J., Leal, G., Conget, P., 2012. *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. Parasitol. Res. 111: 601-607.

Martín-Hernández, R., Meana, A., García-Palencia, P., Marín, P., Botías, C., Garrido-Bailón, E., Barrios, L., Higes, M., 2009. Effect of temperature on the biotic potential of honey bee microsporidia. Appl Environ Microbiol. 75: 2554-2557.

Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A.M., Garrido-Bailón, E., Higes, M., 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. Appl Environ Microbiol. 73: 6331-8.

Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E. G., Martínez-Salvador, A., Prieto, L., Meana, A., Higes, M., 2012. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? Environ. Microbiol. 14: 2127-2138.

Medici, S. K., Sarlo, E. G., Porrini, M. P., Braunstein, M., Eguaras, M. J., 2012. Genetic variation and widespread dispersal of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* apiaries from Argentina. Parasitol. Res. 110: 859-864.

Mendoza, Y. 2012. Resistencia de las abejas melíferas frente al microsporidio *Nosema ceranae* en forestaciones de *Eucalyptus grandis*. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Facultad de Agronomía, UdelaR.

Mendoza, Y., Díaz, S., Ramallo, G., Invernizzi, C., 2012. Incidencia de *Nosema ceranae* durante el invierno en colonias de abejas melíferas retiradas de una forestación de *Eucalyptus grandis*. Veterinaria. 48: 13-19.

Mendoza, Y., Harriet, J., Campa, J., Katz, H., Ramallo, G., Díaz-Cetti, S., Invernizzi, C. 2013. Control de *Nosema ceranae* en colonias de abejas (*Apis mellifera*) en forestaciones de *Eucalyptus grandis*. Agrociencia, 17: 108-113.

Mendoza, Y., & Ramallo, G., 2007. Evaluación de eficacia de acaricida en el control de varroosis. Jornada de Manejo Sanitario en Apicultura. (Centro Cultural AFE, 2007). La Estanzuela, INIA. Serie Actividades de Difusión no. 500.

- MGAP Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, 2012.** Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca
- MGAP Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, 2010.** Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.
- Morse, R.A., & Calderone, N.W., 2000.** The value of honey bee pollination in the United States. *Bee Culture*. 128: 1-15.
- Nordström S. & Fries I., 1995.** A comparison of media and cultural condition for identification of *Bacillus larvae* in honey. *J. Apicult. Res.* 34: 97-103.
- OIE Oficina Internacional de Epizootias, 1999.** World animal health. Pp 606- 608.
- OIE Oficina Internacional de Epizootias, 2012.** Varroosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.
- Oldroyd, B.P., 2007.** What's killing American honey bees? *PLoS Biol* 5, 168.
- OPYPA Oficina de Programación y Política Agropecuaria – MGAP, 2009.** Apicultura: situación actual y perspectivas. Errea E., Licandro H. Anuario OPYPA. 113 - 118.
- OPYPA Oficina de Programación y Política Agropecuaria – MGAP, 2006.** Apicultura: situación actual y perspectivas. Errea E., Ilundain M. Anuario OPYPA
- OPYPA Oficina de Programación y Política Agropecuaria – MGAP, 2005.** Apicultura: situación actual y perspectivas. Errea E., Ilundain M. Anuario OPYPA
- Osta, M.A., Christophides, G.K., Vlachou, D., Kafatos, F.C., 2004.** Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. *J. Exp. Biol.* 207: 2551-2563.
- Piccini, C., D'Alessandro, B., Antúnez, K., Zunino, P., 2002.** Detection of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae* spores in naturally infected larvae and artificially contaminated honey by PCR. *W. J. Microbiol. Biotech.* 18: 761-765.

Piccini, C., & Zunino, P., 2001. American Foulbrood in Uruguay: Isolation of *Paenibacillus larvae larvae* from larvae with clinical symptoms and adult honeybees and susceptibility to oxitetracycline. *J. Inv. Pathol.* 78: 176-177.

Palacios, G., Hui, J., Quan, P.L., Kalkstein, A., Honkavuori, K.S., Bussetti, A.V., Conlan, S., Evans, J., Chen, Y.P., vanEngelsdorp, D., Efrat, H., Pettis, J., Cox-Foster, D., Holmes, E.C., Briese, T., Lipkin, W.I., 2008. Genetic analysis of Israel acute paralysis virus: distinct clusters are circulating in the United States. *J. Virol.* 82, 6209-17.

Paxton, R., 2010. Does infection by *Nosema ceranae* cause "Colony Collapse Disorder" in honey bees (*Apis mellifera*)? *J. Apicult. Res.* 49: 80-84.

Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 2002-07.

Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E., 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends. Ecol. Evol.* 25: 345-53.

Rauch, S., Ashiralieva, A., Hedtke, K., Genersch, E., 2009. Negative correlation between individual-insect-level virulence and colony-level virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood of honeybees. *App. Environ. Microbiol.* 75: 3344-3347.

Rath, W., 1999. Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie.* 30: 97-110.

Rennich, K., Pettis, J., vanEngelsdorp, D., Bozarth, R., Eversole, H., Roccasecca, K., Smith, M., Stitzinger, J., Andree, M., Snyder, R., Rice, N., Evans, J., Levi, V., Lopez, D., Rose, R., 2011. 2011-2012 National Honey Bee Pests and Diseases Survey report. http://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/honey_bees/downloads/2011_National_Survey_Report.pdf

Rennich, K., Pettis, J., vanEngelsdorp, D., Hayes, J., Andre, M., Snyder, R., Roccasecca, K., Rice, N., Evans, J., Lopez, D., Levi, V., Smith, M., Patel, N., Rose, R., 2012. 2010 -

2011 National Honey Bee Pests and Diseases Survey Report.
http://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/honey_bees/downloads/2010-2011-Limited_Survey_Report.pdf

Rennie, J., White, P.B., Harvey, E.J., 1921. Isle of Wight disease in hive bees. Trans. R. Soc. Edinburgh. 52: 737-754.

Reynaldi, F.J., Sguazza, G.H., Tizzano, M.A., Fuentealba, N., Galosi, C.M., Pecoraro, M.R., 2011. First report of Israeli acute paralysis virus in asymptomatic hives of Argentina. Rev. Argent. Microbiol. 43: 84-86.

Ribière, M., Olivier, V., Blanchard, P., 2010. Chronic bee paralysis: A disease and a virus like no other? J. Invertebr. Pathol. 103: S120-S131.

Ribière, M., Lallemand, P., Iscache, A.L., Schurr, F., Celle, O., Blanchard, P., Olivier, V., Faucon, J.P., 2007. Spread of infectious Chronic bee paralysis virus by honeybee (*Apis mellifera* L.) feces. Appl. Environ. Microbiol. 73: 7711-7716.

Rodríguez, M., Vargas, M., Gerding, M., Navarro, H., Antúnez, K., 2012. Viral infection and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) in Chile. J. Api. Res. 51: 285-287.

Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B., 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. J. Invertebr. Pathol. 103: S80-S95.

Sammatro, D., Gerson, U., Needham, G., 2000. Parasitic mites of honeybees: Life, History, Implications, and Impact. Annu. Rev. Entomol. 45: 519-548.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press.

Scott Schneider, S., DeGrandi-Hoffman, G., Smith, D.R., 2004. THE AFRICAN HONEY BEE: Factors Contributing to a Successful Biological Invasion. Annu. Rev. Entomol. 49: 351-376.

- Shen, M., Cui, L., Ostiguy, N., Cox-Foster, D., 2005.** Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *J. Gen. Virol.* 86: 2281-2289
- Shimanuki, H., Calderone, N.W., Knox, D.A., 1994.** Parasitic mite syndrome: the symptoms. *Am. Bee J.* 134: 117-119.
- Stoltz, D., Shen, X.R., Boggis, C., Sisson, G., 1995.** Molecular diagnosis of Kashmir bee virus infection. *J. Apic. Res.* 34: 153-160.
- Stokstad, E. 2007.** Puzzling decline of US bees linked to virus from Australia. *Science.* 317: 1304-1305.
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M. E., Bergoin, M., 2004.** Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *App. Environ. Microbiology.* 70: 7185-7191.
- Texier, C., Vidau, C., Vignes, B., El Alaoui, H., Delbac, F., 2010.** Microsporidia: a model for minimal parasite-host interactions. *Curr. Op. Micro.* 13:443-449
- Traver, B.E. & Fell, R.D., 2011.** Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia. *J. Invertebr. Pathol.* 107: 43-49.
- Uruguay XXI Promoción de Inversiones y Exportaciones, 2011.** Mercado Internacional y Uruguayo para la miel. www.uruguayxxi.gub.uy
- Vandame, R., & Palacio, M. A. 2010.** Preserved honey bee health in Latin America: a fragile equilibrium due to low-intensity agriculture and beekeeping? *Apidologie.* 41: 243-255.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3(7).

vanDooremalen, C., Gerritsen, L., Cornelissen, B., van der Steen, J.J., van Langevelde, F., Blacquièrre, T., 2012. Winter survival of individual honey bees and honey bee colonies depends on level of *Varroa destructor* infestation. PLoS One, 7(4), e36285.

vanEngelsdorp, D., & Meixner, M.D., 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. J. Invertebr. Pathol. 103: S80-S95.

vanEngelsdorp, D., Lengerich, E., Spleen, A., Dainat, B., Cresswell, J., Bayliss, K., Nguyen, B.K, Soroker, V., Underwood, R., Human, H., LeConte, Y., Saegerman, C., 2013. Standard epidemiological methods to understand and improve *Apis mellifera* health. In V Dietemann; J D Ellis, P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. Journal of Apicultural Research 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.08>

Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J., Lupski, J.R., 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Method. Mol. Cell. Biol. 5: 25-40.

Villalba, V. 2012. "Situación de la acariosis (*Acarapis woodie* R.) en apiarios de zonas con antecedentes de la enfermedad. Trabajo de Tesis. Facultad de Veterinaria, UdelaR

Wilson-Rich, N., Spivak, M., Fefferman, N.H., Starks, P.T., 2009. Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. Annu. Rev. Entomol. 54: 405-423.

Woodrow, A.W., 1942. Susceptibility of honey bee larvae to individual inoculation with spores of *Bacillus larvae*. J. Econ. Entomol. 35: 892-895.

Yang, X. & Cox-Foster, D.L., 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 102: 7470-5.

Yang, X., & Cox-Foster, D., 2007. Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. *Parasitology* .134, 405–412.

Yue C. & Genersch E., 2005. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.* 86: 3419-3424.

Yue, C., Schröder, M., Gisder, S., Genersch, E., 2007. Vertical transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*). *J. Gen. Virol.* 88, 2329–2336.

Zander, E., 1909. Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Münchener Bienenzeitung* 31: 196-204.

ANEXO I

Tabla a. Nivel de infestación media en cantidad de varroas cada 100 abejas.

Muestra	Departamento	% de varroas en abejas pecoreadoras	% de varroas en abejas nodrizas	Muestra	Departamento	% de varroas en abejas pecoreadoras	% de varroas en abejas nodrizas
1	Artigas	4,6	5,5	52	Río Negro	0,5	4,9
67	Artigas	1,5	0	75	Río Negro	2,3	2,5
31	Canelones	13,7	8,5	91	Río Negro	25,3	31,4
36	Canelones	4,6	4,7	92	Río Negro	0,5	0
39	Canelones	2,3	3,7	99	Río Negro	0	0
42	Canelones	4,8	2,7	100	Río Negro	2,2	7,3
59	Canelones	18,2	20,2	101	Río Negro	1,1	0
70	Cerro Largo	4,5	5,4	102	Río Negro	5,3	8,3
80	Cerro Largo	0,8	0	103	Río Negro	4,2	9
17	Colonia	0,8	1,6	66	Río Negro	6,2	2,4
18	Colonia	13,1	19,1	94	Río Negro	3,7	3,5
26	Colonia	3,8	4,8	2	Rivera	0	0
27	Colonia	0	0	3	Rivera	3,5	3,4
30	Colonia	0	0	4	Rivera	0	0
33	Colonia	2,6	4,2	5	Rivera	0,2	0
34	Colonia	1	1,3	6	Rivera	0	0
35	Colonia	5,9	5,6	7	Rivera	0	1,8
38	Colonia	3,5	3,2	8	Rivera	2,1	1,4
49	Colonia	2,4	2,4	9	Rivera	0	0
58	Colonia	3,8	3,1	10	Rivera	0,5	0,9
43	Durazno	2,9	2,9	11	Rivera	0,4	0,5
60	Durazno	0,7	0	37	Rocha	0	0
61	Durazno	0,4	0,8	48	Rocha	0,3	0
63	Durazno	1,8	1,8	54	Salto	0,8	1,2
12	Flores	4	3	55	Salto	4,1	2,1
13	Flores	0	0	56	Salto	0,9	0
14	Flores	0,4	0,5	19	San José	1,4	8,7
15	Flores	2,3	3,7	20	San José	14,9	25,7
16	Flores	0	0	21	San José	11,3	19,7
24	Florida	0	0	23	San José	1,8	0,8
44	Florida	1,2	1,5	28	San José	13,4	12,3
45	Florida	23,5	19,9	29	San José	3,2	9,3
46	Florida	4,6	3,2	32	San José	13,4	8,3
47	Florida	11,6	18,9	53	San José	10,1	15,3
64	Florida	16,7	21,9	50	Soriano	3,9	3,4
41	Lavalleja	2,6	6,2	51	Soriano	2,9	2,5
40	Maldonado	4	3,8	62	Soriano	4,8	4,5
65	Montevideo	8,8	2,7	71	Soriano	1,2	0
57	Paysandú	0	0	72	Soriano	5,2	4,9
68	Paysandú	10,8	29,5	73	Soriano	1,8	2,5
69	Paysandú	0,9	3,1	74	Soriano	7,5	12,4
76	Paysandú	3,5	4	81	Soriano	1,8	1
77	Paysandú	2,7	3,8	82	Soriano	14,4	9,5
78	Paysandú	2,5	2,8	83	Soriano	2,6	1,4
79	Paysandú	0,8	3,6	84	Soriano	7,2	5,6
85	Paysandú	1,3	1,2	90	Soriano	3,3	4,3
86	Paysandú	0,5	2,1	93	Soriano	0	0,9
87	Paysandú	21	25,5	97	Soriano	6,4	9,9
88	Paysandú	1,4	5,7	120	Tacuarembó	10,8	6,4
89	Paysandú	10,2	11,6	121	Tacuarembó	7	8,8
96	Paysandú	0	0	95	Treinta y Tres	2,4	0,7
98	Paysandú	2,9	0				

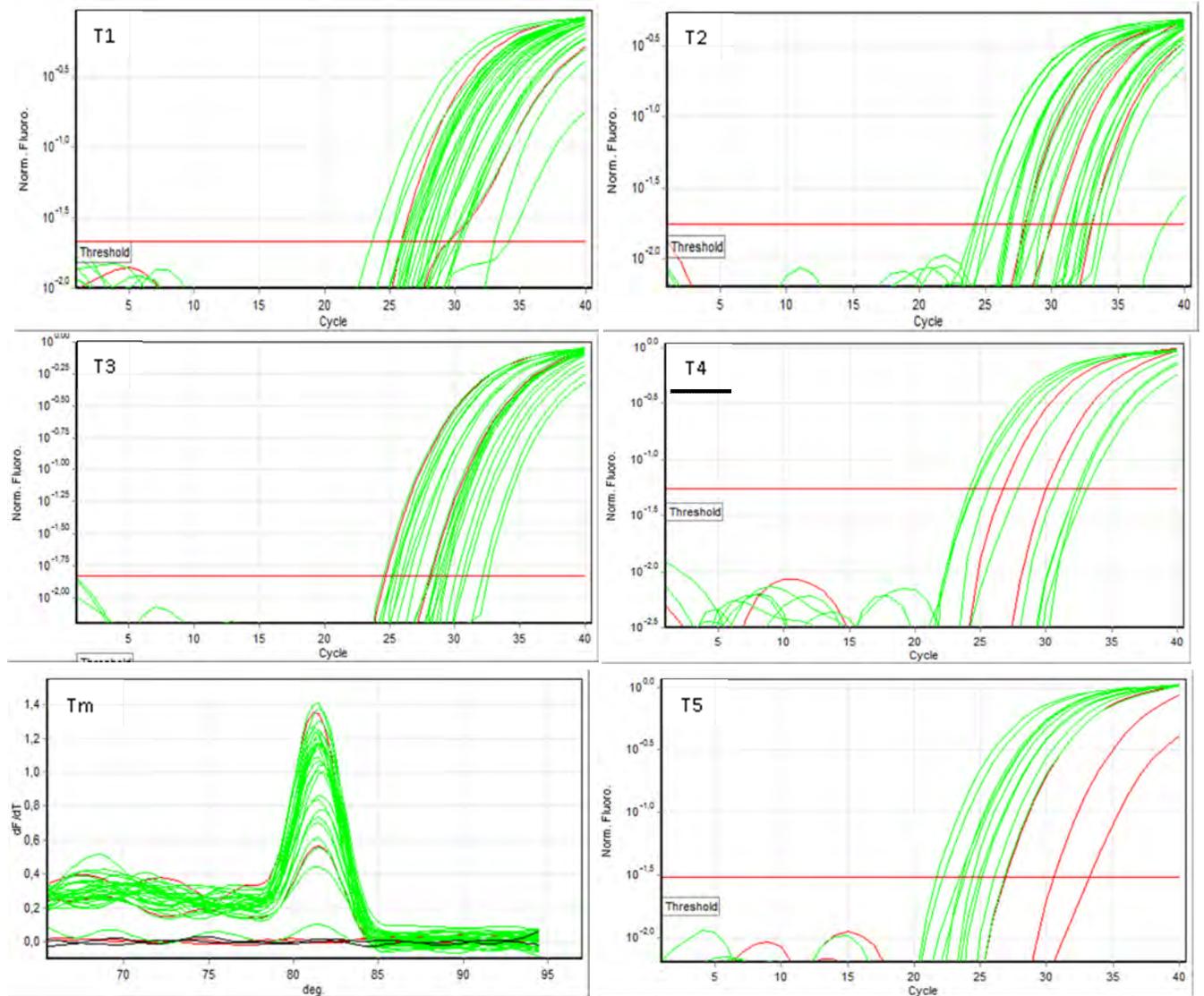
Tabla b. Expresión relativa del ARN viral ABPV y BQCV.

Muestra	Departamento	ABPV	BQCV	Muestra	Departamento	ABPV	BQCV
1	Artigas	0,0	259,6	52	Rio Negro	0,0	2,3
67	Artigas	0,0	12,9	75	Rio Negro	0,0	74,6
31	Canelones	0,0	2078,7	91	Rio Negro	0,0	0,0
36	Canelones	181,7	65,4	92	Rio Negro	0,0	4,8
39	Canelones	0,0	14037,0	99	Rio Negro	0,0	255,1
42	Canelones	4019,9	150,9	100	Rio Negro	0,0	4,5
59	Canelones	0,0	0,0	101	Rio Negro	0,0	74,3
70	Cerro Largo	0,0	0,0	102	Rio Negro	0,0	56,3
80	Cerro Largo	0,0	67,6	103	Rio Negro	0,0	19,0
17	Colonia	0,0	6,2	66	Rio Negro	0,0	21981,5
18	Colonia	0,0	1426,8	94	Rio Negro	0,0	1221,5
26	Colonia	0,0	85,2	2	Rivera	0,0	637,1
27	Colonia	68,0	40,5	3	Rivera	0,0	2358,3
30	Colonia	0,0	212,8	4	Rivera	1786,3	11188,9
33	Colonia	14,7	390,6	5	Rivera	0,0	26686,9
34	Colonia	206,7	2,7	6	Rivera	0,0	2470,6
35	Colonia	0,0	26,3	7	Rivera	0,0	2135,0
38	Colonia	0,0	36,1	8	Rivera	0,0	2659,3
49	Colonia	3144,7	28570,0	9	Rivera	0,0	105,2
58	Colonia	0,0	12373,0	10	Rivera	0,0	6053,0
43	Durazno	31,1	0,0	11	Rivera	0,0	80077,6
60	Durazno	0,0	0,0	37	Rocha	0,0	1973,0
61	Durazno	0,0	530,0	48	Rocha	0,0	1779,5
63	Durazno	0,0	4,4	54	Salto	0,0	60,3
12	Flores	0,0	2676,2	55	Salto	0,0	27094,2
13	Flores	0,0	1,9	56	Salto	0,0	12887,9
14	Flores	0,0	1512470,8	19	San José	0,0	5251,7
15	Flores	0,0	124,7	20	San José	0,0	83,6
16	Flores	0,0	2919,4	21	San José	0,0	0,0
24	Florida	25,4	0,0	23	San José	0,0	138,4
44	Florida	0,0	423,5	28	San José	0,0	0,0
45	Florida	0,0	0,0	29	San José	0,0	3,1
46	Florida	1645,9	63,6	32	San José	971,2	1,0
47	Florida	0,0	9,7	53	San José	0,0	0,0
64	Florida	0,0	8,4	50	Soriano	0,0	357,2
41	Lavalleja	0,0	2738498,3	51	Soriano	0,0	475856,8
40	Maldonado	0,0	1952,1	62	Soriano	0,0	9396,0
65	Montevideo	0,0	3608458,6	71	Soriano	1,0	435,7
57	Paysandú	986,5	28877,5	72	Soriano	0,0	140,5
68	Paysandú	0,0	10076,7	73	Soriano	0,0	185,6
69	Paysandú	0,0	937,7	74	Soriano	0,0	33,9
76	Paysandú	0,0	106,3	81	Soriano	0,0	340,1
77	Paysandú	0,0	120,4	82	Soriano	0,0	86,9
78	Paysandú	0,0	483,6	83	Soriano	0,0	100,3
79	Paysandú	410,9	13,8	84	Soriano	0,0	82,7
85	Paysandú	0,0	42,0	90	Soriano	0,0	509,6
86	Paysandú	0,0	92,1	93	Soriano	0,0	728,3
87	Paysandú	0,0	31,6	97	Soriano	0,0	120,6
88	Paysandú	0,0	9,7	120	Tacuarembó	0,0	8,3
89	Paysandú	16,8	410,0	121	Tacuarembó	0,0	3,7
96	Paysandú	0,0	73,1	95	Treinta y Tres	0,0	663,4
98	Paysandú	0,0	19,8				

Tabla c. Expresión relativa del ARN viral DWV y SBV.

Muestra	Departamento	DWV	SBV	Muestra	Departamento	DWV	SBV
1	Artigas	1493970,2	0,0	52	Río Negro	0,0	0,0
67	Artigas	0,0	0,0	75	Río Negro	0,0	0,0
31	Canelones	91,1	0,0	91	Río Negro	0,0	0,0
36	Canelones	0,0	0,0	92	Río Negro	0,0	0,0
39	Canelones	2911,9	0,0	99	Río Negro	0,0	596,3
42	Canelones	0,0	0,0	100	Río Negro	0,0	0,0
59	Canelones	33554094,8	0,0	101	Río Negro	0,0	0,0
70	Cerro Largo	0,0	0,0	102	Río Negro	0,0	0,0
80	Cerro Largo	0,0	25,5	103	Río Negro	0,0	0,0
17	Colonia	0,0	0,0	66	Río Negro	0,0	75,6
18	Colonia	3282878,2	0,0	94	Río Negro	0,0	0,0
26	Colonia	4,1	0,0	2	Rivera	0,0	0,0
27	Colonia	0,0	0,0	3	Rivera	0,0	0,0
30	Colonia	0,0	6,9	4	Rivera	0,0	0,0
33	Colonia	415,8	12585,4	5	Rivera	0,0	0,0
34	Colonia	119,6	1,0	6	Rivera	0,0	0,0
35	Colonia	0,0	0,0	7	Rivera	0,0	0,0
38	Colonia	0,0	0,0	8	Rivera	0,0	0,0
49	Colonia	0,0	0,0	9	Rivera	0,0	0,0
58	Colonia	0,0	22,3	10	Rivera	0,0	0,0
43	Durazno	0,0	0,0	11	Rivera	0,0	0,0
60	Durazno	0,0	0,0	37	Rocha	0,0	0,0
61	Durazno	0,0	0,0	48	Rocha	270651,3	0,0
63	Durazno	0,0	0,0	54	Salto	0,0	13,4
12	Flores	0,0	0,0	55	Salto	0,0	0,0
13	Flores	0,0	0,0	56	Salto	0,0	0,0
14	Flores	0,0	0,0	19	San José	137,9	54352,8
15	Flores	0,0	3062,3	20	San José	0,0	0,0
16	Flores	785,1	8,1	21	San José	53,5	0,0
24	Florida	0,0	0,0	23	San José	2,4	183117,2
44	Florida	0,0	0,0	28	San José	2,6	3,2
45	Florida	1952,9	0,0	29	San José	2260,2	0,0
46	Florida	0,0	0,0	32	San José	1284055,3	0,0
47	Florida	23,2	0,0	53	San José	620006,8	0,0
64	Florida	1,0	0,0	50	Soriano	0,0	2,1
41	Lavalleja	0,0	418,3	51	Soriano	8285494,6	0,0
40	Maldonado	0,0	0,0	62	Soriano	0,0	0,0
65	Montevideo	0,0	0,0	71	Soriano	918,3	0,0
57	Paysandú	0,0	0,0	72	Soriano	76,2	346,7
68	Paysandú	230878924,0	0,0	73	Soriano	0,0	0,0
69	Paysandú	26,1	182,5	74	Soriano	0,0	285,1
76	Paysandú	0,0	0,0	81	Soriano	0,0	0,0
77	Paysandú	0,0	0,0	82	Soriano	273629,9	0,0
78	Paysandú	12,3	0,0	83	Soriano	0,0	0,0
79	Paysandú	0,0	0,0	84	Soriano	0,0	0,0
85	Paysandú	0,0	0,0	90	Soriano	0,0	0,0
86	Paysandú	0,0	0,0	93	Soriano	0,0	0,0
87	Paysandú	644,9	0,0	97	Soriano	0,0	10,0
88	Paysandú	0,0	0,0	120	Tacuarembó	0,0	0,0
89	Paysandú	0,0	0,0	121	Tacuarembó	0,0	0,0
96	Paysandú	0,0	15,6	95	Treinta y Tres	0,0	0,0
98	Paysandú	0,0	0,0				

ANEXO II



Expresión del gen de la beta actina de la abeja, se muestran las distintas tandas de amplificación así como la imagen de la temperatura de *melting* (T_m) de una tanda representativa. En rojo se marcan los estándares, en verde las muestras y en negro los controles negativos.

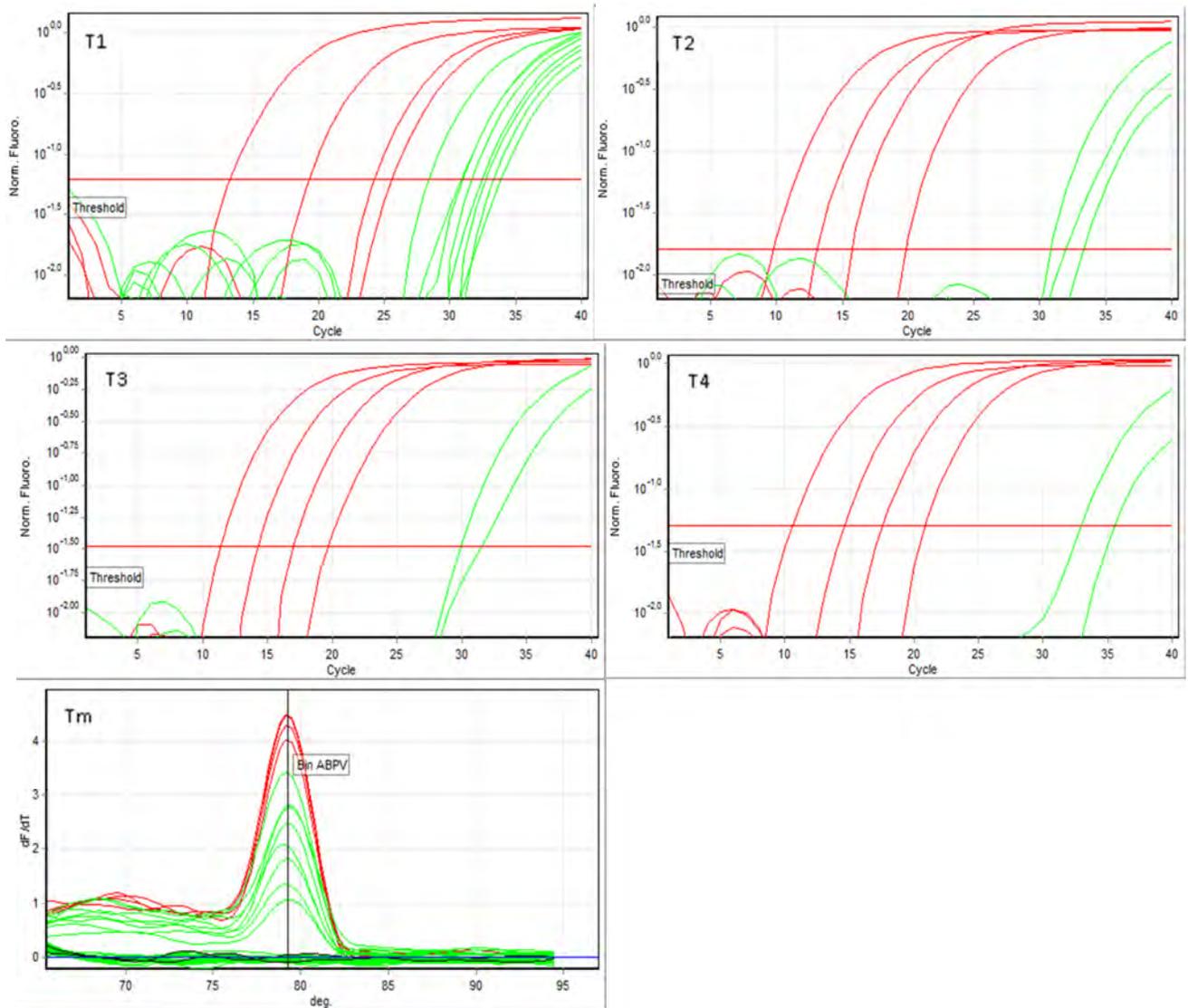
T1: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32.

T2: 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62.

T3: 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 87, 89, 90, 91, 92.

T4: 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103.

T5: 100, 101, 102, 103, 120, 121, 17, 52, 54, 85, 86, 88, 92.



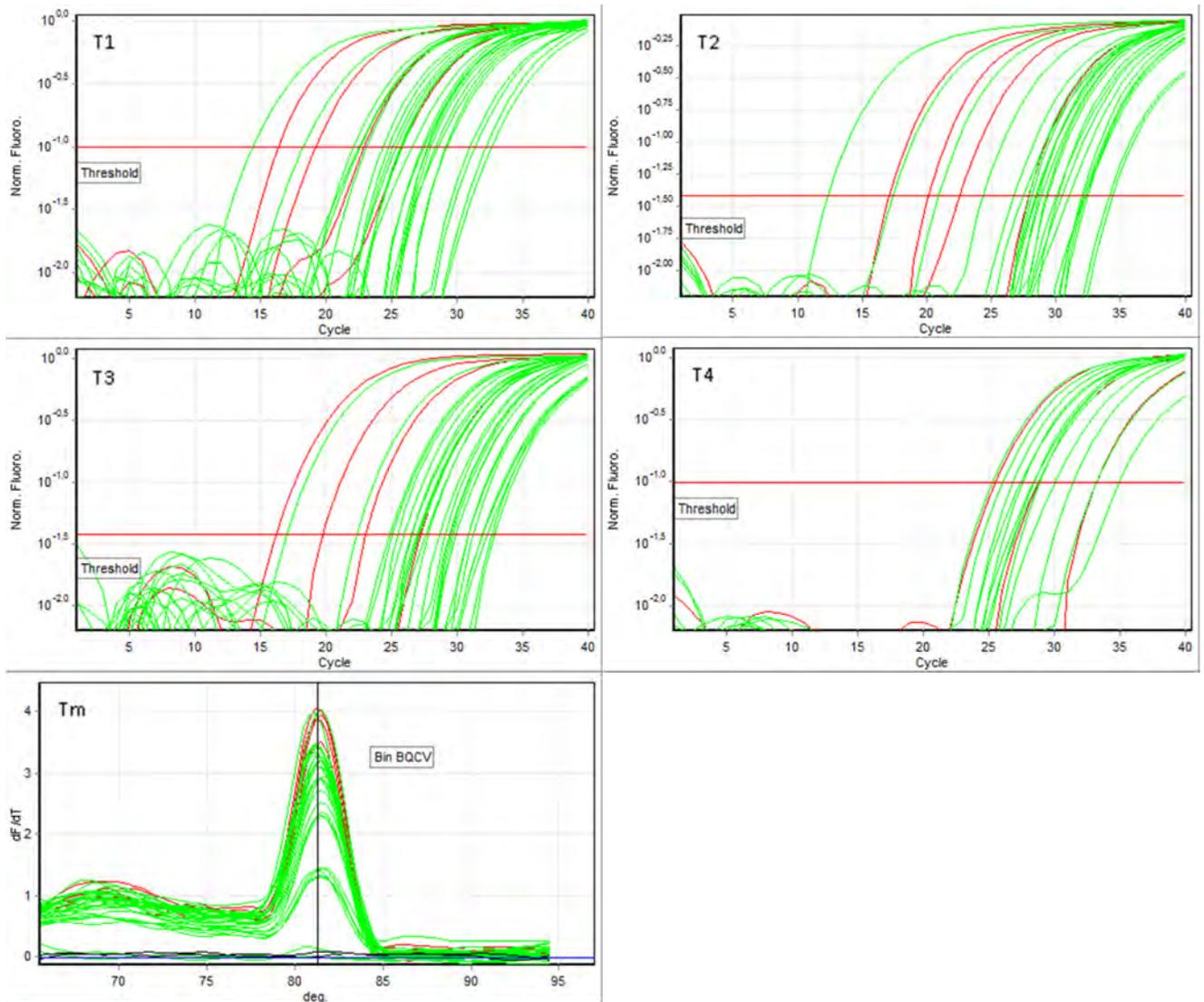
Expresión del virus ABPV, se muestran las distintas tandas de amplificación así como la imagen de la temperatura de *melting* (Tm) de una tanda representativa. En rojo se marcan los estándares, en verde las muestras y en negro los controles negativos.

T1: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33.

T2: 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 53, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65.

T3: 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 87, 89, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 98, 99.

T4: 100, 101, 102, 103, 120, 121, 17, 52, 54, 85, 86, 88, 92.



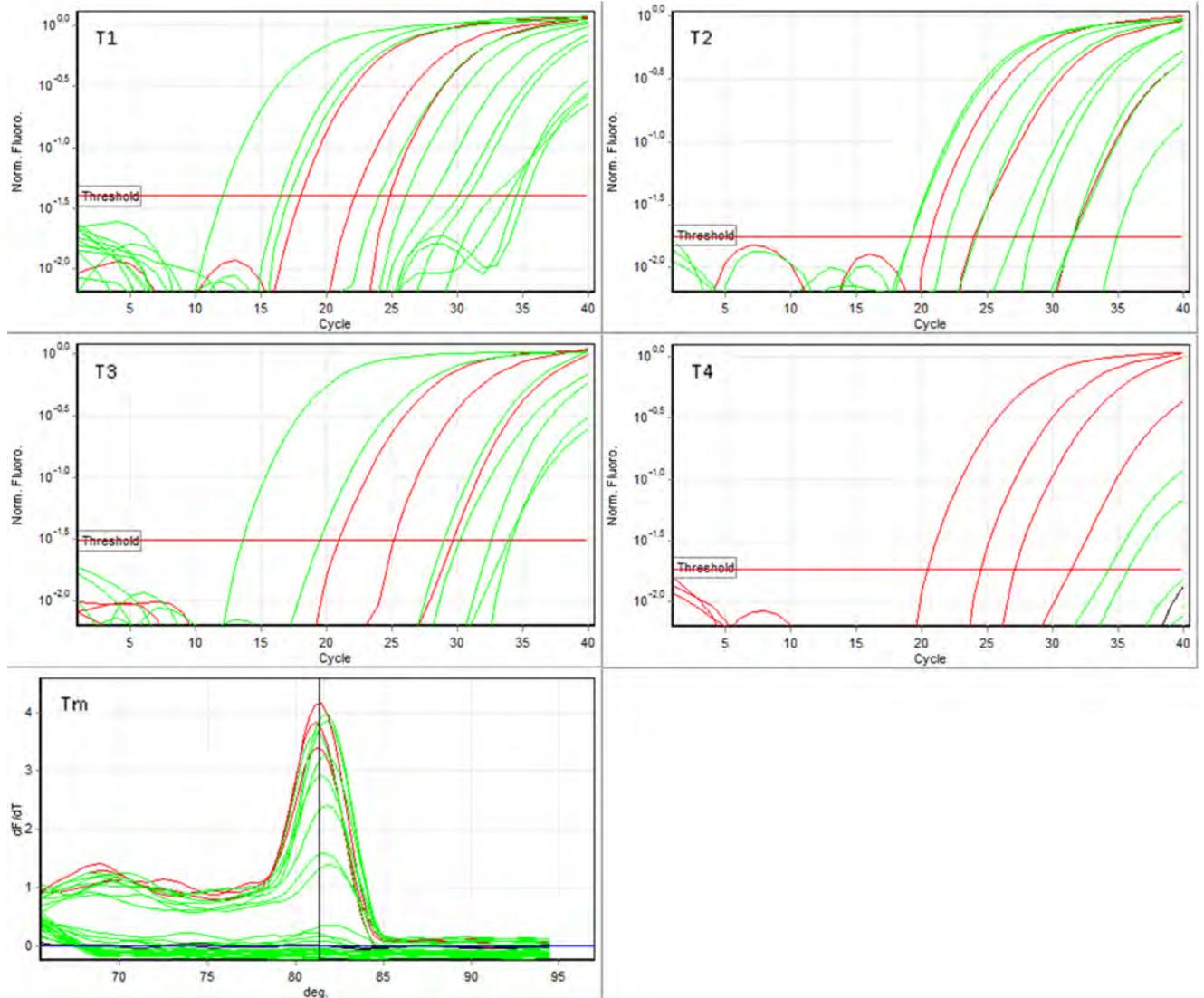
Expresión del virus BQCV, se muestran las distintas tandas de amplificación así como la imagen de la temperatura de *melting* (T_m) de una tanda representativa. En rojo se marcan los estándares, en verde las muestras y en negro los controles negativos.

T1: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33.

T2: 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 53, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65.

T3: 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 87, 89, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 98, 99.

T4: 100, 101, 102, 103, 120, 121, 17, 52, 54, 85, 86, 88, 92.



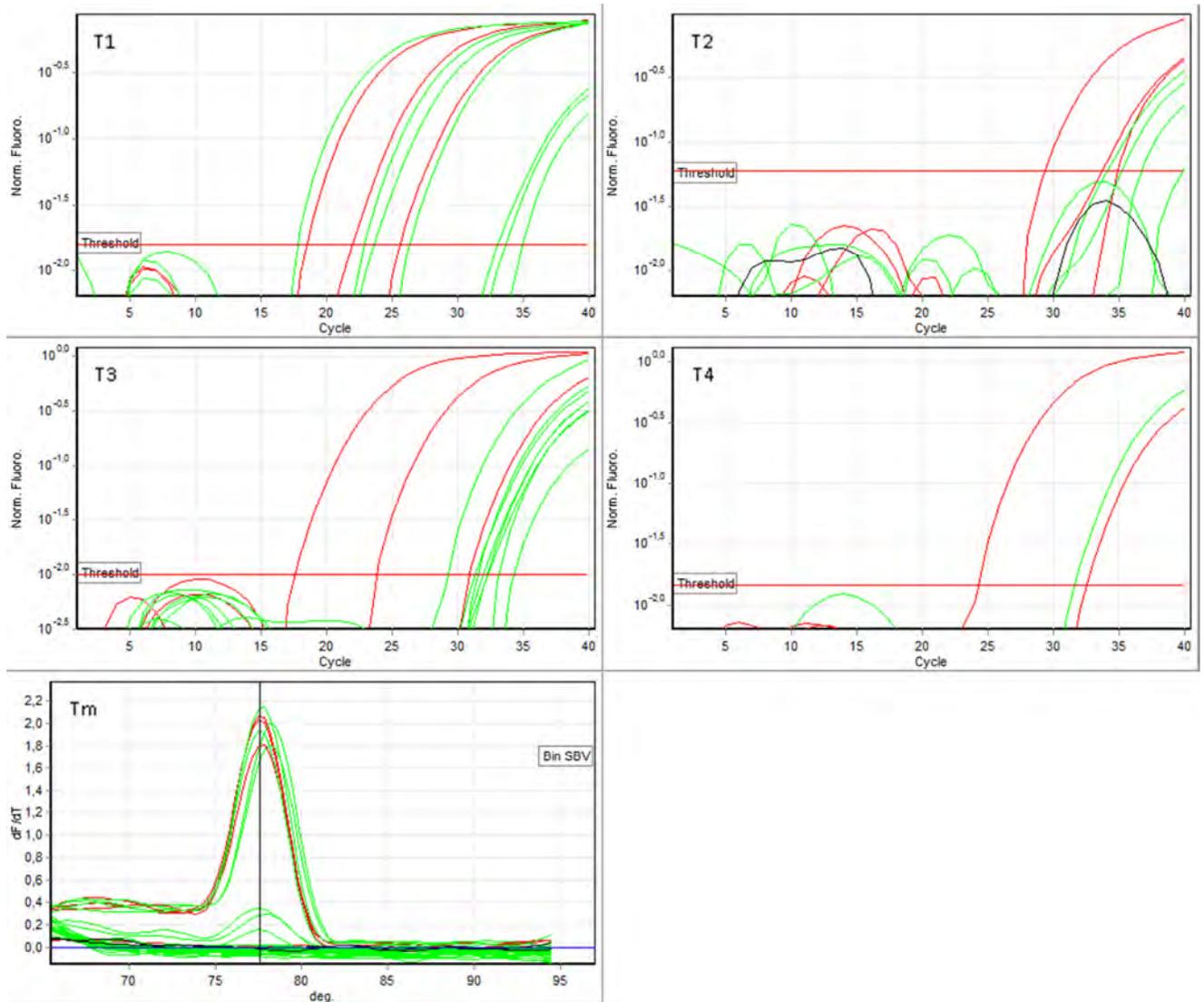
Expresión del virus DWV, se muestran las distintas tandas de amplificación así como la imagen de la temperatura de *melting* (Tm) de una tanda representativa. En rojo se marcan los estándares, en verde las muestras y en negro los controles negativos.

T1: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33.

T2: 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 53, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65.

T3: 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 87, 89, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 98, 99.

T4: 100, 101, 102, 103, 120, 121, 17, 52, 54, 85, 86, 88, 92.



Expresión del virus SBV, se muestran las distintas tandas de amplificación así como la imagen de la temperatura de *melting* (T_m) de una tanda representativa. En rojo se marcan los estándares, en verde las muestras y en negro los controles negativos.

T1: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33.

T2: 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 53, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65.

T3: 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 87, 89, 90, 91, 93, 94, 95, 96, 98, 99.

T4: 100, 101, 102, 103, 120, 121, 17, 52, 54, 85, 86, 88, 92.

ANEXO III

Expresión relativa del ARNm de los genes involucrados en la inmunidad de la abeja.

Muestras bajas en patógenos	Abaecina	Defensina	himenoptecina	Vitelogenina	Lysozima	Pro fenol oxidasa	Gluc deshidro
5	0,8	2,3	0,6	2,9	0,4	1,3	1,5
9	1,0	2,4	1,4	2,2	1,5	3,1	0,0
13	9,1	1,3	1,0	12,8	0,9	2,4	4,7
37	8,2	2,1	9,2	4,2	2,3	1,0	0,0
60	1,4	1,4	0,2	58,6	0,8	13,4	2,1
67	2,9	1,0	3,9	7,0	1,3	2,9	1,0
92	5,7	2,1	1,2	61,3	2,2	7,6	1,4
98	4,2	1,5	0,9	19,3	1,6	6,8	3,6
Muestras altas en patógenos	Abaecina	Defensina	himenoptecina	Vitelogenina	Lysozima	Pro fenol oxidasa	Gluc deshidro
7	1,0	2,8	1,8	8,2	0,7	1,5	11,1
10	2,2	2,2	2,9	8,5	1,3	5,0	3,7
33	8,0	3,2	1,0	6,6	1,0	4,3	0,0
34	2,0	1,2	0,8	1,0	1,4	2,0	0,0
46	39,0	7,7	1,0	9,5	1,7	6,9	0,6
50	7,0	0,6	2,1	9,0	2,1	3,8	0,4
63	1,5	1,8	0,7	19,5	1,4	2,8	1,2
68	2,7	3,5	3,8	11,7	0,6	2,8	1,7
75	37,8	7,0	2,6	25,8	1,8	7,9	7,6
86	1,3	0,3	1,0	6,2	0,8	1,7	0,3
121	6,2	1,4	1,9	109,5	3,2	14,5	4,1

A continuación se muestra la expresión de los genes relacionados con la inmunidad así, como los genes de referencia. En negro se marcan los estándares, en verde las muestras bajas en patógenos, en rosado las muestras altas en patógenos y en azul los controles negativos.

