



RELEVAMIENTO DE PLAGAS Y PATÓGENOS QUE AFECTAN A LAS ABEJAS MELÍFERAS EN URUGUAY

Lic. Sofía Palacios Trujillo
Tesis de Maestría - PEDECIBA
Montevideo, Uruguay
2023



AGENCIA NACIONAL
DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN



RELEVAMIENTO DE PLAGAS Y PATÓGENOS QUE AFECTAN A LAS ABEJAS MELÍFERAS EN URUGUAY

Lic. Sofía Palacios Trujillo

TESIS DE MAESTRÍA, PEDECIBA
ÁREA BIOLOGÍA, SUB- ÁREA MICROBIOLOGÍA

Montevideo, Uruguay
2023

Tutora: Dra. Karina Antúnez*

Co-tutora: Dra. Daniela Arredondo*

*Laboratorio de Microbiología y Salud de las Abejas, Departamento de Microbiología,
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Tribunal:

Presidente	Dra. Inés Ponce de León
Vocal	Dra. Carmen Rossini
Vocal	Dra. Marisol Vargas

Este trabajo fue financiado por la ANII, Proyecto de investigación Aplicada Fondo Maria Viñas (2019) *FMV_1_2019_1_155734*, beca *POS_FMV_2020_1_1009234*.

Índice

Índice	2
Agradecimientos	3
Resumen	4
1. Introducción	5
1.1 Importancia de las abejas como polinizadores	5
1.2 Situación actual del sector apícola en Uruguay	6
1.3 Pérdida de colonias de abejas melíferas	7
1.4 Plagas y patógenos que afectan a la salud de las abejas melíferas	8
1.4.1 <i>Varroa destructor</i>	8
1.4.2 Virus ARN	13
1.4.3 <i>Nosema ceranae</i> y <i>Nosema apis</i>	16
1.3.5 <i>Lotmaria passim</i>	21
2. Hipótesis y objetivos	23
3. Materiales y métodos	24
3.1 Diseño de muestreo	24
3.2 Toma de muestras y estimación de fortaleza de colonia	26
3.3 Cuantificación del porcentaje de infestación con <i>Varroa destructor</i>	27
3.4 Detección y cuantificación relativa de virus ARN	28
3.5 Detección y conteo de esporas de <i>Nosema</i> spp.	31
3.6 Detección de <i>Paenibacillus larvae</i> en mieles	33
3.7 Detección molecular de <i>Lotmaria passim</i>	35
3.8 Regionalización del país	35
3.9 Análisis estadísticos	36
4. Resultados	38
4.1 Fortaleza de la colonia	38
4.2 Plagas y patógenos	40
4.2.2 Prevalencia y distribución de <i>Varroa destructor</i>	42
4.2.2.1 Tratamientos acaricidas contra <i>Varroa destructor</i>	44
4.2.3 Prevalencia, distribución y carga viral de virus ABPV, BQCV, CBPV, DWV, SBV	46
4.2.4 Prevalencia y distribución de <i>Nosema</i> spp.	49
4.2.5 Prevalencia y distribución de <i>Paenibacillus larvae</i>	53
4.2.5 Prevalencia y distribución de <i>Lotmaria passim</i>	55
4.3 Correlaciones entre patógenos y su relación con la fortaleza de la colonia	56
5. Discusión	60
6. Conclusiones	70
7. Perspectivas	71
8. Bibliografía	72

Agradecimientos

A Pablo Zunino por abrirme las puertas de su laboratorio y hacerme sentir que pertenezco y que soy siempre bienvenida allí.

A Karina por recibirme en su grupo de investigación, por acompañarme, enseñarme y aconsejarme a lo largo de todo el proceso, hasta el último minuto y a través del océano.

A Dani por la paciencia, la escucha, la dedicación, el apoyo, la paciencia de nuevo, por explicarme todo en el lab, por salvarme siempre con Photoshop. Gracias por compartir tus aprendizajes, aunque yo misma tuve que ir y cometer los mismos errores, sólo para después ir a decirte “tenías razón”. Por ir al lab conmigo en plena locura de pandemia, y nunca dejarme sola. Por las cervezas que compartimos (¡y que quede constancia de todas las que te debo!).

A toda la Colonia, al grupo de Abejas y al West por siempre estar dispuestos a darme una mano. Pao, Erlen, Majo, Nico, Joaco, gracias por los almuerzos al solcito y las charlas de toda índole para el podcast imaginario, gracias por los consejos, las cervezas y risas.

A mis amigos de siempre. A las gurisas del liceo: Sol, Sofi, Ale, Caro, Lore por siempre escuchar mis historias, y estar en todas, desde hace tantos años. A las que la Fcien me dejó: Romi, Lar, Sol, Caro, personas increíbles que me conocen hasta la raíz, hasta pedacitos de mí que ni yo conozco. A Sara, Cami, Rorro, Thom, Lu, amigos tan sabios que nunca imaginé la suerte de tener, gracias por las charlas filosóficas, y por haberme dado la felicidad de reencontrarnos en las Europas. A los necios pishos: Maxi, Vale, Quiti, Joaco, Tom y Nico, gracias por pasar siempre por la secretaría a charlar, por los veranos, los juegos, la playa y el campo. A mis amigos de acro, a Eli que me banca la cabeza a la distancia y a Fruti que me inculcó un amor por el acro, parte tan importante en mi vida. A Maru, mi hermana hija de otra fulana, por ser siempre mi referente y acompañarme en el viaje de la vida juntas, hasta cuando estamos en distintos continentes.

A toda la gente de Alemania que me bancó en la última parte de escritura. Gracias Fanni, Kim, Kunal, Yann, Luisa, Jana, Manu, Vincent, Nouhaila, Luljeta, Marta y Lily por la ayuda, las salidas, los viajes y las charlas.

A toda mi familia, a mi Má, Pá, Agus, Álvaro y Lou, Mari, abuela, gracias por siempre estar a mi lado impulsándome a dar siempre lo mejor de mí, por darme las herramientas para que sea la mujer que soy hoy.

Al pelu, mi compañero y mi 2 siempre, la otra parte de este equipo increíble que formamos juntos. Gracias por todo, por el apoyo incondicional, por acompañarme hasta el fin del mundo, por tanto amor y sobre todo, por impulsarme a perseguir mis sueños.

Resumen

En los últimos años, la preocupación por las pérdidas de colonias de abejas *Apis mellifera* ha crecido en todo el mundo. En Uruguay, estas pérdidas alcanzan el 20-30% anual, siendo las infecciones por plagas y patógenos una de las principales causas. El objetivo de este trabajo fue realizar un relevamiento a nivel nacional de las principales plagas y patógenos que afectan a las abejas melíferas. En otoño-invierno de 2021 se muestrearon 100 colonias de todo el país, seleccionadas de forma representativa según la densidad de colonias por departamento. Se analizó la presencia, prevalencia y distribución del ácaro *Varroa destructor* y diferentes virus ARN (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV, SBV) en abejas nodrizas; los hongos *Nosema apis* y *Nosema ceranae* y el tripanosomátido *Lotmaria passim* en abejas pecoreadoras, y la bacteria *Paenibacillus larvae* en miel. Para la detección y/o cuantificación de los patógenos se emplearon metodologías estándar (conteo directo, conteo en cámara de Neubauer en microscopio, cultivo microbiológico, PCR, multiplex PCR y RT-qPCR). *N. ceranae*, *V. destructor* y *L. passim* presentaron las prevalencias más altas (63, 62 y 60% respectivamente), y a continuación los virus DWV (30,6%), SBV (26,5%), CBPV (24,5%) y BQCV (22,4%). Finalmente, *P. larvae* presentó una prevalencia de 11% y el virus ABPV 6,1%. No se detectó la presencia de *N. apis* ni de los virus IAPV o KBV. Estos resultados muestran que los principales patógenos están presentes y ampliamente distribuidos en Uruguay, y a la vez resalta la importancia de los monitoreos para alertar sobre la situación sanitaria y el ingreso de nuevas amenazas.

1. Introducción

1.1 Importancia de las abejas como polinizadores

Los polinizadores son vitales para la salud y funcionamiento de los ecosistemas, la reproducción de las plantas, los cultivos, y por ende los alimentos que los humanos consumimos (Potts *et al.*, 2016). Se estima que alrededor del 75% de los cultivos en el mundo dependen en algún grado de la polinización por animales (Klein *et al.*, 2007).

Dentro de los polinizadores, las abejas (Familia: Apidae) son el grupo más abundante (se han descrito más de 20.000 especies) y se estima que visitan el 90% de los distintos tipos de cultivos a nivel mundial (Ascher y Pickering, 2020; Potts *et al.*, 2016).

El hombre ha estado en contacto con las abejas desde la antigüedad, encontrándose los primeros registros de interacción con productos de las abejas en el paleolítico (Wadley *et al.*, 2015). La apicultura comenzó a desarrollarse paralelamente en varias partes del mundo (Kritsky, 2017). Los registros más antiguos hasta el momento datan de la época del imperio Egipcio (~2.400 AC) (Crane, 1999). Los Mayas criaban abejas de la tribu Meliponini (*Melipona beecheii*) desde los años 300 AC (Chase y Chase, 2005), mientras que en Asia, más particularmente en China, se encontraron evidencias de cría de la abeja *Apis cerana* en los años 158-166 DC (Kritsky, 2017). Sin embargo, la apicultura moderna como la conocemos hoy en día se desarrolló a mediados del siglo XIX, a partir de la creación de las colonias Langstroth, utilizándose la abeja europea *Apis mellifera* L. (Crane, 1999).

Apis mellifera L. es la especie visitante más frecuente en cultivos comerciales, estimándose que realiza el 90% de los servicios de polinización (Aizen *et al.*, 2008; Garibaldi *et al.*, 2013). Esta especie se caracteriza por su eficiencia como polinizadora, lo que estaría relacionado con varios de sus atributos. En primer lugar, su dieta está compuesta principalmente de productos derivados de flores (Requier y Leonhardt, 2020), además sus cuerpos están cubiertos por pelos, que permiten el transporte de granos de polen, y por último su lealtad floral con ciertas especies de

plantas durante el mismo viaje de forrajeo o incluso durante toda su vida (Michener, 2000; Requier *et al.*, 2023b; Stavert *et al.*, 2016).

1.2 Situación actual del sector apícola en Uruguay

A pesar de que Uruguay cuenta con más de 45 taxa de abejas descritos (Santos *et al.*, 2020), la principal especie utilizada con fines comerciales es *Apis mellifera*. En particular, se trata de híbridos locales o “abejas criollas”, mezcla entre *A. mellifera mellifera*, *A. mellifera ligustica* y *A. mellifera scutellata* (Branchiccela *et al.*, 2014). Por un lado, la subespecie *A. m. mellifera* fue introducida en Uruguay a principios del siglo XIX por Bernardino Rivadavia, el primer presidente constitucional de la República Argentina (Cordara, 2010). Por otro lado, abejas reinas de *A. m. scutellata* introducidas en Brasil con fines experimentales se cruzaron con las abejas locales, dando lugar a híbridos conocidos como “abejas africanizadas”, que luego se extendieron hasta el territorio uruguayo (Burgett *et al.*, 1995).

El sector apícola en nuestro país cuenta con aproximadamente 2.600 productores que poseen unas 600.000 colonias, según el Registro Nacional de Propietarios de Colmenas (DIGEGRA-MGAP; Figura 1; (MGAP, 2022)). Uruguay es un país exportador de materias primas, y los productos apícolas no son la excepción. Aproximadamente 80% de la miel producida anualmente es exportada a la Unión Europea y Estados Unidos. Las ventas de miel alcanzaron los 35,3 millones de USD en 2021, siendo el mayor valor de los últimos 5 años (MGAP, 2022). Sin embargo, en 2022 hubo una drástica disminución en el precio de la miel exportada, generando severas repercusiones en el rubro (MGAP, 2022).

Más allá de las fluctuaciones económicas usuales, el sector apícola uruguayo enfrenta grandes desafíos, entre ellos, la pérdida de colonias, una grave problemática que afecta a las abejas alrededor del mundo.



Figura 1. Mapa del Uruguay mostrando la distribución geográfica de las colonias de abejas melíferas en el año 2021. Tomado de MGAP (2022).

1.3 Pérdida de colonias de abejas melíferas

En las últimas décadas la pérdida de colonias de abejas melíferas ha cobrado relevancia a nivel mundial. Se han desarrollado diversos programas con el fin de monitorear y cuantificar estas pérdidas. Algunos ejemplos son la encuesta del programa BIP (*Bee Informed Partnership*; beeinformed.org) en EEUU, la encuesta del COLOSS (*Prevention of Colony Losses*; coloss.org) en Europa, y la encuesta de SOLATINA (Sociedad Latinoamericana de Investigación en Abejas), en América Latina y el Caribe (Requier *et al.*, 2018). Estas encuestas han evidenciado la pérdida anual de hasta el 50% de las colonias en Estados Unidos (Aurell *et al.*, 2023), y algunos países de Latinoamérica (Requier *et al.*, 2023a). En Uruguay, las pérdidas rondan el 30% anual por apicultor (Antúnez *et al.*, 2017; Requier *et al.*, 2023a).

Entre las principales causas de la pérdida de colonias se encuentran la intoxicación con pesticidas, problemas nutricionales asociados a la expansión de los monocultivos, y la infección por múltiples plagas y patógenos (Goulson *et al.*, 2015). Las plagas y patógenos de mayor importancia son el ácaro *Varroa destructor* (Anderson y Trueman, 2000), varios virus ARN (Ball y Bailey, 1991), el hongo microsporidio *Nosema ceranae* (Fries *et al.*, 1996), la bacteria *Paenibacillus larvae*

(Heyndrickx *et al.*, 1996), y el tripanosomátido *Lotmaria passim* (Schwarz *et al.*, 2015).

1.4 Plagas y patógenos que afectan a la salud de las abejas melíferas

1.4.1 *Varroa destructor*

Varroa destructor es un ácaro que parasita a las abejas melíferas y es considerado la mayor amenaza para la apicultura actual (Rosenkranz *et al.*, 2010). A pesar de que el ácaro fue descrito por primera vez como un ectoparásito de *A. cerana* (Oudemans, 1904), *V. destructor* comenzó a parasitar abejas *A. mellifera* a mediados del siglo XX (Oldroyd, 1999). Actualmente tiene una distribución global, encontrándose en todos los continentes, incluido Australia (Australian Government, 2023; Wilfert *et al.*, 2016). Este fue el último gran territorio con abejas melíferas libres del ácaro, hasta que en 2022 fue reportado durante un monitoreo preventivo (Australian Government, 2023). Ninguna otra plaga o patógeno ha tenido un impacto comparable sobre la abeja melífera, sobre todo por el hecho de haber infestado un nuevo hospedero sin defensas innatas (Traynor *et al.*, 2020).

El ciclo de vida de *V. destructor* puede separarse en dos grandes fases, una fase reproductiva dentro de la celda de cría, donde la hembra fundadora pone los huevos; y una fase de dispersión o forética, donde las hembras maduras pueden transportarse por intermedio de las abejas adultas (Traynor *et al.*, 2020). Durante la fase reproductiva, las hembras fundadoras utilizan tanto celdas de obreras como de zánganos para generar descendencia (Rosenkranz *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha reportado que el ácaro prefiere parasitar celdas de zánganos (Fuchs, 1992; Figura 2), probablemente por el mayor tamaño de la celda (Message y Gonçalves, 1983), o el mayor período de reproducción en relación a la celda de obrera (Boot *et al.*, 1992).

La fase forética comienza cuando la abeja melífera emerge junto al ácaro hembra y sus hijas. Durante esta etapa las nuevas hembras se alimentan de su hospedero y

desarrollan su aparato reproductivo (Traynor *et al.*, 2020; Figura 2). El ciclo anual de *V. destructor*, y la proporción de ácaros en cría y forética, están relacionados al ciclo biológico anual de las abejas (Figura 3). Las colonias en el invierno consisten típicamente en abejas adultas, con muy pocas celdas de cría y bajos niveles de infestación con *V. destructor*. Luego, al comenzar a emerger nuevas abejas, la colonia expande rápidamente el número de abejas adultas y de cría. En primavera comienzan a aparecer celdas de zángano, que serán invadidas por el ácaro. Los niveles de *V. destructor* comienzan a aumentar porque las hembras fundadoras están en fase reproductiva. Para el final del verano, tanto la población de abejas como de cría comienza a bajar, y los niveles de infestación forética del ácaro aumentan. La colonia comienza a generar cría de invierno que serán abejas con mayor esperanza de vida y más cuerpos grasos. El ciclo comienza nuevamente cuando la colonia detiene la producción de abejas obreras durante el invierno, y la población de ácaros disminuye porque no tienen celdas en dónde reproducirse (Traynor *et al.*, 2020; Figura 3).

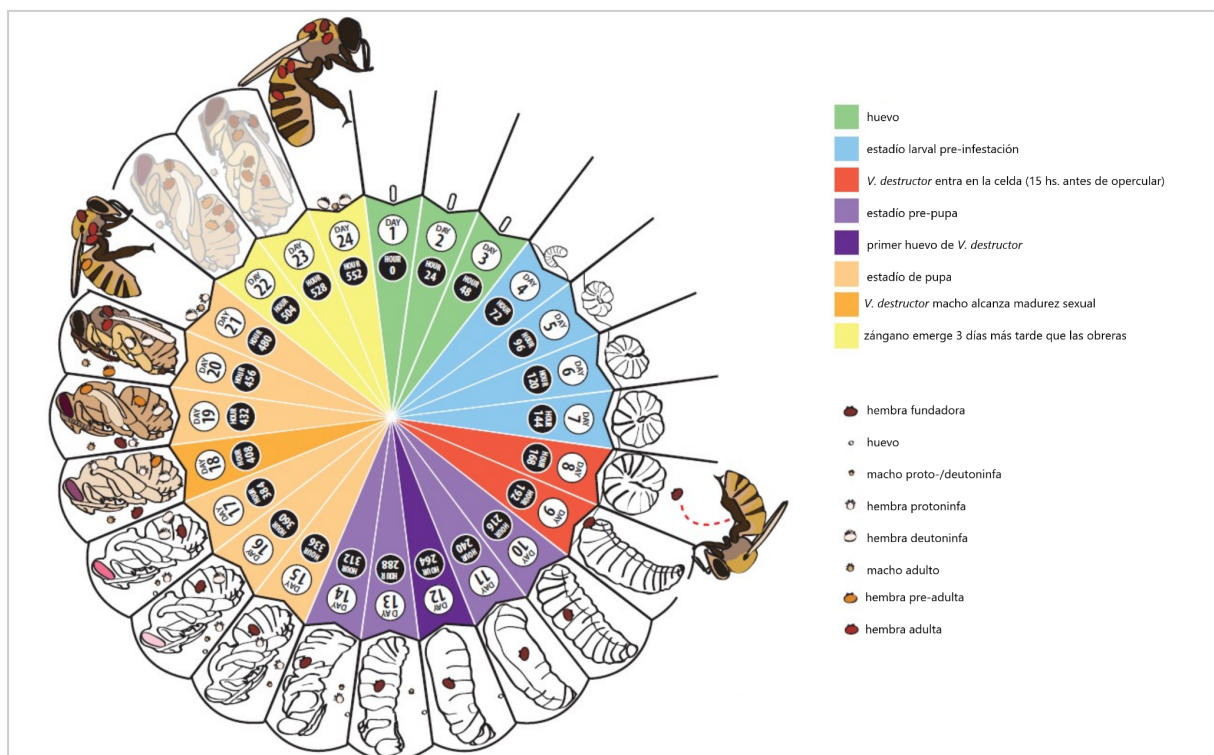


Figura 2. Ciclo de vida de *V. destructor* en sus dos fases: reproductiva y forética. Tomado y adaptado de Evans y Cook (2018).

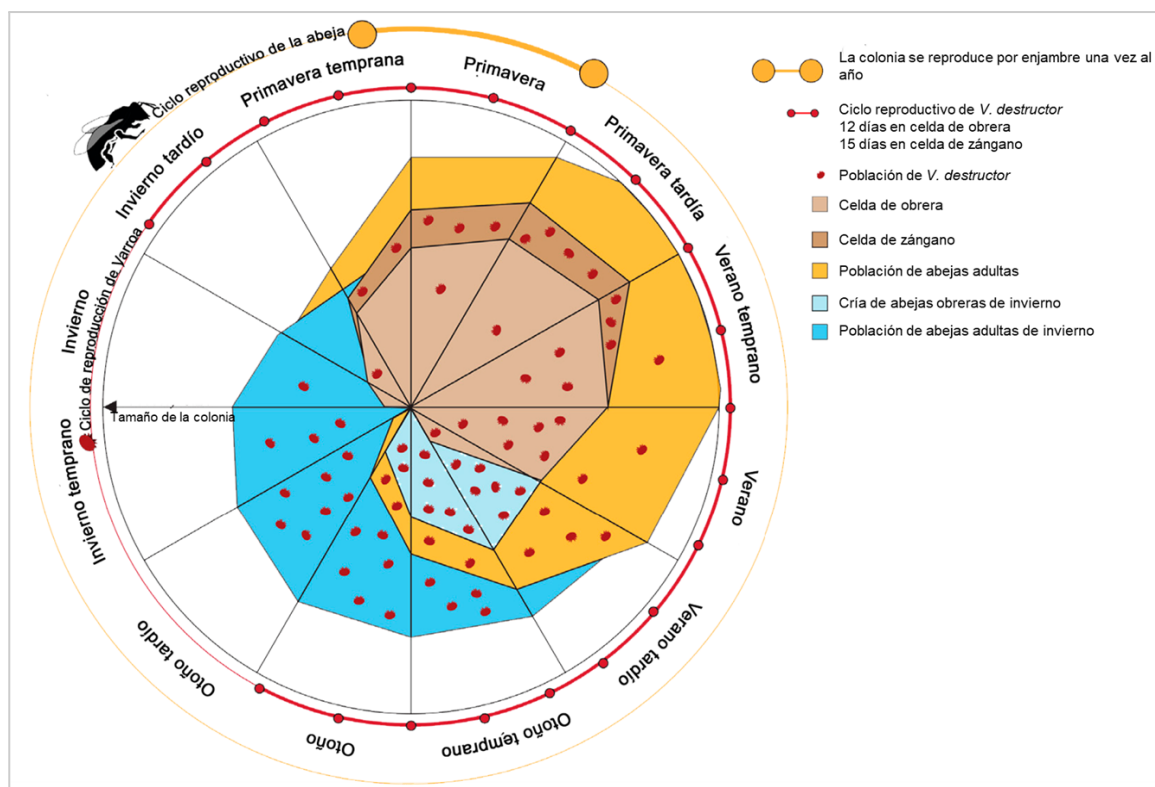


Figura 3. Esquema teórico del ciclo anual de una colonia de abejas melíferas con un invierno de 3 meses. Tomado y adaptado de Traynor *et al.*, (2020).

El ácaro no tiene alas ni ojos, y es incapaz de caminar distancias muy largas entre colonias de abejas separadas. La forma de transmisión se daría entonces por contacto entre abejas de distintas colonias, por ejemplo mediante el robo de miel a colonias debilitadas (Peck y Seeley, 2019).

Históricamente se creía que *V. destructor* se alimentaba solamente de la hemolinfa de la abeja, pero hace algunos años se comprobó que el ácaro consume principalmente los cuerpos grasos de la abeja (Ramsey *et al.*, 2019). Los cuerpos grasos son órganos fundamentales de almacenamiento de lípidos y síntesis proteica y de ácido úrico, interviniendo en la regulación hormonal y el sistema inmune de la abeja (Arrese y Soulages, 2010). El hecho de que *V. destructor* se alimente de este tejido de pupas en desarrollo implica una pérdida de peso, que tiene consecuencias en la eficiencia del vuelo más tarde (Schatton-Gadelmayer y Engels, 1988). También induce el debilitamiento del sistema inmune, lo que a su vez contribuye a una predisposición a infecciones por otros patógenos (Annoscia *et al.*, 2019; Wegener

et al., 2016; Yang y Cox-Foster, 2005). Además del daño directo que genera la infestación, *V. destructor* es también vector de virus que afectan a las abejas (Rosenkranz *et al.*, 2010), como el virus de las alas deformes (DWV) y el virus de la parálisis aguda (ABPV) (de Miranda *et al.*, 2010; Martin y Brettell, 2019).

Para intentar mantener bajos niveles de infestación, los apicultores tratan sus colonias con acaricidas. Los tratamientos disponibles para el control del ácaro se basan en el uso de acaricidas sintéticos, u orgánicos (Rosenkranz *et al.*, 2010). Los acaricidas sintéticos como la formamidina amitraz (Amitraz®) o flumetrina (Flumevar®, Bayvarol®), son sustancias que eliminan al ácaro a través de distintos mecanismos de acción. Hasta la década pasada, este tipo de acaricidas eran los preferidos por los apicultores para tratar sus colonias, debido a su fácil aplicación y conveniencia económica (Rosenkranz *et al.*, 2010). Sin embargo, muchos trabajos han reportado la aparición de resistencia de *V. destructor* a estos acaricidas (Almecija *et al.*, 2020; Beaurepaire *et al.*, 2017; Higes *et al.*, 2020; Maggi *et al.*, 2011; Milani, 1999; Rinkevich, 2020). Además, se ha reportado la presencia de residuos en cera, miel y otros productos de la colonia (Garrido *et al.*, 2013; Lodesani *et al.*, 2008; Martel *et al.*, 2007; Rosenkranz *et al.*, 2010; Tihelka, 2018; Ye *et al.*, 2020).

Esto ha fomentado el uso de acaricidas orgánicos (Calderone, 1999; Fries, 1989; Maggi *et al.*, 2016b; Ruffinengo *et al.*, 2014; vanEngelsdorp *et al.*, 2008). Este tipo de acaricidas incluyen aceites esenciales y compuestos como el ácido fórmico, oxálico, láctico y el timol. Además de haber demostrado ser eficientes, ofrecen muchas ventajas (Rosenkranz *et al.*, 2010), como el bajo riesgo de generar residuos y resistencia del ácaro (Bacandritsos *et al.*, 2007; Gregorc y Planinc, 2002; Nanetti *et al.*, 2003; Rademacher y Harz, 2006). Sin embargo, presentan la desventaja de que no penetran dentro de las celdas operculadas, lo que provoca una reducción considerable en su eficacia (de 90 a 60%) si se aplica cuando la colonia tiene cría (Rademacher y Harz, 2006; Rosenkranz *et al.*, 2010). En el caso del ácido oxálico, este problema se resolvió al utilizar tiras de celulosa impregnadas con el acaricida, que permite una liberación más lenta del producto, actuando sobre un mayor número de ácaros (Maggi *et al.*, 2016b).

En Uruguay, el ingreso de *V. destructor* se reportó en la década de 1970, y rápidamente se distribuyó a todo el país. En 2011 se estimó una prevalencia de

75,5% (Anido *et al.*, 2015; Figura 4).

En climas templados, como en el de Uruguay, muchas colonias de *A. mellifera* que no son tratadas con acaricidas no logran sobrevivir al invierno (Rosenkranz *et al.*, 2010). Si bien esto es así en gran parte del territorio, hay una región del país (Treinta y Tres) en la que las poblaciones de abejas sobreviven naturalmente a la infestación (Mendoza *et al.*, 2020). Estas abejas presentan un mayor comportamiento de *grooming* que las abejas de colonias susceptibles. Además se encontraron diferencias genéticas entre las poblaciones de abejas y del ácaro (Mendoza *et al.*, 2020).



Figura 4. Distribución del ácaro *V. destructor* en Uruguay en el año 2011. Tomado y adaptado de Anido *et al.* (2015).

1.4.2 Virus ARN

Los virus son agentes infecciosos intracelulares obligados, y dependen de la maquinaria celular para su replicación. En el caso de *A. mellifera*, se han descrito hasta el momento más de 80 virus (Beaurepaire *et al.*, 2020). Estos virus afectan a las abejas en distintos aspectos como su comportamiento, fisiología o hasta rasgos morfológicos. La patogenicidad de los virus es muy variable, y en algunos casos llegan a ser letales a nivel individual e incluso colonial (Beaurepaire *et al.*, 2020).

La mayoría de los virus que afectan a *A. mellifera* son virus ARN. Poseen una sola cadena de polaridad positiva (Bailey, 1971; de Miranda *et al.*, 2013), y su mecanismo de infección consiste en inyectar el material genético directamente en el citoplasma de la célula hospedera. Debido a la severidad de los síntomas que producen, los virus de mayor importancia sanitaria son: virus de la parálisis aguda (ABPV), virus de la celda real negra (BQCV), virus de la parálisis crónica (CBPV), virus de las alas deformes (DWV), virus de la cría ensacada (SBV), virus de la parálisis aguda israelí (IAPV) y el virus kashmir (KBV) (Chen y Siede, 2007).

Los virus ABPV, BQCV, KBV e IAPV fueron asignados a la familia Dicistroviridae, mientras que los virus DWV y SBV pertenecen a la familia Iflaviridae (Baker y Schroeder, 2008; de Miranda *et al.*, 2010). El virus CBPV aún no ha sido asignado a ninguna familia. En el caso de DWV, se han descrito 3 variantes: la A (Ryabov *et al.*, 2014), la B (Ongus *et al.*, 2004), y la C (Mordecai *et al.*, 2016). La variante A es la más prevalente y es la que se ha asociado a la pérdida de colonias (Francis *et al.*, 2013). Además, se ha descubierto que las tres variantes pueden estar presentes en el mismo hospedero, y que pueden recombinar formando híbridos (Dalmon *et al.*, 2017; Moore *et al.*, 2011).

Los virus ABPV, BQCV, CBPV, DWV y SBV pueden ser detectados por los apicultores por su clara sintomatología. Los síntomas que provocan son muy variables, pudiendo afectar la morfología, el desarrollo o el comportamiento, así como también los órganos blanco o qué partes de la abeja infectan (Tabla 1).

Tabla 1. Descripción de los órganos objetivos y síntomas de los principales virus de importancia sanitaria. Referencias: (Bailey, 1971; Bailey *et al.*, 1968; Bailey y Ball, 1991; Bailey y Woods, 1974; Benaets *et al.*, 2017; Chen y Siede, 2007; Lanzi *et al.*, 2006; McMahon *et al.*, 2016; Morse y Flottum, 1997) Tomado y adaptado de Beaurepaire *et al.* 2020.

Virus	Órgano objetivo	Síntomas
ABPV	Sistema nervioso, citoplasma de células lipídicas, cerebro y glándulas hipofaríngeas	Temblores, incapacidad de vuelo, pérdida de pelo en tórax y abdomen, mortandad alta con altas cargas virales
BQCV	Intestino	Larvas de reinas ligeramente amarillas con celdas que se tornan negras, pupas infectadas se vuelven marrones y mueren, esperanza de vida considerablemente menor
CBPV	Sistema nervioso, tracto digestivo, mandibular y glándulas hipofaríngeas	Síndrome 1: temblor en las alas y en el cuerpo, abdomen distendido, incapacidad de vuelo, agrupación en las áreas más cálidas de la colonia, muerte en pocos días. Síndrome 2: pérdida de pelo, más oscuras, apariencia oleosa, brillante, sufren ataques de mordisqueo por parte de las abejas sanas, mueren a los pocos días
DWV	Todo el cuerpo, incluidos los ovarios y los cuerpos grasos de la reina, la espermateca y vesículas seminales del zángano, los tejidos de las alas, la cabeza, el tórax, las patas, la hemolinfa y el intestino.	Alas arrugadas o ausentes, abdomen acortado, parálisis, duración de la vida adulta de las obreras y zánganos emergentes gravemente acortada, respuesta modificada a la sacarosa, aprendizaje y comportamiento de búsqueda de alimento deficiente.
SBV	Glándulas hipofaríngeas de las obreras, citoplasma de células lipídicas, células musculares y traqueales de las larvas	Falla en la pupa, larvas hinchadas llenas de partículas virales, forrajeo precoz, reducción de la esperanza de vida y actividades metabólicas

La transmisión de los virus en la colonia se puede dar de manera horizontal, entre abejas obreras, vertical, de la reina o zángano a la descendencia, o a través de vectores, como es el caso de *V. destructor* para los virus ABPV y DWV. Por este motivo, la dinámica estacional de estos virus está relacionada al ciclo anual del ácaro (Antúñez *et al.*, 2015; Ball, 1989). Por otro lado, el comercio de colonias y las prácticas apícolas también favorecen la diseminación de los virus, y provoca que actualmente presenten distribuciones prácticamente globales (Beaurepaire *et al.*, 2020).

En Uruguay están presentes los virus ABPV, BQCV, CBPV, DWV (solamente la variante A) y SBV, reportándose por primera vez entre los años 2005 y 2006

(Antúñez *et al.*, 2005, 2006; Mendoza *et al.*, 2020). Exceptuando el CBPV, estos virus fueron detectados en 2011 en muestras de todo el país, algunos con altas prevalencias (Anido *et al.*, 2015; Figura 5).

En cuanto a los virus IAPV y KBV, hasta el momento no han sido detectados en Uruguay (Anido *et al.*, 2015), aunque sí se han detectado en países de la región. El IAPV fue reportado para Argentina con 41% de prevalencia, y el KBV en Chile con prevalencias de entre 5 y 30% en distintas regiones del país (Reynaldi *et al.*, 2011; Riveros *et al.*, 2018).

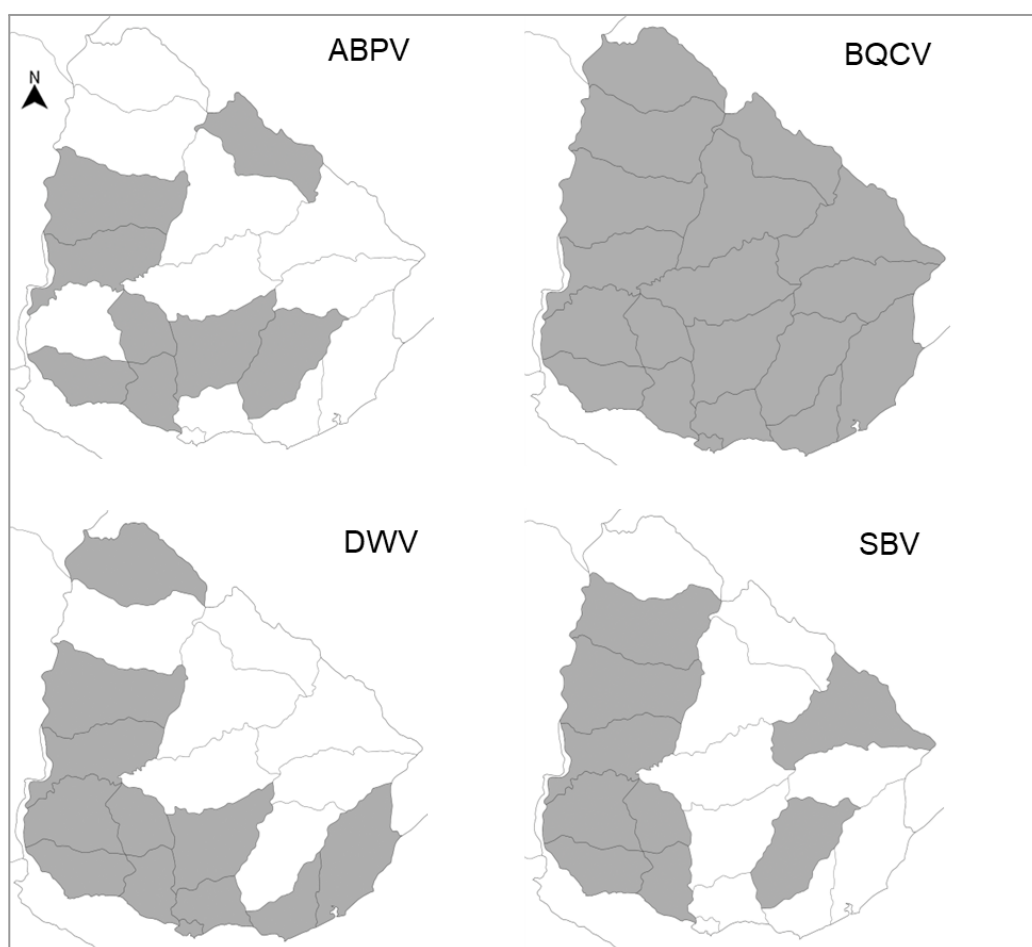


Figura 5. Distribución de los virus ABPV, BQCV, DWV y SBV en Uruguay en el año 2011. Tomado y adaptado de Anido *et al.* (2015).

1.4.3 *Nosema ceranae* y *Nosema apis*

Los hongos microsporidios son un grupo de parásitos eucariotas intracelulares obligados, formadores de esporas, y altamente sofisticados en su mecanismo de infección (Keeling y Fast, 2002; Texier *et al.*, 2010). Tienen una gran variedad de hospederos, y muchas especies causan daños a animales de producción (Texier *et al.*, 2010).

Nosema ceranae y *Nosema apis* son microsporidios que infectan a las abejas *A. mellifera* y *A. cerana*, y causan la enfermedad llamada “nosemosis” (Fries *et al.*, 1996; Higes *et al.*, 2006, 2007). Si bien las esporas de ambas especies lucen similares, las de *N. apis* son aproximadamente 2 μm más grandes (Chen *et al.*, 2009). Además, su genoma tiene distinto tamaño (Chen *et al.*, 2013; Cornman *et al.*, 2009), y generan diferente sintomatología en la colonia. La forma más confiable para determinar la especie es utilizando técnicas de biología molecular, mediante la amplificación específica de un fragmento del gen que codifica para el ARNr 16S (Martín-Hernández *et al.*, 2018).

Los microsporidios sobreviven al ambiente externo de su hospedero en forma de espora gracias a su gruesa pared (Texier *et al.*, 2010). En el caso de *N. apis* y *N. ceranae*, una vez que la abeja ingiere la espora (Figura 6A), esta se dirige al tejido epitelial del ventrículo o al intestino medio del hospedero (Figura 6B). Mediante un organelo especializado llamado tubo polar, inyecta su esporoplasma en el citoplasma de la célula epitelial (Figura 6C), donde se reproduce (Figura 6D-E). Finalmente las nuevas esporas formadas son liberadas al lumen del intestino para ser excretadas o re-infectar otras células del epitelio intestinal de la misma abeja (Fries *et al.*, 1996; Keeling y Fast, 2002; Figura 6F).

La forma más común de transmisión de este patógeno es horizontal vía fecal-oral (Fries, 2010), aunque también es posible el contagio mediante la trofalaxis (Smith, 2012), así como mediante productos de la colonia como cera, miel o polen (Higes *et al.*, 2008).

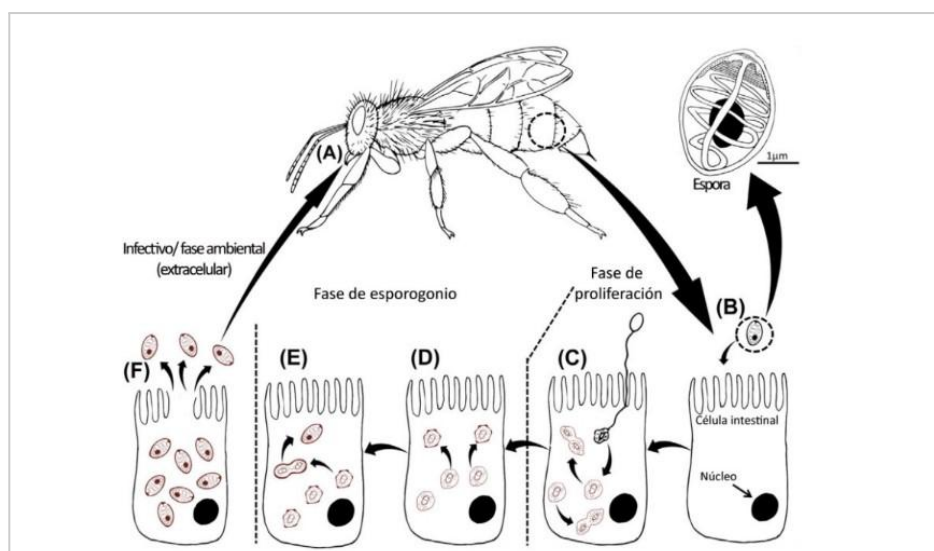


Figura 6. Representación del mecanismo de infección por *Nosema* spp. (A) Ingestión de las esporas; (B) Las esporas se encuentran con células epiteliales del intestino de la abeja y son activadas, provocando la extrusión del tubo polar y la inyección del esporoplasma en la célula hospedera. (C) Multiplicación celular (Fase de proliferación); (D y E) Transición de esporoplasma a espora (Fase de esporogonio); (F) Las esporas son liberadas al lumen intestinal, y se diseminan en el ambiente por intermedio de las heces o reinfectan células adyacentes del mismo individuo. Tomado y adaptado de Araújo y Hughes (2016).

Actualmente ambas especies de *Nosema* tienen una distribución global (Martín-Hernández *et al.*, 2018). Sin embargo, en Uruguay solo se ha detectado *Nosema ceranae*, presente en *A. mellifera* al menos desde 1990 y en abejorros nativos del género *Bombus* desde 2010 (Arbulo *et al.*, 2015; Invernizzi *et al.*, 2009). En el monitoreo nacional de plagas y patógenos de *A. mellifera* realizado en 2011, se observó que *N. ceranae* tenía una prevalencia de 14,6% y una amplia distribución (Anido *et al.*, 2015; Figura 7).

En nuestro país la nosemosis es una problemática principalmente asociada al estrés nutricional. Año a año se observa que cuando los apicultores trasladan sus colonias a forestaciones de *Eucalyptus grandis* en febrero, para aprovechar su floración y extender la temporada productiva, las abejas se infectan con *N. ceranae*. El estrés nutricional que sufren en estas condiciones al alimentarse con un polen bajo en proteínas y lípidos, y con desbalance de aminoácidos, promueve la infección por el microsporidio, y repercute en la salud de la colonia (Branchiccela *et al.*, 2019; Castelli *et al.*, 2020; Mendoza *et al.*, 2013).

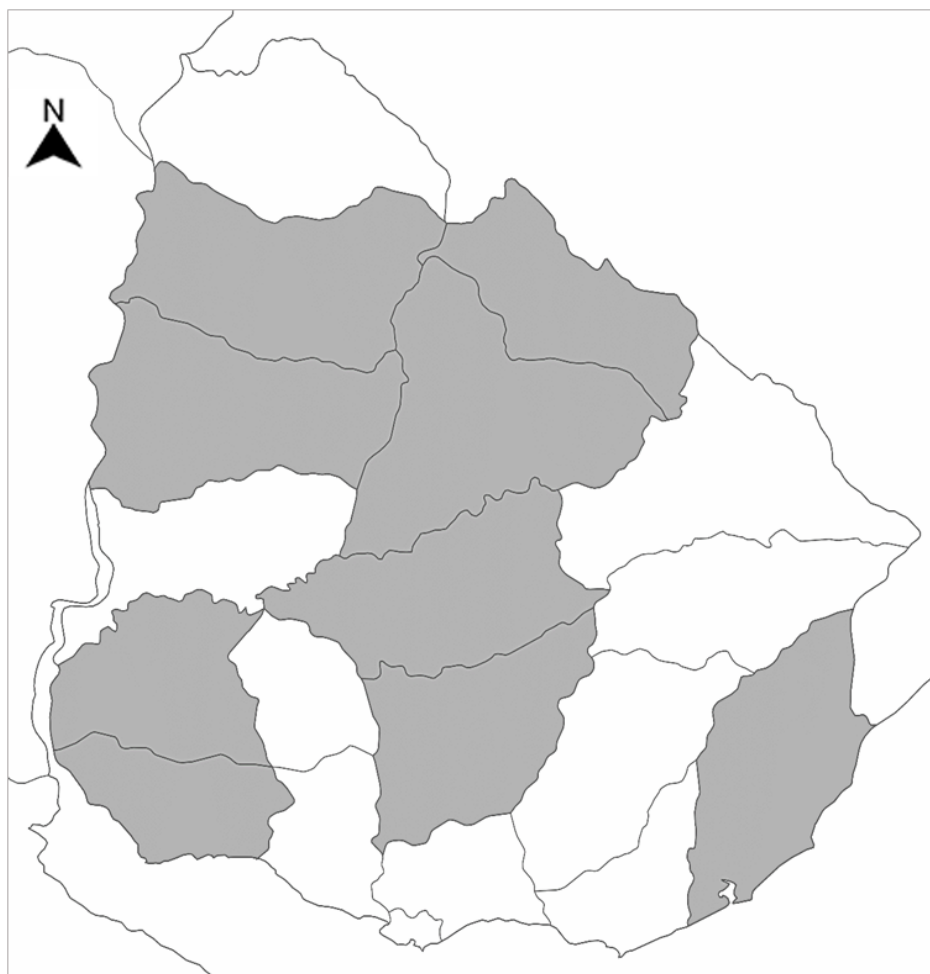


Figura 7. Distribución del microsporidio *N. ceranae* en Uruguay en el año 2011. Tomado y adaptado de Anido *et al.* (2015).

1.3.4 *Paenibacillus larvae*

Paenibacillus larvae es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa, catalasa negativa, formadora de endosporas y agente causal de la Loque Americana. Esta enfermedad afecta a la cría de las abejas melíferas a nivel mundial y es considerada letal y altamente contagiosa (Genersch *et al.*, 2006).

La transmisión de esta bacteria se da mediante esporas, al ingerir alimento contaminado (Figura 8B). Las larvas son más susceptibles a contraer la infección en las primeras 24 horas luego de la eclosión del huevo, siendo menos probable que la infección se de naturalmente luego de este período (Brødsgaard *et al.*, 1998). Las

esporas germinan en el intestino de la larva y a partir de ahí la bacteria se reproduce de manera exponencial (Figura 8C). En una etapa avanzada de la infección las bacterias atraviesan el epitelio intestinal y llegan al hemocelo (Yue *et al.*, 2008). Luego la larva muere y cobra un aspecto viscoso, y finalmente se reseca tomando la forma de escama (Hansen y Brødsgaard, 1999; Figura 8D-E). *Paenibacillus larvae* posee diferentes factores de virulencia, un ejemplo de ello son las metaloproteasas, que resultan altamente tóxicas e inmunogénicas para la larva (Antúnez *et al.*, 2009b, 2010, 2011).

Las esporas se transmiten de manera horizontal entre individuos de la colonia y entre colonias (Hornitzky, 1998). La actividad apícola también favorece la diseminación de las esporas entre las colonias, a través del equipo de protección del apicultor, así como las herramientas que utiliza al trabajar (Genersch, 2010; Hansen y Brødsgaard, 1999). Las buenas prácticas apícolas son esenciales para la prevención de la enfermedad. Además, la presencia de la bacteria puede ser monitoreada preventivamente sin tener que manipular las colonias utilizando como matriz los productos de la colonia como miel, polen o cera (Govan *et al.*, 1999).

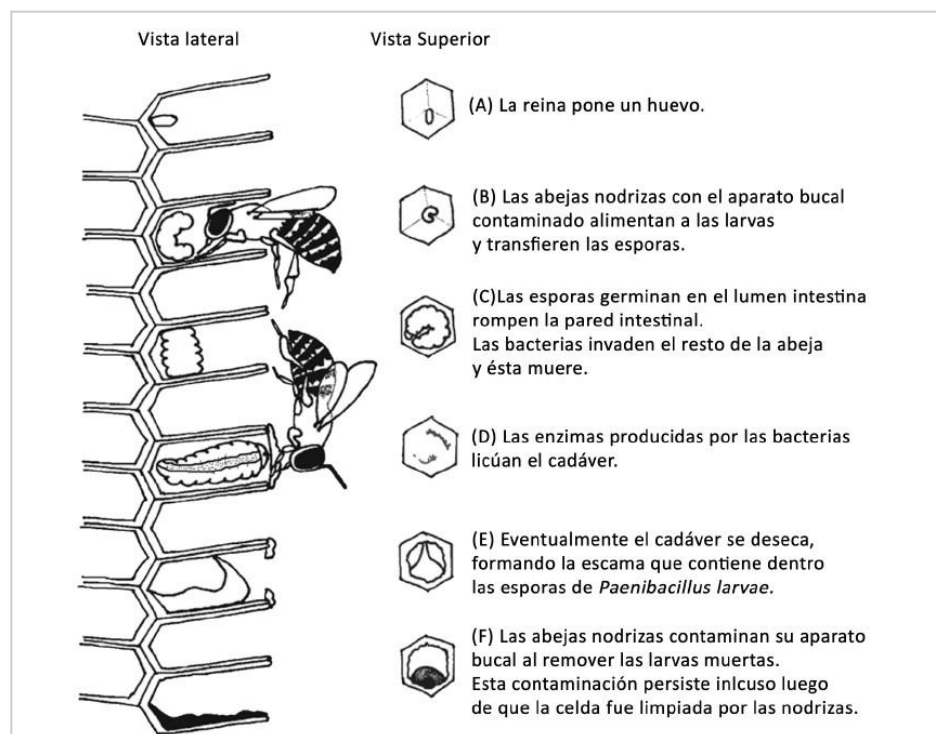


Figura 8. Ciclo de infección de *Paenibacillus larvae* en una colonia de *A. mellifera*, a la izquierda está representada la vista lateral y a la derecha la vista superior. Tomado y adaptado de James y Li (2012).

Paenibacillus larvae tiene actualmente una distribución mundial. En Sudamérica fue reportada por primera vez en Argentina en el año 1989, a partir de una colonia con claros síntomas de Loque Americana (Alippi, 1992b) y rápidamente se distribuyó a todo el país (Alippi, 1996). Diez años después, en 1999, se reportó por primera vez en Uruguay en mieles de exportación (OIE, 1999). Posteriormente fue detectada en larvas y en abejas adultas de colonias con y sin síntomas de los departamentos del litoral oeste del país (Piccini y Zunino, 2001).

Con el objetivo de monitorear la presencia de *P. larvae* en Uruguay, en los años 2001-2002 se tomaron muestras de miel de colonias de todos los departamentos del país. En este primer monitoreo se encontró una alta prevalencia (51%) y una amplia distribución, detectándose la bacteria en gran parte del país (Antúnez *et al.*, 2004) (Figura 9). Luego de una fuerte campaña de divulgación del MGAP con apicultores, de las recomendaciones de realizar vigilancias periódicas de la cría, y quema y enterramiento de las colonias infectadas, en 2011 se repitió el estudio, encontrando una prevalencia considerablemente menor (2%), indicando que las recomendaciones resultaron efectivas.

Si bien el análisis de miel colectada de colonias productivas es una estrategia muy útil para monitorear la presencia y distribución de la bacteria a nivel nacional y prevenir la aparición de brotes, el muestreo en todo el país consume tiempo y dinero. Como alternativa, entre los años 2014 y 2019 se colectaron y analizaron muestras de tanques de miel de exportación, que concentran miel de muchas colonias del mismo apicultor. Los resultados muestran un aumento paulatino en la distribución de la bacteria en el territorio uruguayo (Figura 9), evidenciando la importancia del monitoreo continuo para evitar la aparición de brotes, Palacios *et al.* (*paper* en preparación).

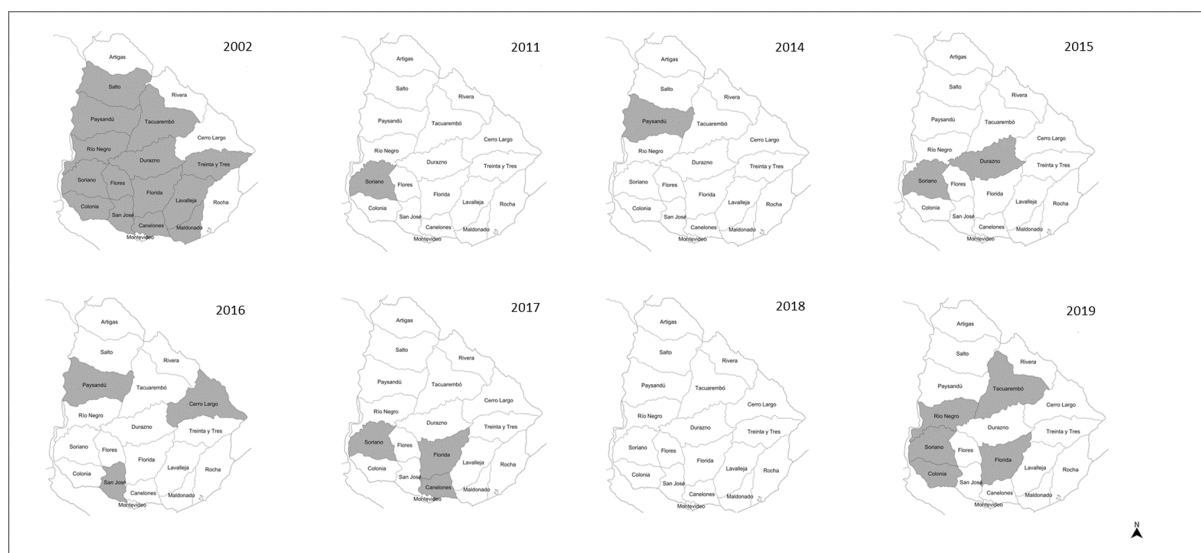


Figura 9. Distribución de *P. larvae* en Uruguay en los años 2002, 2011 y 2014 a 2019. Tomado de Palacios *et al.* (*paper* en preparación).

1.3.5 *Lotmaria passim*

El tripanosomátido *Lotmaria passim* es un parásito unicelular obligado que se aloja en el intestino de las abejas *A. mellifera* y *A. cerana* (Schwarz *et al.*, 2015). Históricamente tratado como una misma especie junto al tripanosomátido *Crithidia mellificae*, *L. passim* fue reclasificado taxonómicamente por Schwarz *et al.* (2015). Este patógeno genera daño en las abejas (Buendía-Abad *et al.*, 2022; Gómez-Moracho *et al.*, 2020; Ravoet *et al.*, 2013; Schwarz y Evans, 2013), y podría actuar en sinergia con otros patógenos, como *N. ceranae* o *V. destructor* para aumentar el daño (Arismendi *et al.*, 2020; Vejnovic *et al.*, 2018). Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo exacto de infección de *L. passim*, ni la consecuencia que el nivel de infección puede llegar a tener en la colonia.

Lotmaria passim está ampliamente distribuido a nivel mundial, encontrándose presente en Europa, Norteamérica, Asia, Sudamérica y Oceanía (Castelli *et al.*, 2019; Quintana *et al.*, 2021; Schwarz *et al.*, 2015; Waters, 2018; Williams *et al.*, 2019; Yamamoto *et al.*, 2023).

En Uruguay, *L. passim* está presente al menos desde el año 2007, y en 2011 la prevalencia nacional fue de 13% (Castelli *et al.*, 2019). Las muestras positivas pertenecieron a los departamentos de Tacuarembó, Río Negro, San José, Florida y Paysandú. En 2015, se observó que *L. passim* también estaba presente en colonias de los departamentos de Colonia y Florida, y que en estos apiarios, su prevalencia fue mayor en los meses de julio y septiembre respecto a la de marzo (Arredondo *et al.*, 2023; Branchiccela *et al.*, 2019).

En busca de estrategias para controlar la infección por este patógeno, estudios de nuestro grupo evaluaron dos estrategias alternativas (nutricional y con probióticos), aunque no se encontraron diferencias significativas entre colonias con distinto régimen nutricional (Branchiccela *et al.*, 2019) y la administración de probióticos no disminuyó su prevalencia (Arredondo *et al.*, 2023).

2. Hipótesis y objetivos

Hipótesis: Las principales plagas y patógenos de importancia apícola se encuentran presentes en el país pudiendo encontrarse asociados, dando lugar a patrones de coinfección.

Objetivo general: Evaluar la presencia, prevalencia y distribución de las plagas y patógenos más importantes para las colonias de *A. mellifera* del país.

Objetivos específicos:

1. Determinar la presencia, prevalencia y distribución de las principales plagas y patógenos en muestras de todo el país: el ácaro *Varroa destructor*, los microsporidios *Nosema apis* y *Nosema ceranae*, la bacteria *Paenibacillus larvae*, el tripanosomátido *Lotmaria passim* y los virus ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV y SBV.
2. Cuantificar los niveles de infestación de *V. destructor*, *N. ceranae* y virus ARN.
3. Estudiar la relación entre los patógenos y con la fortaleza de la colonia.

3. Materiales y métodos

3.1 Diseño de muestreo

En el año 2021 se llevó a cabo un muestreo a nivel nacional en un total de 100 colonias de abejas melíferas. El diseño de muestreo se basó en la proporción de colonias presentes en cada departamento del país. Para esto se tomaron los datos del Registro Nacional de Propietarios de Colmenas correspondiente a septiembre del año 2020 (Dirección General de la Granja - Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca; DIGEGRA-MGAP), y se seleccionó al menos 1 colonia por departamento (Tabla 2; Figura 10). Las colonias de cada departamento se seleccionaron al azar y se obtuvo el consentimiento de los apicultores. Los apiarios seleccionados debían cumplir con los requisitos de estar inscritos en el Registro Nacional de Propietarios de Colmenas (DIGEGRA-MGAP) y no practicar trashumancia.

Tabla 2. Cantidad de colonias en 2020 y cantidad de muestras tomadas por departamento en Uruguay en 2021.

Departamentos	Cantidad de colonias (2020)	Cantidad de muestras
Artigas	6.953	1
Canelones	21.696	4
Cerro Largo	16.242	3
Colonia	64.624	11
Durazno	23.799	4
Flores	27.007	5
Florida	36.427	6
Lavalleja	8.433	1
Maldonado	11.221	2
Montevideo	1.791	1
Paysandú	66.554	12
Río Negro	65.331	12
Rivera	44.141	8
Rocha	9.267	2
Salto	13.708	2
San José	50.987	9
Soriano	74.128	13
Tacuarembó	18.754	3
Treinta y Tres	4.591	1
Totales	565.654	100

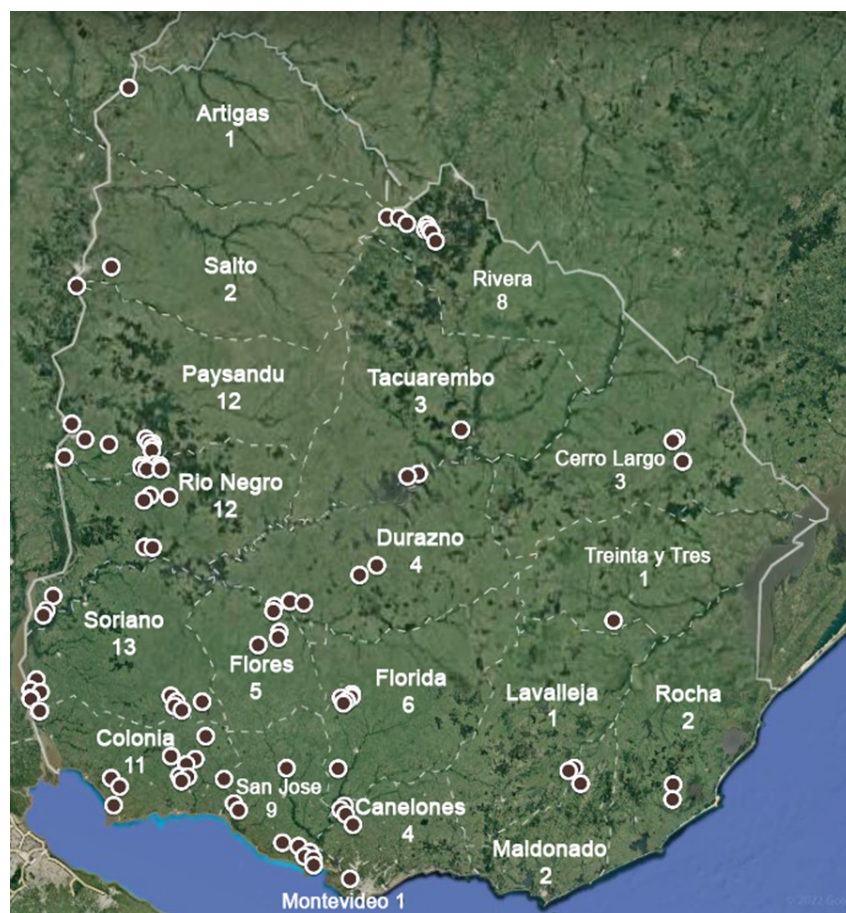


Figura 10. Mapa de Uruguay con distribución de los apiarios muestreados en el año 2021. Los puntos marrones representan la geolocalización de los apiarios, y los números indican el número de muestras tomadas por Departamento.

El muestreo se llevó a cabo entre marzo y julio del año 2021 (Figura 11). La visita a los apiarios seleccionados estuvo a cargo de Juan Campá, técnico de la Sección Apicultura de la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE - MGAP).

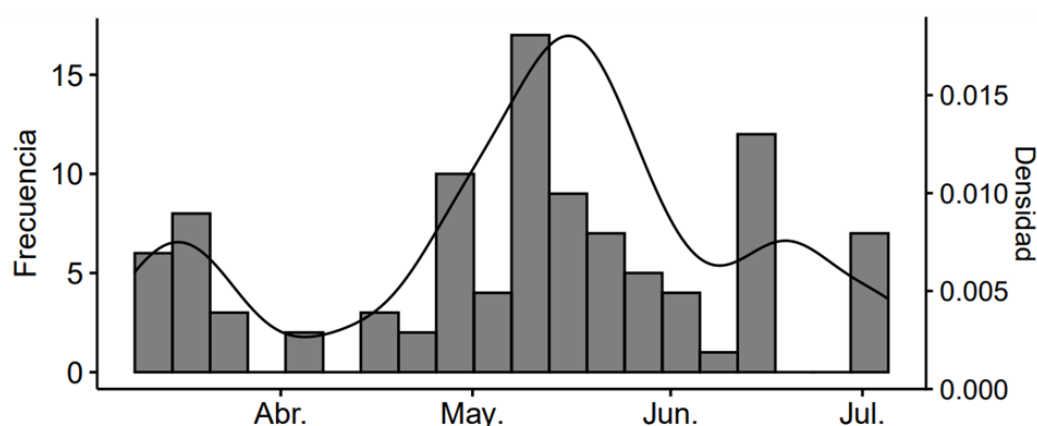


Figura 11. Histograma de frecuencia y gráfico de densidad de fechas de muestreo del año 2021. En el eje Y de la izquierda está representada la frecuencia absoluta, y en el de la derecha la densidad. En el eje X se encuentran los meses del año 2021.

3.2 Toma de muestras y estimación de fortaleza de colonia

Dentro de cada apiario se seleccionó una colonia al azar y se colectaron en frascos independientes muestras de miel, abejas nodrizas ($n=100$) y pecoreadoras ($n=100$) en etanol 95°, que fueron conservadas a 4°C para evitar la degradación de los tejidos hasta su análisis. A su vez, se colectaron muestras de abejas nodrizas ($n=50$) en sobres de papel manila y se mantuvieron vivas hasta llegar al laboratorio (Figura 12). Se almacenaron a -80°C con el fin de evitar la degradación del ARN viral. Se consideraron abejas nodrizas aquellas cercanas al nido de cría, y abejas pecoreadoras, abejas de interior pero tomadas de cuadros alejados del nido (Fries *et al.*, 2013).

En paralelo a la toma de muestras se registró la presencia de síntomas visibles de enfermedades y el tratamiento empleado para el control de *V. destructor*. Además, se registró la fortaleza de la colmena mediante la estimación de la población de abejas adultas, cantidad de cría y de miel en cantidad de cuadros completos (de tipo Langstroth), siguiendo el método de estimación visual recomendado por Delaplane *et al.* (2013). Finalmente se incluyó información general del apiario, como densidad de colonias y georeferenciación.

3.4 Detección y cuantificación relativa de virus ARN

En este estudio se analizaron algunos virus ARN de importancia sanitaria (ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV y SBV). Para esto, se retiraron las abejas del freezer -80°C y se pusieron inmediatamente en hielo. Se tomó un pool de 20 abejas por muestra y se homogeneizaron con 10 ml de H₂O destilada estéril en un Stomacher® 80 LabBlender (Seward, RU) a máxima velocidad por 120 segundos. Luego el homogeneizado se filtró con gasas esterilizadas en un tubo falcon de 50 ml. Se realizó una primera centrifugación a 1.500 g durante 10 min. a 4°C y luego una segunda a 12.000 g por 15 min. a 4°C. El sobrenadante obtenido se empleó para la extracción de ARN.

La extracción de ARN se realizó con un sistema automatizado (PurePrep 32-Molgen) y el kit comercial *PurePrep® Viral Pathogen Kit* (Molgen– Ref. OE00171000). Para eliminar el ADN genómico y conservar sólo el ARN, se realizó la digestión con DNasa con el kit *DNase I Amplification Grade* (Invitrogen™, EEUU). Una vez obtenido el ARN, se realizó una retrotranscripción para obtener ADNc utilizando el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems™, EEUU).

La detección de los virus se realizó mediante qPCR utilizando el kit comercial *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems™, EEUU) y *primers* específicos para los virus (Tabla 3). Junto con los virus, también se amplificaron los genes β -actina y RPS5 (subunidad menor de la proteína ribosomal) como genes de referencia de la abeja para la posterior cuantificación relativa (Tabla 3). La mezcla para una reacción de qPCR consistió en 10 μ l de *Power SYBR® Green PCR Master Mix*, 0,12 μ l de cada *primer* del par (50 μ M), 7,76 μ l de agua libre de RNasas y 2 μ l de una dilución 1:10 del ADNc obtenido. El programa de ciclado se muestra en la tabla 4.

Tabla 3. *Primers* utilizados para la detección y cuantificación por qPCR de los distintos virus ARN que afectan a las abejas melíferas.

Detección	Primer	Secuencia 5'-3'	Gen	Referencia
<i>Gen de referencia</i>	RPS5-F	AATTATTGGTCGCTGGAATTG	Subunidad menor de la proteína ribosomal	Evans (2006)
	RPS5-R	TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA		
<i>Gen de referencia</i>	□-actina-F	ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG	□-actina	Yang y Cox-Foster (2005)
	□-actina-R	GACCCACCAATCCATACGGA		
<i>DWV</i>	DWV-F	CTGTATGTGGTGTGCCTGGT	Poliproteína	Kukielka et al. (2008)
	DWV-R	TTCAAACAATCCGTGAATATAGTGT		
<i>ABPV</i>	ABPV-F	ACC GAC AAA GGG TAT GAT GC	ABPV	Johnson et al. (2009)
	ABPV-R	CTT GAG TTT GCG GTG TTC CT		
<i>CBPV</i>	CBPV-F	CAACCTGCCTCAACACAG	CBPV	Locke et al. (2012)
	CBPV-R	AATCTGGCAAGGTTGACTGG		
<i>BQCV</i>	BQCV-F	AAG GGT GTG GAT TTC GTC AG	BQCV	Kukielka et al. (2008)
	BQCV-R	GGC GTA CCG ATA AAG ATG GA		
<i>SBV</i>	SBV-F	GGG TCG AGT GGT ACT GGA AA	SBV	Johnson et al. (2009)
	SBV-R	ACA CAA CAC TCG TGG GTG AC		
<i>IAPV+KBV</i>	KIABPV-B6 707	CTGAATAATACTGTGCGTATC		Locke et al. (2012)
<i>KBV</i>	KBV-F6639	CCATACCTGCTGATAACC	KBV	
<i>IAPV</i>	IAPV-F6627	CCATGCCTGGCGATTAC	IAPV	
<i>DWV</i>	DWV-F1	TAC TAG TGC TGG TTT TCC TTT	DWV	Kevill et al. (2019)
<i>DWV-A</i>	DWV-A-R1	CTC ATT AAC TGT GTC GTT GAT	DWV-A	
<i>DWV-B</i>	DWV-B-R1	CTC ATT AAC TGA GTT GTT GTC	DWV-B	
<i>DWV-C</i>	DWV-C-R1	ATA AGT TGC GTG GTT GAC	DWV-C	

Tabla 4. Programa de ciclado de qPCR para la detección de virus ARN.

	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Preincubación	10 minutos	95°C	
	15 segundos	95°C	
Amplificación	30 segundos	ABPV, BQCV: y DWV: 50°C; CBPV: 60°C; SBV: 46°C	40x
	30 segundos	60°C	
Melting curve		65-95°C	

En cada corrida se analizaron las muestras por duplicado, y se incluyeron dos controles negativos. Además, se incluyó una curva estándar construida a partir de la mezcla de 2 µl de ADNc de cada muestra, y 4 diluciones seriadas 1:5. Cada muestra de la curva se analizó por triplicado y esto se empleó para determinar la eficiencia de la amplificación.

Para la normalización entre las muestras se calculó la media geométrica de la expresión de los genes de referencia α -actina y RPS5. Además se tomó como muestra calibradora aquella que presentó el Ct más alto (menor carga viral) para cada virus.

Para la cuantificación de la carga viral se utilizó el método de cuantificación relativa de Pfaffl (2001) según su fórmula:

$$radio = \frac{Ef_{gen\ de\ interés}^{[Ct\ muestra\ calibradora - Ct\ muestra\ de\ interés]}}{Ef_{gen\ de\ referencia}^{[Ct\ muestra\ calibradora - Ct\ muestra\ de\ interés]}}$$

Las cargas virales calculadas se transformaron y representaron como $\log_{10}(X+1)$.

3.5 Detección y conteo de esporas de *Nosema* spp.

Para el conteo de esporas se realizó un pool de 60 abdómenes de abejas pecoreadoras de una misma colonia, conservadas en etanol 95°. Los abdómenes se disecaron sujetando cada abeja con una pinza estéril y desprendiendo el abdomen. Estos se homogeneizaron con 60 ml de H₂O destilada estéril (1 ml por cada abdomen) en el Stomacher® 80 LabBlender (Seward, RU) a máxima velocidad por 120 segundos. Finalmente se tomaron 10 µl de ese homogeneizado, y se colocaron en la cámara de Neubauer *improved* para el conteo de esporas (Fries *et al.*, 2013). Se utilizó un microscopio Nikon a un aumento de 400x. Las esporas se identificaron claramente gracias a las propiedades de refracción que poseen (Fries *et al.*, 2013).

Se contaron esporas en 5 cuadrantes de la cámara y luego se calculó el número total de esporas por abeja según Human *et al.* (2013) y que se detalla a continuación:

$$\text{Número de esporas/abeja} = \frac{\text{Nº esporas contadas} * \text{factor de dilución}}{\text{Área de los cuadros contados} * \text{Profundidad de la cámara}}$$

Posteriormente, se realizó la detección y determinación de la especie mediante biología molecular. Para ello se tomaron 20 abejas pecoreadoras de cada muestra, conservadas en etanol 95°. Las abejas se homogeneizaron con 10 ml de H₂O destilada estéril en el Stomacher® 80 LabBlender (Seward, RU) a máxima velocidad por 120 segundos. A partir de ese homogeneizado se procedió a la extracción de ADN con el kit comercial QIAamp® DNA Mini and Blood Mini (Qiagen, Alemania), adaptándose el protocolo que parte de tejidos y purificación de sangre.

Una vez obtenido el material genético, se llevó a cabo una reacción PCR Multiplex utilizando el protocolo descrito por Martín-Hernández *et al.* (2007). Esta reacción permite la detección de *N. apis* y *N. ceranae* en simultáneo, ya que el diseño de los *primers* produce amplicones de distintos tamaños para cada especie (Tabla 5). La mezcla para una reacción con volumen final de 25 µl consistió en 16,5 µl de H₂O, 2,5 µl de PCR *buffer* (1 X), 1,5 µl de MgCl₂ (3 mM), 1 µl de dNTPs (0,4 mM), 0,2 µl de

cada par de *primers* (0,4 µM), 0,2 µl de *Taq* ADN polimerasa (1 U; Invitrogen™, Life Technologies, Brasil) y 2,5 µl de ADN. El programa de ciclado se muestra en la tabla 6.

Tabla 5. *Primers* utilizados en los ensayos de PCR para la identificación de los distintos patógenos.

Detección	Primer	Secuencia 5'-3'	Amplicón (pb)	Gen	Referencia
<i>P. larvae</i>	PL4 -F	CGAGCGGACCTTGTGTTTCC	700	16S	Piccini et al. (2002)
	PL5 -R	TCAGTTATAGGCCAGAAAGC			
<i>N. ceranae</i>	NCER-F	CGGCGACGATGTGATATGAAA ATATAA	218	16S	Martín-Hernández et al. (2007)
	NCER-R	CCCGGTCATTCTCAAACAAAA AACCG			
<i>N. apis</i>	NAPIS-F	GGGGGCATGTCTTTGACGTAC TATGTA	321	16S	
	NAPIS-R	GGGGGGCGTTTAAAATGTGAA ACAACATG			
<i>L. passim</i>	Lp2-F	AGGGATATTTAAACCCATCGAA	459	SSU ARNr	Arismendi et al., (2016)
	Lp2-R	ACCACAAGAGTACGGAATGC			

Tabla 6. Programa de ciclado de PCR-multiplex para la detección simultánea de *N.apis* y *N. ceranae*.

	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Preincubación	2 minutos	94°C	
Amplificación	15 segundos	94°C	10x
	30 segundos	61,8°C	
	45 segundos	72°C	
	15 segundos	94°C	
Amplificación	30 segundos	1,8°C	20x + 5 segundos en cada ciclo
	50 segundos	72°C	
Extensión final	7 minutos	72°C	

Finalmente para visualizar el resultado de la PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Este alto porcentaje de agarosa permite la distinción entre los amplicones de ambas especies, que difieren en aproximadamente 100 pb (218 pb *N. ceranae* y 321 pb *N. apis*).

3.6 Detección de *Paenibacillus larvae* en mieles

La detección de esporas de *P. larvae* se analizó de forma individual a partir de las muestras de miel, siguiendo el protocolo de la Organización Mundial de Sanidad Animal (2023). Brevemente, se homogeneizaron 20 ml de miel con 20 ml de PBS estéril. Cada muestra se centrifugó a 6.000 g por 40 minutos a temperatura ambiente con el fin de concentrar las esporas. Se descartó el sobrenadante excepto por 3 ml, en el que se resuspendió el pellet. Luego, 1 ml de esa suspensión se transfirió a un tubo Eppendorf y se incubó por 10 minutos a 80°C para activar la germinación de las esporas. Luego se realizó una dilución 1:10 en PBS estéril y se sembraron 100 µl de las suspensiones concentradas y diluidas por duplicado en medio de cultivo semiselectivo J agar (extracto de levadura 1,5%, Glucosa 0,2%, Triptona 0,5%, agar 1,2%, sal K₂HPO₄ a 0,3g/ml). El medio se suplementó con ácido nalidíxico (300µl/100 ml de medio J) para inhibir el crecimiento de *Paenibacillus alvei*

(Hornitzky y Nicholls, 1993; Nordström y Fries, 1995). Las muestras se incubaron a 37°C en condiciones de microaerofilia durante 4 días.

Las colonias obtenidas se analizaron por microscopía óptica y mediante la prueba bioquímica de producción de catalasa (Alippi, 1992a). Aquellas colonias que presentaron las características descritas para *P. larvae* se aislaron y almacenaron a -80°C en criotubos con caldo J suplementado con glicerol (20%). Finalmente la identidad de los aislamientos se confirmó mediante PCR.

Para esto los aislamientos sospechosos se sembraron en medio J agar y se incubaron durante 48 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia. Luego se preparó una suspensión bacteriana en 0,5 ml de H₂O estéril y se incubó a 95°C durante 15 minutos para lisar las células. A continuación se centrifugó a 4.500 g durante 5 minutos, y se conservó el sobrenadante, que se empleó para realizar la PCR. y se amplificó un fragmento del gen que codifica para el ARNr 16S de *P. larvae* empleando los *primers* específicos descritos por Piccini *et al.* (2002; Tabla 5). La mezcla para 25 µl de reacción consistió en 18,3 µl de H₂O, 2,5 µl de PCR *buffer* (1X), 1,5 µl de MgCl₂ (3mM), 0,5 µl de dNTPs (200 µM), 0,5 µl de cada *primer* (0,4 µM), 0,2 µl de *Taq* ADN polimerasa (1 U; Invitrogen™, Life Technologies, Brasil) y 1 µl de ADN. El programa de ciclado se muestra en la tabla 7.

Posteriormente los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8%, observando en los casos positivos un fragmento de 700 pb correspondiente a *P. larvae*.

Tabla 7. Programa de ciclado de PCR para la detección de *P. larvae*.

	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Preincubación	1 minuto	95°C	
	1 minuto	93°C	
Amplificación	30 segundos	55°C	30x
	1 minuto	72°C	
Extensión final	5 minutos	72°C	

3.7 Detección molecular de *Lotmaria passim*

Para la detección de *L. passim* se utilizó el mismo material genético extraído para la detección de *Nosema* spp. A partir de ese ADN se realizó una PCR, la mezcla para 25 µl de reacción consistió en 19,3 µl de H₂O, 2,5 µl de PCR *buffer* (1X), 1 µl de MgCl₂ (2mM), 0,6 µl de dNTPs (250 µM), 0,2 µl de *primers* (0,4 µM) (Tabla 8), 0,2 µl de *Taq* ADN polimerasa (1 U; Invitrogen™, Life Technologies, Brasil) y 1 µl de ADN. Las condiciones se muestran en la tabla 8.

Posteriormente, los amplicones se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,5%.

Tabla 8. Programa de ciclado de PCR para la detección de *L. passim*.

	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Preincubación	3 minuto	94°C	
	30 segundos	94°C	
	20 segundos	60°C	35x
Amplificación	45 segundos	72°C	
Extensión final	7 minutos	72°C	

3.8 Regionalización del país

Con el fin de evaluar la prevalencia de los patógenos en distintas zonas del país, y tomando como referencia el trabajo de Anido *et al.* (2015), se dividió al país en cuatro regiones: norte, sur, este y oeste. En la Tabla 9 se muestran los departamentos incluidos en cada región y el número de colonias de cada una.

Tabla 9. Regiones del país con los departamentos y número de colonias correspondientes a cada una.

norte		sur		este		oeste	
Departa- mento	Colonias (n)	Departa- mento	Colonias (n)	Departa- mento	Colonias (n)	Departa- mento	Colonias (n)
Artigas	1	Durazno	4	Maldonado	2	Paysandú	12
Salto	2	Flores	5	Rocha	2	Río Negro	12
Tacuarembó	3	Florida	6	Treinta y Tres	1	Soriano	13
Rivera	8	San José	9	Cerro Largo	3	Colonia	11
		Canelones	4	Lavalleja	1		
		Montevideo	1				
Total	14	Total	29	Total	9	Total	48

3.9 Análisis estadísticos

Para estudiar los parámetros de fortaleza de la colonia se calculó el promedio nacional y el desvío estándar, y se expresó como: media $\pm$ desv.est.

Para analizar la prevalencia de las plagas y patógenos identificados, se calculó el porcentaje de muestras positivas sobre el total de muestras. A ese dato se le agregó el intervalo de confianza (IC) al 95% utilizando la siguiente fórmula (Van Engelsdorp *et al.*, 2013):

$$IC\ 95\% \text{ para } p = \hat{p} \pm Z\alpha (e.s. (\hat{p}))$$

donde p = prevalencia, $\hat{p}$ = media de prevalencia, $Z\alpha$ = percentil (1- α /2) de la distribución normal estándar (en este caso $Z\alpha = 1.96$ para el IC al 95%), y e.s. ($\hat{p}$) = desvío estándar.

Luego se utilizó el test estadístico no paramétrico de rangos de Spearman para evaluar las posibles correlaciones entre los patógenos y con la fortaleza de la colonia. Se eligió este test porque ninguna de las variables analizadas presentaron

distribución normal ni homogeneidad de varianza. El criterio para evaluar la magnitud de la asociación se muestra en la tabla 10 (Schober *et al.*, 2018).

Tabla 10. Interpretación del coeficiente de correlación del test de rangos de Spearman. Tomado y adaptado de Schober *et al.* (2018).

Valor absoluto de la correlación	Interpretación
0.00-0.10	Correlación insignificante
0.10-0.39	Correlación débil
0.40-0.69	Correlación moderada
0.70-0.89	Correlación fuerte
0.90-1.00	Correlación muy fuerte

Para evaluar las asociaciones entre la presencia de patógenos, se empleó el test χ^2 (chi-cuadrado), y se estableció la significancia como p -valor=0,05.

También se calculó el *Odds ratio* (OR), un test que permite analizar el grado de asociación entre la exposición a diferentes factores y el desarrollo de la enfermedad (Van Engelsdorp *et al.*, 2013). Para este análisis se designaron categorías de cantidad de abejas: menos de 17.600 abejas (8 cuadros cubiertos) o valores más altos. Se considera que 8 cuadros de abejas es el valor adecuado para que una colonia sobreviva al invierno (Harriet J. y Campá J., comunicación personal). Con respecto al número de crías, se consideraron menos de 7000 celdas (2 cuadros cubiertos) o valores más altos; menos de 10500 celdas (3 cuadros cubiertos) o valores más altos. Finalmente, para el nivel de infestación de *V. destructor*, se generaron categorías de infestación de hasta 4%, 7% y 15%. La significancia del test se evaluó mediante un intervalo de confianza al 95%, y si éste incluyó valores menores a 1, se consideró no significativo.

Finalmente, para analizar las diferencias de los niveles de infestación con *V. destructor* y *Nosema* spp. entre las distintas regiones del país, se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis, y luego el test pos-hoc Mann-Whitney (con corrección de Bonferroni). También se aplicaron estos test para analizar la diferencia entre los tratamientos acaricidas contra *V. destructor*. En este caso también se eligieron test

no paramétricos porque las variables analizadas no presentaron distribución normal ni homogeneidad de varianzas entre los grupos.

Todos los análisis estadísticos y gráficos fueron realizados con el software Rstudio (Posit team, 2022).

4. Resultados

4.1 Fortaleza de la colonia

Se colectaron exitosamente muestras de abejas nodrizas, pecoreadoras y miel de 100 colonias de abejas melíferas de todos los departamentos del Uruguay.

Todas las colonias muestreadas fueron colonias de producción, sin síntomas visibles de enfermedades. La población de abejas por colonia adultas fue variable (8.800 - 44.000). El 56% de las colonias poseían al menos 17.600 abejas (aproximadamente 8 cuadros cubiertos), siendo el promedio de todas las colonias de 21.120 ± 6.300 abejas (Figura 13A). Por otra parte, la cantidad de celdas de cría varió entre 3.520 y 45.760, siendo el promedio 14.080 ± 7.550 (Figura 13B). Finalmente las reservas de miel medidas en cantidad de celdas cubiertas variaron entre 3.520 y 52.800, y presentaron un promedio de 22.598 ± 9.691 (Figura 13C).

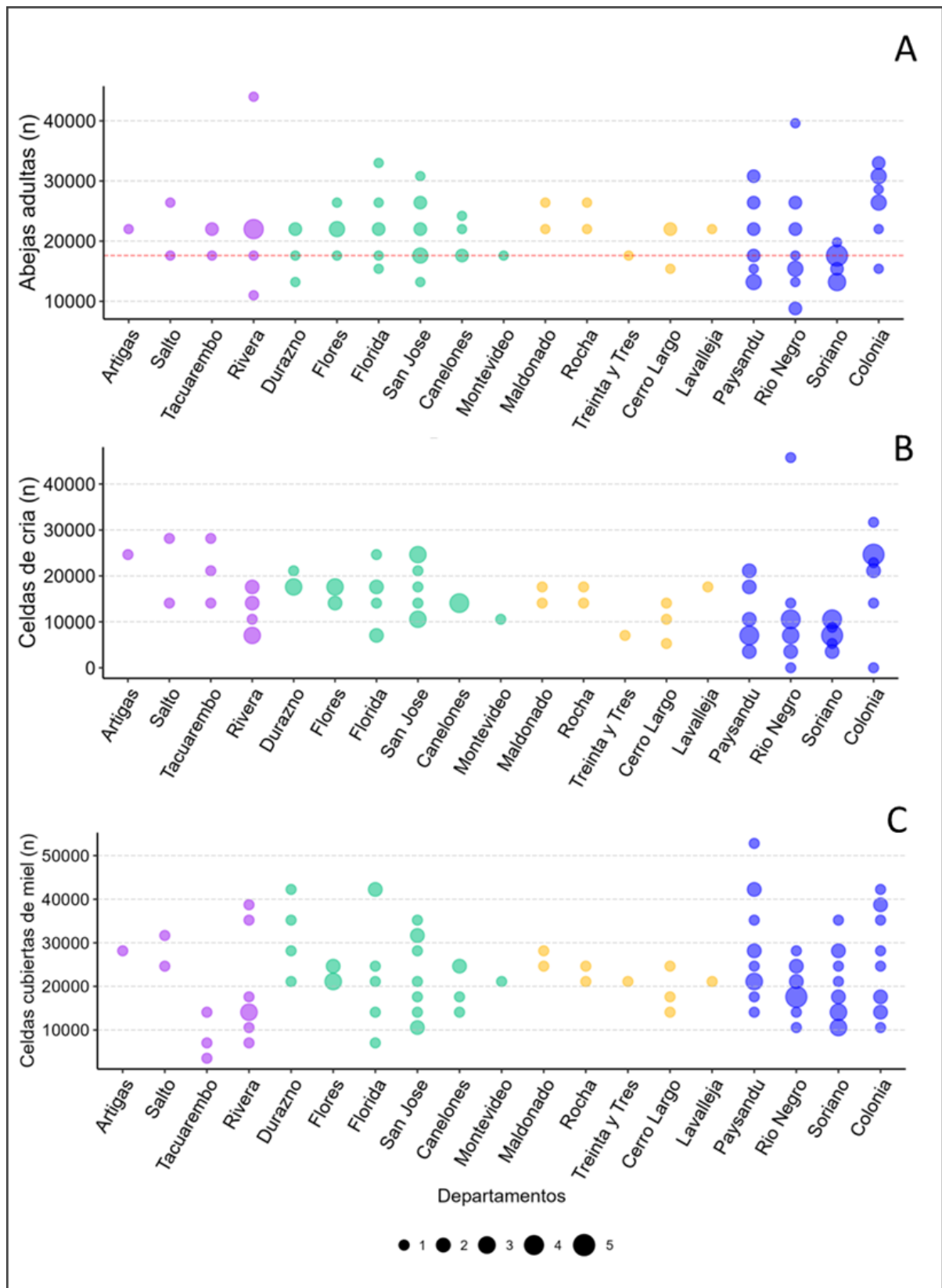


Figura 13. Estimación de la fortaleza de la colonia por departamento. A) Población de abejas adultas de cada colonia, la línea punteada roja indica el mínimo de cuadros recomendados para que la colonia sobreviva al invierno (8 cuadros), B) cantidad de celdas de cría C) cantidad de celdas

cubiertas de miel. Las muestras están agrupadas por las regiones establecidas y el tamaño de los puntos representa la cantidad de colonias que coinciden con un mismo valor.

4.2 Plagas y patógenos

La mayoría de las plagas y patógenos analizados en este estudio se detectaron en las muestras colectadas, excepto el microsporidio *N. apis* y los virus IAPV y KBV. La prevalencia nacional ($\pm$ el IC al 95%) de cada plaga y patógeno analizado se muestran en la Tabla 11.

En el 96% de las muestras se detectó al menos una plaga o patógeno. El máximo número de patógenos encontrados por muestra fue 7 en el 3% de las muestras, en los departamentos de Colonia y San José (Figura 14). En la Figura 14 también se muestra el número de colonias por departamento, y el número de patógenos encontrados en cada muestra.

Tabla 11. Prevalencia nacional de las plagas y patógenos en el año 2021. La prevalencia se muestra como porcentaje (%) $\pm$ intervalo de confianza (IC) al 95%.

Plagas y Patógenos	Prevalencia nacional 2021 $\pm$ IC (95%)
<i>V. destructor</i>	62 $\pm$ 10
<i>N. ceranae</i>	63 $\pm$ 9
<i>N. apis</i>	ND
<i>P. larvae</i>	11 $\pm$ 6
<i>L. passim</i>	60 $\pm$ 10
DWV	31 $\pm$ 9
ABPV	6 $\pm$ 5
SBV	27 $\pm$ 9
BQCV	22 $\pm$ 8
CBPV	25 $\pm$ 9
IAPV	ND
KBV	ND

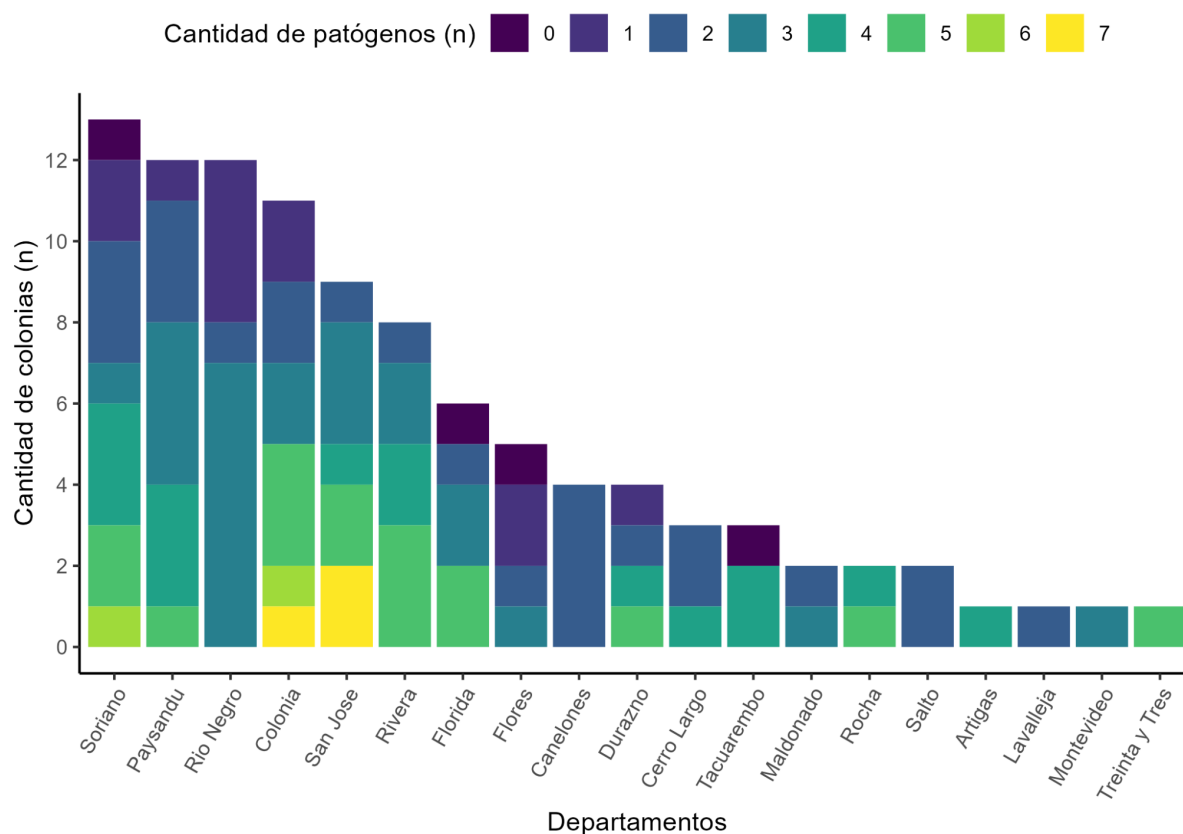


Figura 14. Cantidad de colonias en función de cada departamento del país. Dentro de cada departamento, cada color representa el número de patógenos y a cuántas colonias corresponde (valores del 0 al 7).

Al agrupar las muestras por región, se encontró que todos los patógenos están presentes en la región oeste, y a excepción del ABPV, también en la región sur (Figura 15). Además, se observó que la mayoría de los patógenos, exceptuando el ABPV y *P. larvae*, están presentes en todas las regiones (Figura 15).

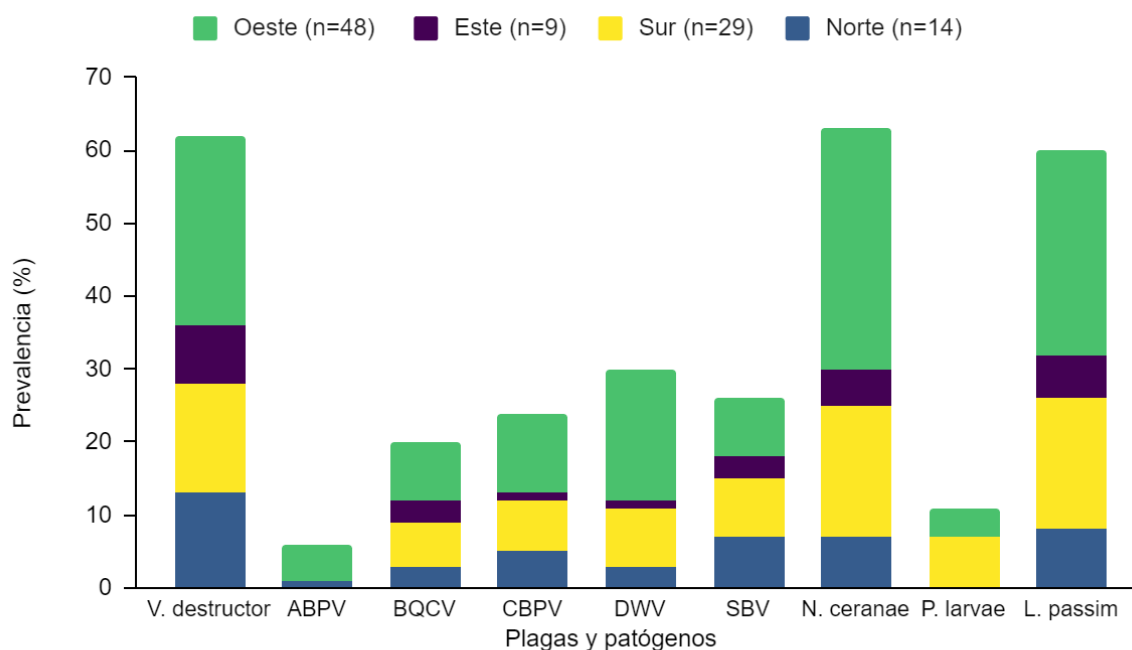


Figura 15. Prevalencia en función de cada plaga y patógeno analizado en este estudio. El color de las barras representan las cuatro regiones establecidas.

4.2.2 Prevalencia y distribución de *Varroa destructor*

El ácaro *V. destructor* se encontró en el $62 \pm 10\%$ de las muestras (Tabla 11) y en 18 de los 19 departamentos. En la Figura 16 se muestra la distribución del ácaro en el país.

El 20% de las muestras presentaron niveles de infestación mayores al 4% (Figura 17A). En cuanto a la distribución de *V. destructor* en el país, se observaron diferencias significativas en el nivel de parasitación en las diferentes regiones (p -valor $<0,001$, Kruskal-Wallis test; Figura 17B). La región donde hubo mayor nivel de infestación fue el norte, presentando diferencias significativas con el sur (p -valor $<0,001$) y el oeste (p -valor $<0,01$). El este fue la segunda región con mayores niveles de infestación, encontrándose diferencias significativas con el sur (p -valor $<0,01$), y el oeste (p -valor $<0,05$), (Mann-Whitney test; Figura 17B).



Figura 16. Distribución nacional de *Varroa destructor* en 2021. Los departamentos coloreados de gris representan aquellos en los cuales se encontró al menos una muestra positiva para el ácaro.

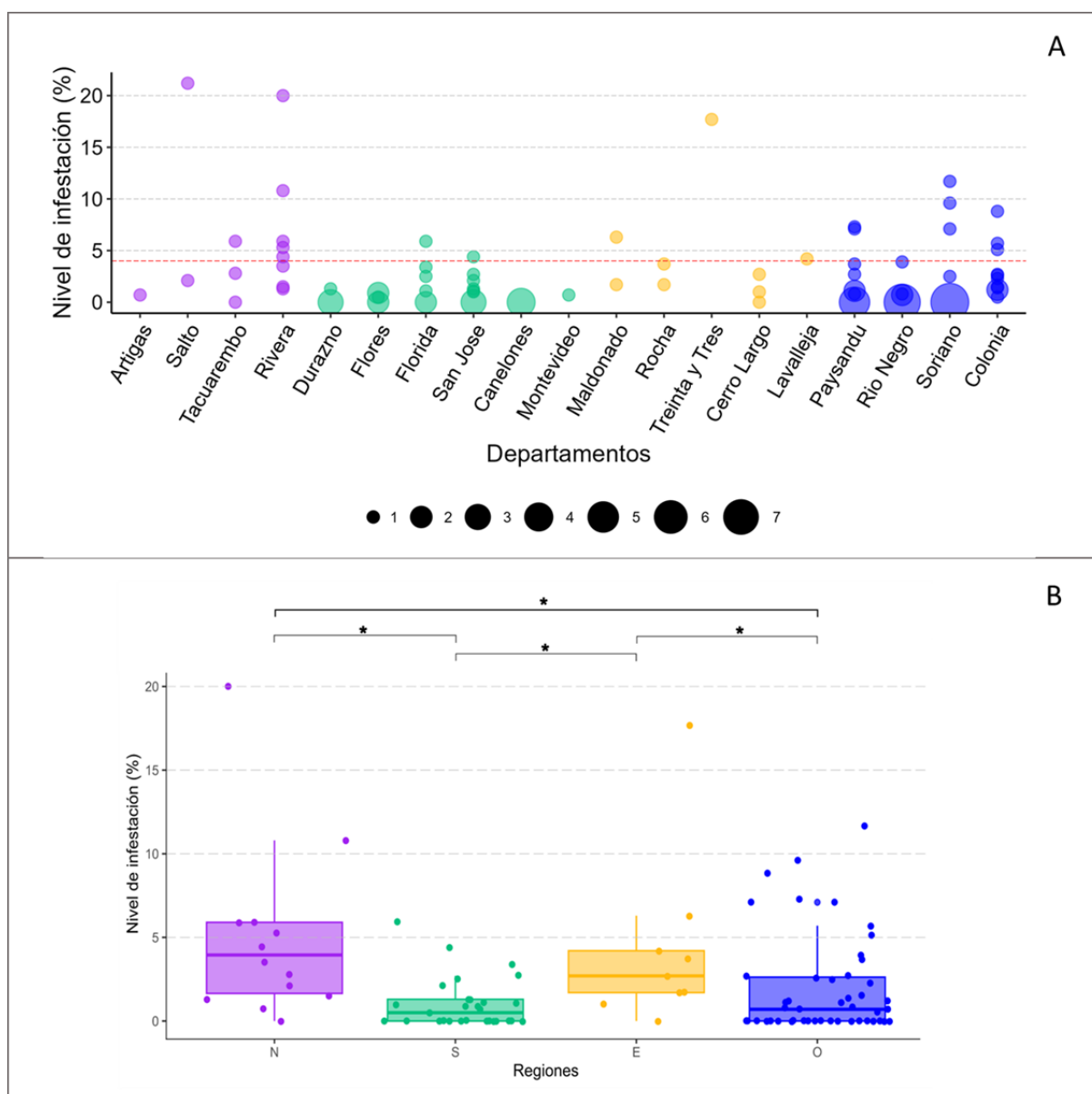


Figura 17. **A)** Nivel de infestación medido en porcentaje (%) en función de los departamentos del país. El tamaño del punto corresponde al número de muestras. Los colores corresponden a cada región establecida. La línea punteada de color rojo indica el valor máximo de infestación aceptable para sobrepasar la invernada (4%). El tamaño de los puntos representa la cantidad de colonias (n=1:7). **B)** Boxplot (diagrama de cajas) y jitter plot (gráfico de puntos) del nivel de infestación medido en porcentaje (%) en función de las regiones del país (N=norte; S=sur; E=este; O=oeste). Los asteriscos (*) indican p -valor < 0,05 (diferencias significativas) de acuerdo al test Mann-Whitney.

4.2.2.1 Tratamientos acaricidas contra *Varroa destructor*

Con respecto al tipo de tratamiento acaricida contra *V. destructor*, y según las respuestas de los apicultores durante el muestreo, el 78% de las colonias se trataron

con tiras de ácido oxálico (acaricida orgánico), el 5% se trataron con Amitraz (acaricida sintético), y otro 3% se trataron de manera mixta con flumetrina y ácido oxálico o solo flumetrina (en este caso se toma como tratamiento sintético). El 14% restante no recibió ningún tratamiento, mostrando un nivel de infestación medio significativamente más alto que el de las colonias tratadas con los distintos tipos de tratamiento (test Mann-Whitney (p -valor $<0,001$); Figura 18). También se observó un nivel de infestación medio significativamente más alto en las colonias tratadas con tiras de ácido oxálico en comparación con las tratadas con sintéticos (p -valor $<0,001$), de acuerdo al test Mann-Whitney (Figura 18).

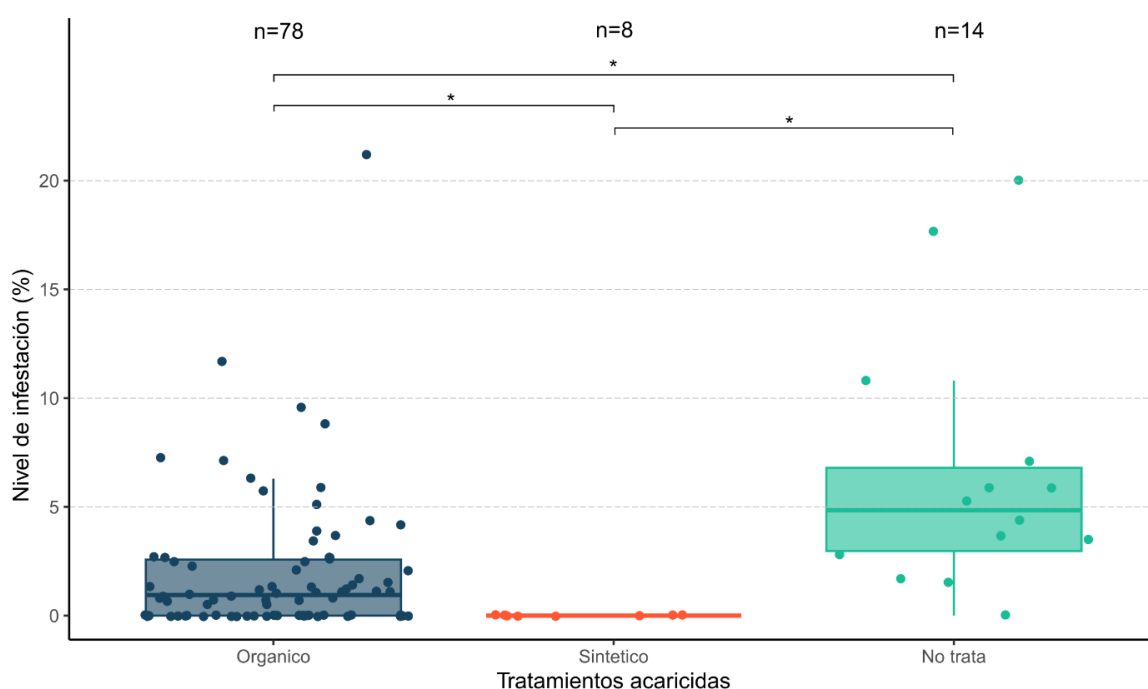


Figura 18. Nivel de infestación con *V. destructor* en porcentaje, en función de los tipos de tratamientos acaricidas utilizados en las colonias muestreadas. Los asteriscos (*) indican p -valor $<0,05$ (diferencias significativas) de acuerdo al test Mann-Whitney.

Con respecto a la fecha del último tratamiento acaricida, el 71% de las colonias se trataron menos de 6 meses antes del muestreo (Figura 19). De ese grupo, solo 7 colonias se trataron con acaricidas sintéticos. Se encontraron diferencias significativas entre los grupos (test Kruskal-Wallis, p -valor=0,04). De acuerdo al test Mann-Whitney, tanto las tratadas con acaricidas sintéticos como orgánicos hace menos de 6 meses, tuvieron un nivel de infestación significativamente menor que el

de las colonias sin tratar (p -valor $<0,001$). También se observó un nivel de infestación significativamente menor en las tratadas con acaricidas sintéticos hace menos de 6 meses que las tratadas con orgánicos en el mismo período (p -valor $<0,001$) (Figura 19).

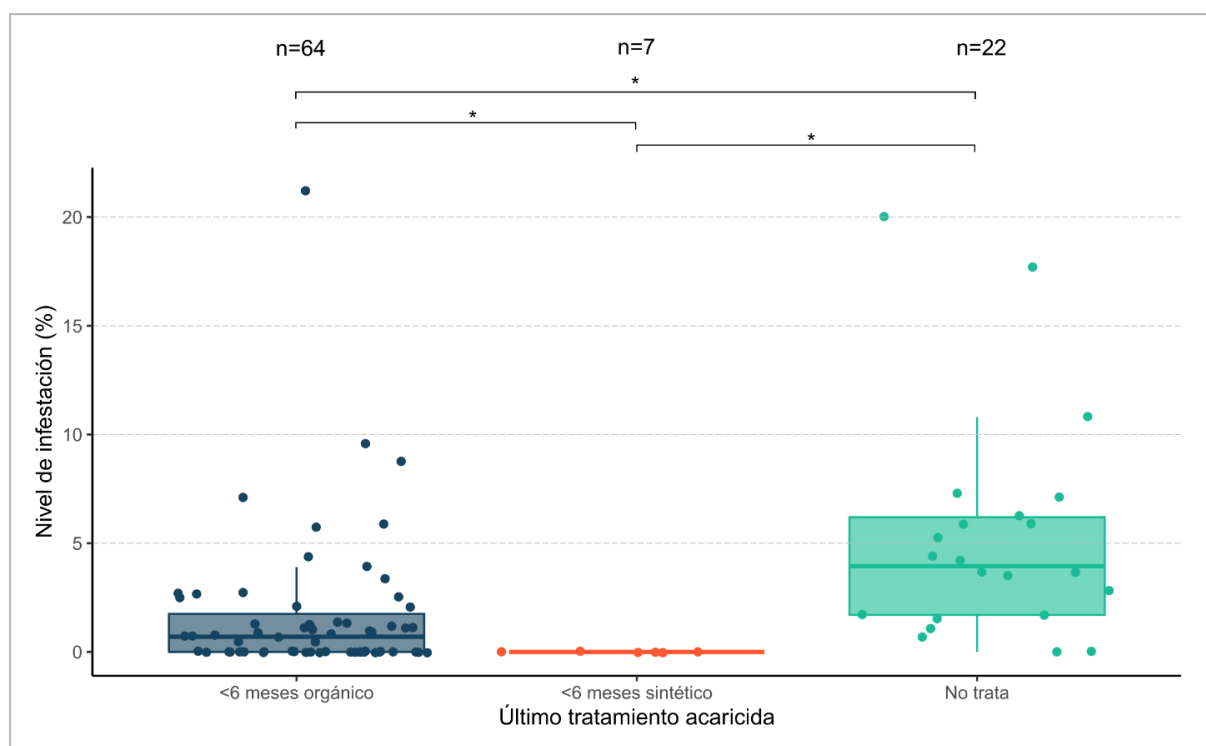


Figura 19. Nivel de infestación de *V. destructor* en porcentaje, en función de cuándo se realizó el último tratamiento acaricida en las colonias muestreadas. Las muestras para las cuales no hay datos se excluyeron de la figura. “<6 meses orgánico” = colonias tratadas hace menos de 6 meses con tiras de ácido oxálico; “<6 meses sintético”= colonias tratadas hace menos de 6 meses con Amitraz o Flumetrina. “No trata” = ningún tratamiento realizado o tratado hace más de 6 meses por última vez. Los asteriscos (*) indican p -valor $<0,05$ (diferencias significativas) del test Mann-Whitney.

4.2.3 Prevalencia, distribución y carga viral de virus ABPV, BQCV, CBPV, DWV, SBV

La amplificación de los genes de referencia β -actina y RPS5 fue exitosa para el 98% de las muestras. Las dos muestras en las que no se logró amplificar estos genes no se incluyeron en el análisis.

Los virus ABPV, BQCV, CBPV, DWV y SBV se detectaron en al menos una muestra (Figura 20). El virus más prevalente fue el DWV ($30\pm9\%$, Tabla 11), encontrándose en 11 departamentos, incluido todo el litoral oeste del país (Figura 20), y la única variante circulante fue la del DWV-A. Los virus SBV y CBPV fueron los siguientes más prevalentes ($27\pm9\%$, $25\pm9\%$; Tabla 11; Figura 20). El virus BQCV presentó una prevalencia de $22\pm8\%$, y fue el que presentó la distribución más amplia, abarcando 14 departamentos. Finalmente el virus ABPV fue el de menor prevalencia ($6\pm5\%$, Tabla 11; Figura 20).

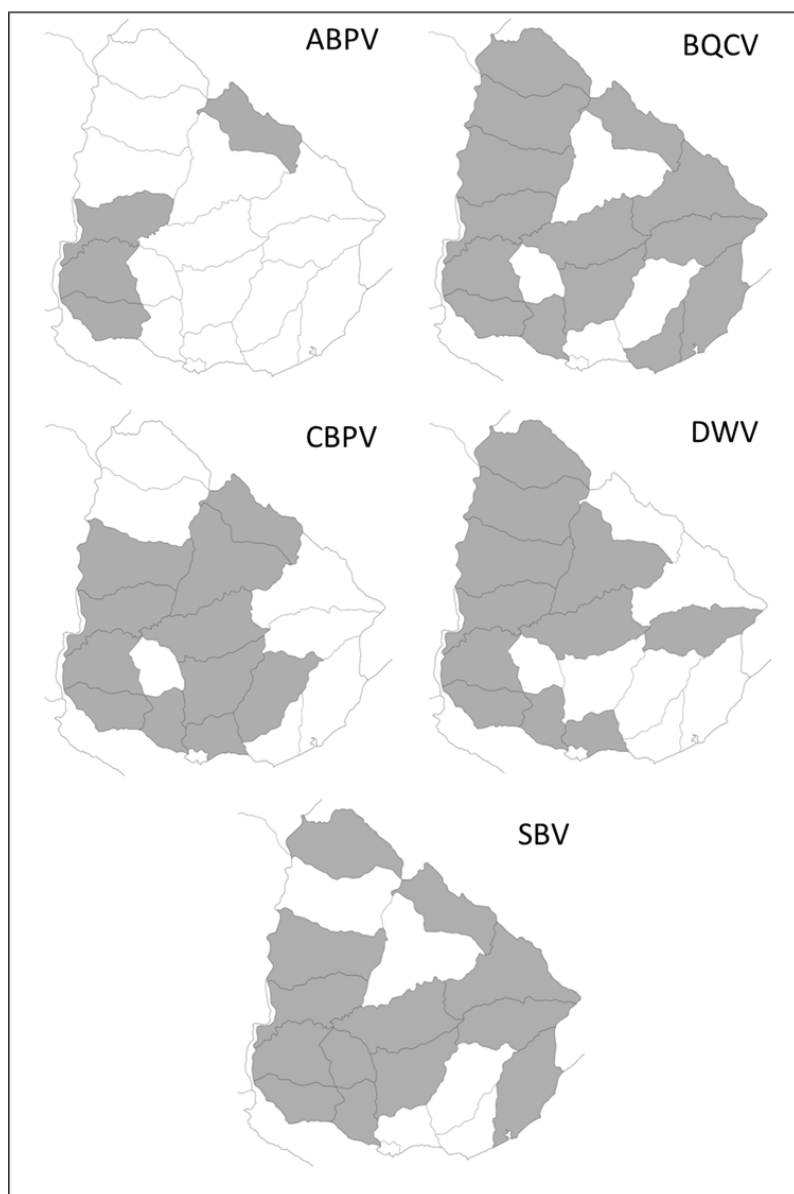


Figura 20. Distribución de los virus ABPV, BQCV, CBPV, DWV y SBV en Uruguay en 2021. Los departamentos coloreados de gris representan aquellos en los cuales se encontró al menos una muestra positiva.

Con respecto a la carga viral relativa, todos los virus presentaron una variación muy grande entre las muestras. El virus ABPV en general mantuvo bajas cargas virales, mientras que DWV llegó a valores de más de 5 órdenes de magnitud con respecto a la muestra calibradora. El CBPV presentó las cargas virales más altas en departamentos del litoral oeste. El resto de los virus también tuvieron cargas virales altas de aproximadamente 4,6 órdenes de magnitud mayores que la muestra calibradora, pero en menos muestras (Figura 21).

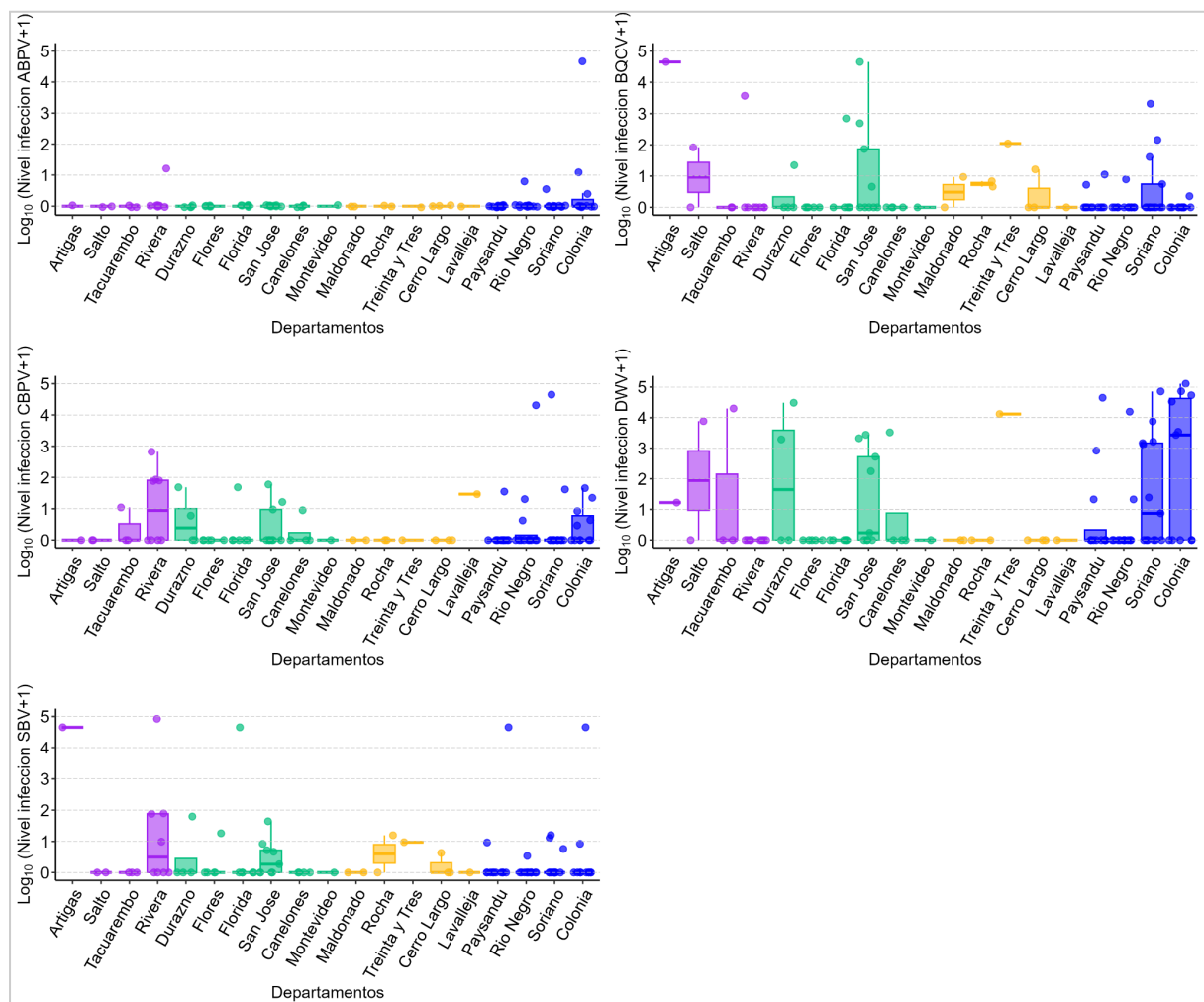


Figura 21. Boxplot y jitterplot de las cargas virales relativas de los virus ABPV, BQCV, CBPV, DWV y SBV. Los valores representados en el eje Y corresponden a la cuantificación relativa logaritimizada. Los colores de las cajas y puntos corresponden a las regiones establecidas. Cada punto corresponde a una muestra.

4.2.4 Prevalencia y distribución de *Nosema* spp.

Se utilizaron dos métodos para la detección de *Nosema ceranae*. El conteo de esporas en abdómenes permitió la detección en el 55% de las muestras, llegando a detectar cerca de 5 millones de esporas por abeja en una muestra (Figura 22A). Al dividir el país en regiones, no se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de esporas por abeja entre regiones (test Kruskal-Wallis, p -valor= 0,66; Figura 22B). Por otro lado, la multiplex PCR permitió la detección de *N. ceranae* en el 38% de las muestras (Figura 23).

Considerando ambas técnicas, la prevalencia nacional de *Nosema spp.* se calculó en $63\pm 9\%$ (Tabla 11). Se encontró ampliamente distribuido, específicamente en 14 departamentos, con la excepción de Artigas, Salto, Flores, Treinta y Tres y Lavalleja (Figura 24).

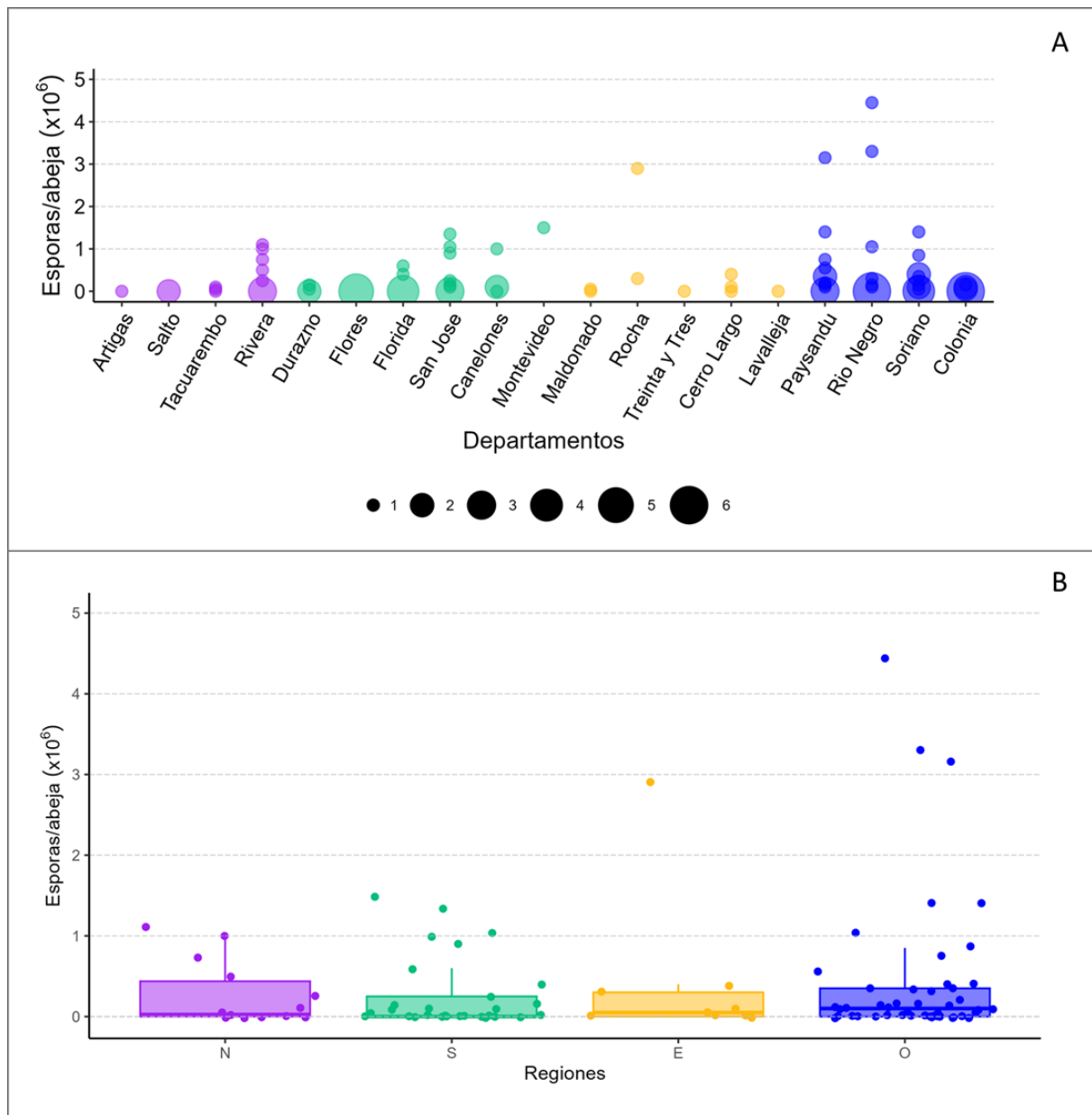


Figura 22. **A).** Número de esporas de *N. ceranae* en *pool* de abejas $\times 10^6$ en función de los departamentos del país. El tamaño del punto corresponde al número de muestras. El tamaño de los puntos representa la cantidad de colonias ($n=1:6$). Los colores corresponden a las regiones establecidas. **B).** Boxplot (diagrama de cajas) y jitter plot (gráfico de puntos) del número de esporas en *pool* de abejas ($\times 10^6$) en función de las regiones del país (N=norte; S=sur; E=este; O=oeste).

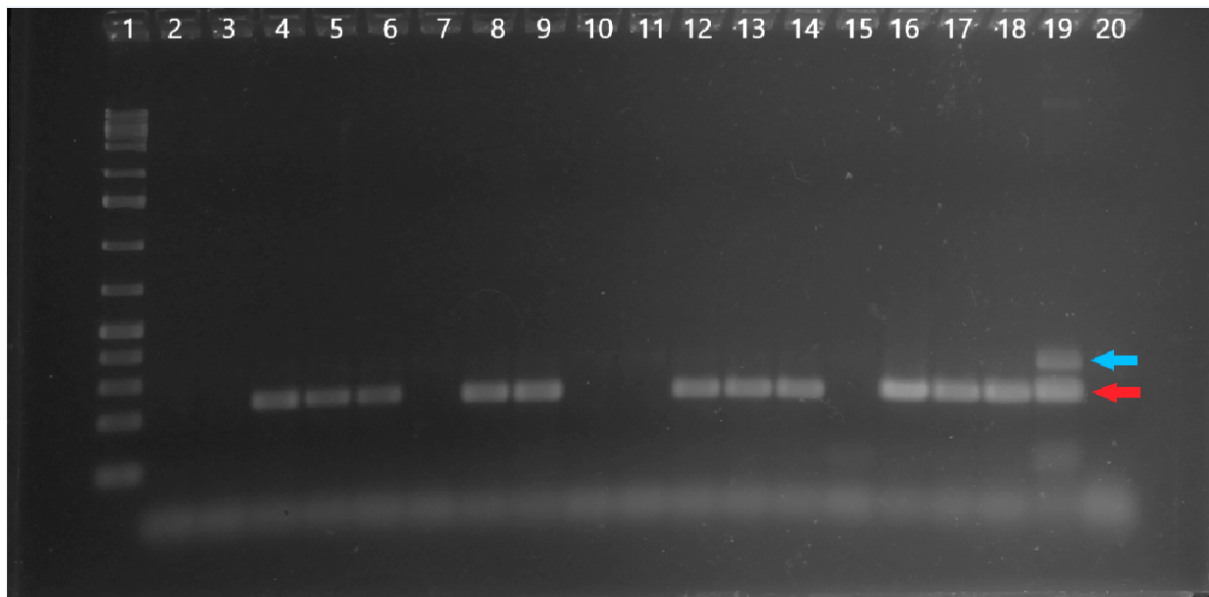


Figura 23. Gel de agarosa al 2% representativo de resultados de PCR multiplex (fragmento de gen del ARNr 16S) para discriminar entre *Nosema apis* y *Nosema ceranae*. 1.- Marcador de Peso Molecular 1kb plus; 2,3,7,10,11,15.- muestras negativas para *N. ceranae*; 4-6,8,9,12,13,14,16-18.- muestras positivas para *N. ceranae*; 19.- control positivo para *N. apis* y *N. ceranae*. El fragmento amplificado para *N. ceranae* se estimó en 218 pb (flecha roja) y el de *N. apis* en 321 pb (flecha celeste); 20.- control negativo.

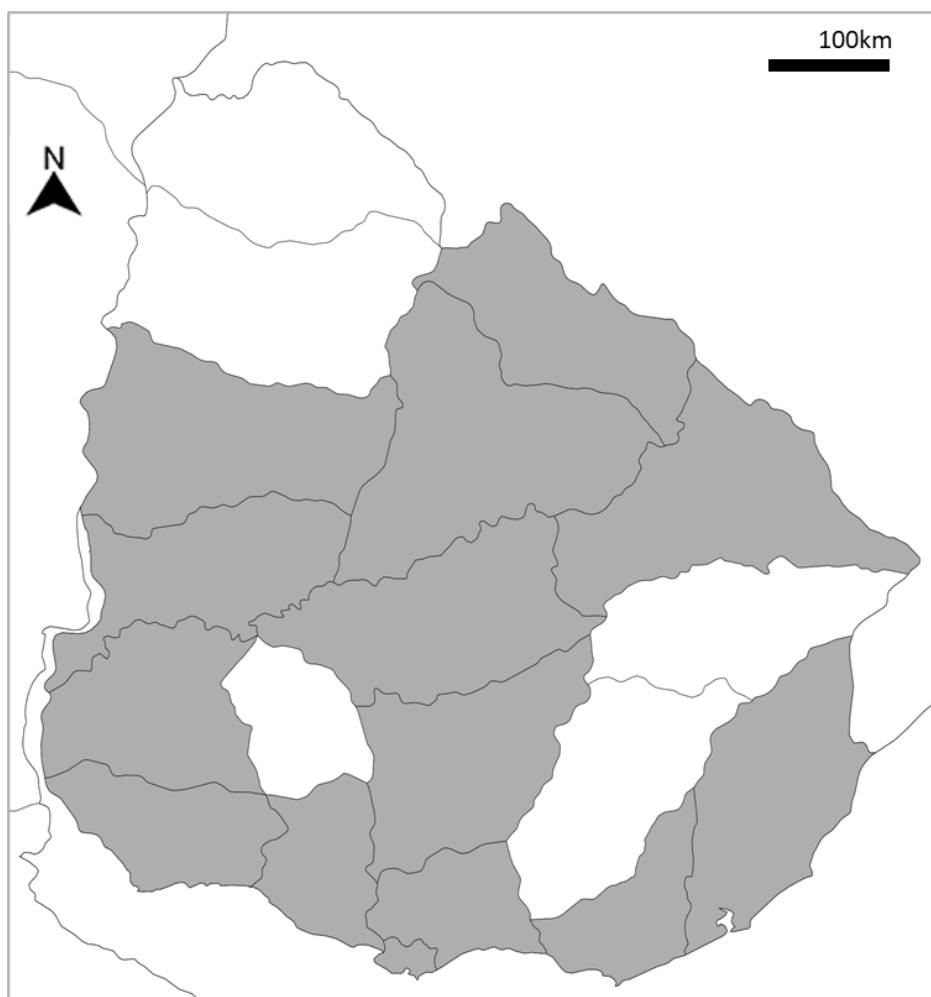


Figura 24. Distribución de *Nosema ceranae* en Uruguay en 2021. Los departamentos coloreados de gris representan aquellos en los cuales se encontró al menos una muestra positiva.

4.2.5 Prevalencia y distribución de *Paenibacillus larvae*

A partir del cultivo de las muestras de miel 12 muestras presentaron colonias sospechosas para *P. larvae*. La técnica de PCR empleando *primers* específicos permitió la confirmación de la identidad en 11 de los casos (Figura 25).

A partir de esto, se calculó la prevalencia nacional de *P. larvae* en $11\pm 6\%$ (Tabla 11). La distribución de este patógeno estuvo restringida al litoral oeste, encontrándose en los departamentos de Paysandú, Colonia, San José, Flores y Florida (Figura 26).



Figura 25. Gel de agarosa al 0,8% representativo de resultados de PCR (fragmento de gen que codifica para el ARNr 16S) para la identificación de *Paenibacillus larvae*. El fragmento amplificado corresponde a 700 pb (flecha blanca). 1-8.- muestras positivas para *P. larvae*; 9.- control positivo; 10-11.- controles negativos; 12.- Marcador de Peso Molecular 1kb plus.

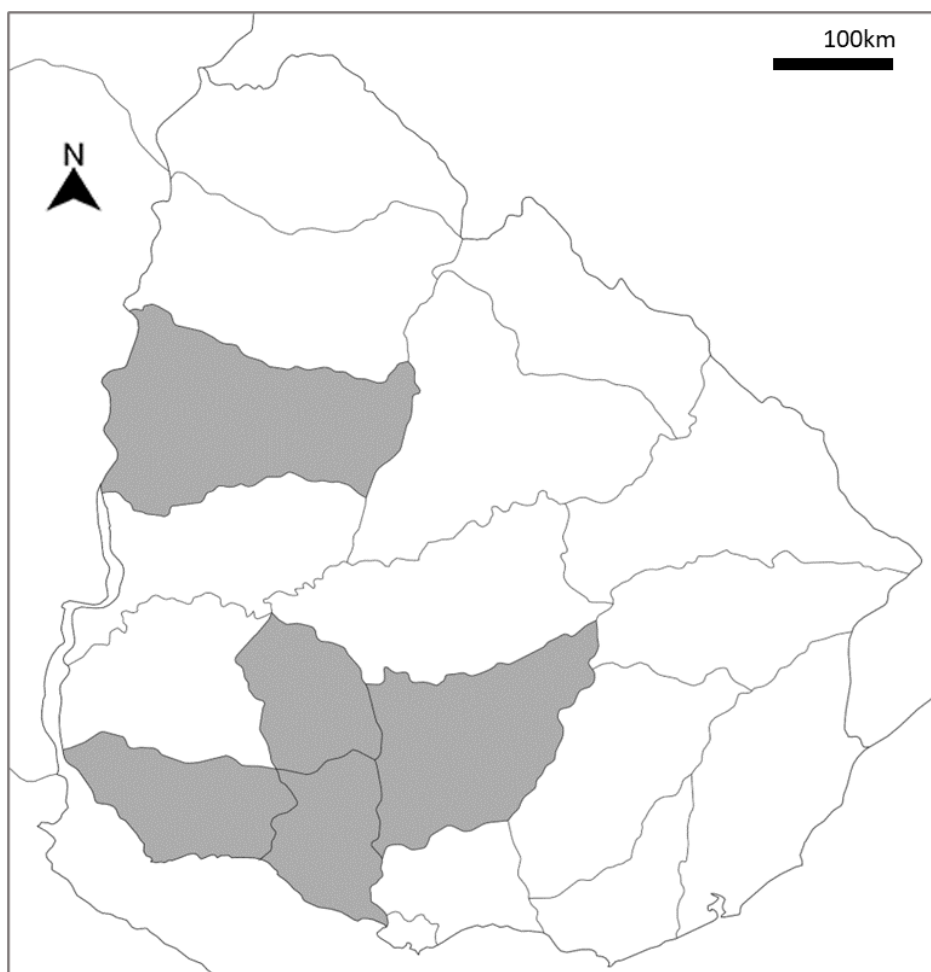


Figura 26. Distribución de *Paenibacillus larvae* en Uruguay en 2021. Los departamentos coloreados de gris representan aquellos en los cuales se encontró al menos una muestra positiva para la bacteria.

4.2.5 Prevalencia y distribución de *Lotmaria passim*

El tripanosomátido *L. passim* fue el segundo patógeno más prevalente encontrado en las muestras analizadas ($60\pm 10\%$; Tabla 11). Se observó que está ampliamente distribuido en el territorio nacional con excepción de los departamentos de Artigas, Salto y Lavalleja (Figura 27).



Figura 27. Distribución de *Lotmaria passim* en Uruguay en 2021. Los departamentos coloreados de gris representan aquellos en los cuales se encontró al menos una muestra positiva para el tripanosomátido.

4.3 Correlaciones entre patógenos y su relación con la fortaleza de la colonia

Se encontró una correlación positiva moderada entre la presencia del ácaro *V. destructor* y el virus DWV, y positiva débil entre el ácaro y el número de abejas adultas, de acuerdo al test de Spearman (Tabla 12). También se encontraron correlaciones negativas débiles entre el número de esporas de *N. ceranae* y la cantidad de abejas adultas, y el número de esporas del microsporidio y cantidad de cría, mediante el test de Spearman (Tabla 12).

Con respecto a la asociación de la presencia de los patógenos mediante el test χ^2 , ésta se observó mayoritariamente entre virus. La presencia de SBV está asociada a la presencia de BQCV y CBPV, y este último también con DWV. A su vez, la presencia de *L. passim* se asoció a la del virus SBV y de *N. ceranae* (Tabla 13).

Con respecto al *Odds ratio*, se observó que si las colonias tienen un nivel de infestación con *V. destructor* mayor al 7%, tienen un mayor riesgo de tener el virus DWV (Tabla 14). Por otra parte, también se observó un mayor riesgo de tener *N. ceranae* si *L. passim* está presente en la abeja (Tabla 14).

Tabla 12. Test de correlación de rangos de Spearman entre patógenos y patógenos con fortaleza de colonia. El número en la parte superior es el valor del coeficiente de asociación (r_s) y el valor entre paréntesis corresponde al p -valor de la asociación (nivel de significancia = 0,05). Los valores en rojo son los que presentaron una correlación significativa.

	ABPV	BQCV	CBPV	DWV	SBV	<i>N.ceranae</i>	Abejas adultas	Celdas de cría
V. destructor	0,41 (0,4)	-0,10 (0,6)	-0,14 (0,5)	0,55 (<0,01)	-0,10 (0,9)	-0,10 (0,3)	0,26 (0,01)	0,16 (0,1)
ABPV		-1,0 (1)	-0,50 (1)	-0,50 (1)	1,0 (1)	-0,20 (0,7)	-0,37 (0,5)	0,75 (0,08)
BQCV			0,10 (0,9)	-0,40 (0,3)	0,61 (0,07)	0,010 (0,9)	0,050 (0,8)	0,16 (0,5)
CBPV				-0,54 (0,07)	0,22 (0,6)	0,19 (0,4)	-0,13 (0,5)	-0,18 (0,4)
DWV					-0,18 (0,6)	-0,020 (0,9)	0,010 (0,9)	-0,17 (0,4)
SBV						0,020 (0,9)	0,080 (0,7)	0,28 (0,2)
<i>N. ceranae</i>							-0,21 (0,03)	-0,29 (<0,01)

Tabla 13. χ^2 entre los patógenos analizados en este estudio. Entre paréntesis se representa el p -valor, y los valores significativos (p -valor<0,05) en rojo. Los patógenos marcados con asterisco (*) no pudieron ser analizados mediante este test debido al bajo número de muestras positivas.

	ABPV	BQCV	CBPV	DWV	SBV	<i>N. ceranae</i>	<i>P. larvae</i> *	<i>L. passim</i>
<i>V. destructor</i>	8e-32 (1)	0,45 (0,5)	0,0033 (0,9)	0,40 (0,5)	1,8 (0,2)	1,7 (0,2)	-	0,11 (0,7)
ABPV*		-	-	-	-	-	-	-
BQCV			0,025 (0,9)	0,54 (0,5)	5,5 (0,02)	0,0049 (0,9)	-	1,9 (0,2)
CBPV				4,8 (0,03)	6,5 (0,01)	0,83 (0,4)	-	0,082 (0,8)
DWV					0,72 (0,4)	2,0 (0,2)	-	0,21 (0,7)
SBV						0,085 (0,8)	-	4,2 (0,04)
<i>N. ceranae</i>							-	4,8 (0,03)
<i>P. larvae</i>								0,035 (0,8)

Tabla 14. *Odds ratio* (OR) para los distintos patógenos, y patógenos con parámetros de fortaleza de colonia. El número en la parte superior es el OR, y entre paréntesis se encuentran los valores del IC calculado al 95%. Los valores en rojo son significativos. Las celdas con (-) son aquellas que no pudieron ser calculadas.

	ABPV>0	BQCV>0	DWV>0	SBV>0	<i>N. ceranae</i>	Abejas adultas >17600	<i>P. larvae</i>
V. destructor >4%	2,1 (12-0,36)	1,2 (4-0,39)	1,8 (5-0,63)	1,7 (5-0,60)	0,60 (1,6-0,23)	0,74 (1,9-0,28)	-
V. destructor >7%	1,9 (18-0,20)	2,7 (10-0,68)	4,1 (16-1,0)	0,69 (3,5-0,14)	0,80 (2,9-0,22)	0,30 (1,2-0,07)	-
V. destructor >15%	0	1,8 (21-0,16)	4,9 (57-0,43)	6,08 (70-0,53)	0,40 (4,5-0,03)	0,38 (4,3-0,03)	-
Abejas adultas >17600	1,6 (9,2-0,2)	1,2 (3,1-0,4)	0,3 (0,6-0,11)	1,1 (2,7-0,44)	-	-	-
Celdas de cría >7000	0,8 (7,7-0,09)	1,3 (4,3-0,42)	1,5 (4,2-0,51)	1,4 (4,2-0,47)	-	-	0,8 (4,2-0,17)
Celdas de cría >10500	0,81 (4,7-0,14)	1,51 (4,6-0,5)	0,60 (1,5-0,24)	0,70 (1,9-0,27)	-	-	2,2 (10-0,45)
<i>L. passim</i>	-	-	-	-	2,3 (5,3-1,0)	-	-

5. Discusión

Este estudio constituye el segundo monitoreo a nivel nacional de plagas y patógenos de abejas melíferas en Uruguay, realizado 10 años después del primero. Esta tesis es un reflejo más del esfuerzo conjunto entre el sector productivo y científico, y realza la importancia del trabajo interdisciplinario. Todas las partes son indispensables para llevar a cabo monitoreos de esta magnitud, tanto los apicultores que proveen las colonias estudiadas, como el equipo técnico para el muestreo, los investigadores, y la financiación para poder llevarlo a cabo.

La toma de muestras para este tipo de monitoreo se debe realizar previo a la preparación de las colonias para la invernada, y de esta forma evitar sesgos en la detección de patógenos asociados a la estacionalidad o aplicación de tratamientos. Por ejemplo, la aplicación de acaricidas en marzo disminuye el número de ácaros en la colonia y concomitantemente la carga viral (Antúnez *et al.*, 2013; Grozinger y Flenniken, 2019). El primer relevamiento de patógenos a nivel nacional realizado por Anido *et al.* (2015) tuvo esto en cuenta, y el muestreo completo se realizó en dos semanas en marzo de 2011. Este estudio estaba planificado para realizarse de la misma forma, en marzo de 2021, sin embargo la situación de emergencia sanitaria ocasionada por el virus SARS-CoV-2 imposibilitó la realización del muestreo como estaba previsto, extendiéndose durante casi 4 meses (marzo-julio). Este factor fue tenido en cuenta a la hora de interpretar los resultados, específicamente al considerar los ciclos biológicos de las abejas y de los patógenos.

Las colonias incluidas en este estudio tuvieron un promedio de población de 21.120 abejas, similar a las colonias analizadas en 2011 (Anido *et al.*, 2015). Se estima que para enfrentar el invierno, la colonia necesita tener 8 cuadros completos cubiertos por abejas, que equivalen aproximadamente a 17.600 abejas (Harriet J. y Campá J., comunicación personal). En los 2 monitoreos realizados en nuestro país más de la mitad de las colonias cumplieron con esta premisa (61% en 2011 y 56% en 2021) (Anido *et al.*, 2015). Esta diferencia podría deberse a que en este estudio algunas colonias ya estaban entrando en la invernada, y esta reducción se observó también en la cantidad de cría y miel. El ciclo biológico anual de las abejas melíferas en

climas templados incluye una disminución en la producción de cría hacia el final del otoño y comienzo del invierno (Fluri *et al.*, 1982). Esto enfatiza la importancia de realizar el muestreo en un tiempo acotado como el sugerido y reportado previamente (Anido *et al.*, 2015; Antúñez *et al.*, 2015), para de esta forma minimizar la variación estacional.

A 10 años del último monitoreo nacional (Anido *et al.*, 2015), todos las plagas y patógenos identificados siguen estando presentes en el país y en algunos casos con una alta prevalencia. La región con más carga de patógenos es la oeste. Esta es el área con mayor desarrollo apícola, mayor densidad de colonias y, por lo tanto, con más muestras analizadas, lo que pudo influir en el resultado.

Varroa destructor es la segunda plaga más prevalente y presenta amplia distribución en el territorio. Este ácaro es considerado la mayor amenaza biótica que afecta a las abejas melíferas a nivel mundial (Delaplane y Hood, 1999; Rosenkranz *et al.*, 2010), y numerosos estudios lo relacionan con la pérdida de colonias (Antúñez *et al.*, 2017; Bruckner *et al.*, 2023; Francis *et al.*, 2013; Genersch *et al.*, 2010; Guzmán-Novoa *et al.*, 2010; Morawetz *et al.*, 2019; Van Der Zee *et al.*, 2012, 2015; van Engelsdorp *et al.*, 2008). En Uruguay se estima que un nivel de infestación de 4% es el máximo con el cual una colonia puede sobrevivir al invierno sin daños mayores (Harriet, J., comunicación personal). Este valor se podría considerar similar al tomado por países de climas templados, como el caso de Alemania, donde se reportó que el nivel de infestación con *V. destructor* debe ser menor al 6% para que la pérdida de colonias sea menor al 10% en promedio (Genersch *et al.*, 2010). Sin embargo, aún no se ha llegado a un consenso sobre el umbral de daño del ácaro. Este valor depende de la subespecie de abeja, del ácaro y de factores ambientales. Si bien en este monitoreo la mayoría de las muestras no superaron el 4% de infestación, en algunos casos se encontraron niveles de hasta 21%. Estos resultados son llamativos porque con esos niveles de infestación es probable que esas colonias no sobrevivan a la invernada.

El uso de acaricidas es la principal estrategia para controlar los niveles de infestación por *V. destructor*. En este estudio se observó que los acaricidas orgánicos fueron los más utilizados por los apicultores. Este resultado demuestra un

cambio en las prácticas apícolas en comparación al monitoreo realizado en 2011, donde se utilizaban principalmente acaricidas sintéticos (Anido *et al.*, 2015). Hasta hace unos años, los acaricidas sintéticos eran los predominantes en el país. Sin embargo, la aparición de resistencia a estos productos, la permanencia de residuos en la miel y los posibles impactos negativos en la fisiología de las abejas, ha reducido su uso (Garrido *et al.*, 2013; Rosenkranz *et al.*, 2010; Tihelka, 2018; Ye *et al.*, 2020). La comercialización de ácido oxálico en tiras de liberación lenta, recomendado por el MGAP y la comunidad científica, estimuló también este cambio. En este trabajo se observó que más de la mitad de las colonias muestreadas se trataron en los 6 meses previos al muestreo. Acorde a la cantidad de tiempo transcurrido entre el último tratamiento acaricida y la fecha de muestreo, las colonias deberían haber presentado niveles de infestación más bajos de los encontrados. Esto podría deberse a que la eficiencia del ácido oxálico disminuye en verano, cuando hay mucha cría (Rosenkranz *et al.*, 2010).

El resultado de la correlación positiva encontrada entre *V. destructor* y el número de abejas adultas coincide con lo reportado en otros estudios (Leza *et al.*, 2016). Esta correlación podría ser explicada por la dinámica parásito-hospedero, donde un mayor número de abejas adultas es consecuencia de un mayor número de celdas de cría, y esto le brindaría más oportunidades al ácaro para reproducirse, llevando a un mayor nivel de infestación (Rosenkranz *et al.*, 2010; Traynor *et al.*, 2020).

La infestación por *V. destructor* está asociada a la infección por diferentes virus ARN. En este estudio se identificó la presencia de los virus ABPV, BQCV, CBPV, DWV y SBV, en concordancia con lo encontrado en trabajos anteriores en el país (Anido *et al.*, 2015; Antúnez *et al.*, 2006, 2015). Por otro lado, los virus IAPV y KBV no se detectaron y esto también coincide con lo reportado previamente (Anido *et al.*, 2015; Antúnez *et al.*, 2006, 2015). Los virus ARN evolucionan muy rápido y pueden presentar grandes variaciones genéticas en distintas poblaciones (Dolan *et al.*, 2018; Pybus y Rambaut, 2009). Esto podría dificultar su detección, y el desafío se encuentra en contar con los *primers* correctos. En particular, los virus IAPV-KBV-ABPV pertenecen al mismo complejo (de Miranda *et al.*, 2010), por lo que no se puede descartar una identificación incorrecta, sobreestimando, por ejemplo, la prevalencia del virus ABPV. Cabe destacar que los niveles de ABPV detectados en

este trabajo fueron muy bajos. Sin embargo, debemos continuar investigando y buscando los virus IAPV y KBV, ya que se han detectado en países de la región como Chile, Argentina y Brasil (Reynaldi *et al.*, 2011; Riveros *et al.*, 2018; Teixeira *et al.*, 2012). En este sentido, se puso a punto el estudio del viroma en abejas melíferas en nuestro laboratorio como herramienta para explorar el conjunto de virus presente. Utilizando esta técnica tampoco se detectó la presencia del IAPV o del KBV (Arredondo, D., comunicación personal), confirmando los resultados obtenidos mediante qPCR.

Con respecto a los virus identificados, el ABPV fue el que presentó la prevalencia más baja (6%), y acorde con lo reportado anteriormente en el país (9% en 2006 y 14,6% en 2011; Anido *et al.*, 2015; Antúñez *et al.*, 2006). Esta prevalencia es menor que la reportada en Alemania (11,7%), Argentina (21%) y Brasil (27%), y similar a lo reportado en algunas regiones de Chile (4-27%) (Genersch *et al.*, 2010; Molineri *et al.*, 2017; Vargas *et al.*, 2017; Teixeira *et al.*, 2008). Otro trabajo en Uruguay publicado por Antúñez *et al.* (2015) encontró un porcentaje de colonias infectadas por el ABPV sorpresivamente alto (~95%), aunque este resultado corresponde a un muestreo acotado a dos apiarios del país, que están dentro de la región con mayor densidad de colonias. Ese resultado no se puede extrapolar a otras regiones. La baja prevalencia encontrada en esta tesis podría ser explicada por el momento de la toma de muestras, ya que el APBV tiene un pico de prevalencia durante la primavera y verano, que se reduce al entrar el otoño (Runckel *et al.*, 2011). Las bajas cargas virales encontradas en esta tesis concuerdan con el monitoreo anterior (Anido *et al.*, 2015), y podrían ser explicadas por la estacionalidad del patógeno. Esta es moderada por factores ambientales, y la presencia de vectores como *V. destructor* (Ball y Allen, 1988; Traynor *et al.*, 2016). Si bien la correlación entre el ácaro y el virus ABPV no fue significativa en esta tesis, sí ha sido reportada en varios trabajos anteriores (Antúñez *et al.*, 2015; Genersch *et al.*, 2010; Molineri *et al.*, 2017).

Un resultado sorpresivo es el del virus BQCV, que presentó una baja prevalencia (22%), mucho menor a las reportadas en trabajos previos (80 y 90%; Anido *et al.*, 2015; Antúñez *et al.*, 2006). Sin embargo, el BQCV presentó una amplia distribución en el territorio, similar a la reportada en el monitoreo del 2011 (Anido *et al.*, 2015). La

prevalencia actual es similar a la reportada en la región, en países como Argentina, Brasil, y mucho menor que la encontrada en algunas regiones de Chile (8%, 37% y 72-100% respectivamente; Molineri *et al.*, 2017; Vargas *et al.*, 2017; Teixeira *et al.*, 2008). El BQCV tiene un pico de prevalencia en verano, donde hay más cantidad de abejas y luego disminuye al otoño (Antúñez *et al.*, 2015; Bailey *et al.*, 1981; Beaupaire *et al.*, 2020). En este trabajo gran parte de las muestras se colectaron en otoño, lo que podría explicar la baja prevalencia.

En cuanto al CBPV, se encontró una mayor prevalencia (25%) que la reportada para Argentina y Chile (2,2% y 10-18% respectivamente; Molineri *et al.*, 2017; Vargas *et al.*, 2017). La presencia de este virus ya se había detectado en Uruguay (61% en 2005 y 47% en 2006), aunque debe tenerse en cuenta que las muestras fueron tomadas de colonias con síntomas (Antúñez *et al.*, 2005, 2006). Este virus no tiene una estacionalidad clara, sino que su presencia está influenciada por factores ambientales, así como por la dinámica poblacional de la abeja (Coulon *et al.*, 2018). Aunque éste fue uno de los primeros virus descritos para las abejas melíferas (Bailey *et al.*, 1968), aún falta mucho de su biología por dilucidar.

El DWV presentó una prevalencia de 31%, similar al valor hallado en 2011 (29%; Anido *et al.*, 2015), y a trabajos en otros países (33% en Alemania, 35% en Argentina, 8-46% en Chile, 20% en Brasil; Genersch *et al.*, 2010; Molineri *et al.*, 2017; Vargas *et al.*, 2017; Teixeira *et al.*, 2008). A su vez, la distribución fue similar a la encontrada en 2011 (Anido *et al.*, 2015). La amplitud del rango de variación y las altas cargas virales de este virus, también concuerdan con lo encontrado por Anido *et al.* (2015).

En este trabajo, así como en 2011, se encontró una correlación positiva entre el DWV y *V. destructor* (Anido *et al.*, 2015). Además, se encontró que las abejas parasitadas con más de 7% por *V. destructor* tienen mayor riesgo de estar infectadas por el virus DWV. La interacción *V. destructor* - DWV ha sido ampliamente descrita en la literatura, y se reportó que *V. destructor* inyecta el virus en la abeja al alimentarse (Bowen-Walker *et al.*, 1999; Martin y Brettell, 2019; Santillan-Galicia *et al.*, 2010). Trabajos más recientes han reportado que este virus incluso puede replicarse en el ácaro, lo que podría tener mayores implicancias en la salud de las abejas (Damayo *et al.*, 2023; Gisder y Genersch, 2021). Estos resultados resaltan la

importancia de mantener niveles de *V. destructor* lo más bajos posibles, así como de seguir investigando las relaciones hospedero-vector-patógeno.

El virus SBV presentó una prevalencia 1,4 veces mayor que en 2011 (19%), y una distribución más amplia, encontrándose en 4 departamentos más (Anido *et al.*, 2015). Si bien en este trabajo se encontraron casos de altas cargas virales, no se observaron síntomas del virus al momento del muestreo, lo que indicaría que la infección sería asintomática.

Las asociaciones encontradas entre los virus BQCV-SBV, CBPV-DWV y CBPV-SBV, y en el caso de BQCV-SBV también reportada por Antúñez *et al.* (2015), podrían darse de manera indirecta a través del debilitamiento de la abeja, que al ser infectada por un patógeno, quedaría propensa a coinfecciones con otros.

Otros de los patógenos más estudiados son los microsporidios *N. ceranae* y *N. apis*. En este trabajo solamente se identificó la especie *N. ceranae*, coincidiendo con estudios previos en el país (Anido *et al.*, 2015; Antúñez *et al.*, 2015; Invernizzi *et al.*, 2009). Trabajos realizados en España han encontrado una asociación entre la presencia de *N. ceranae* y la pérdida de colonias (Martín-Hernández *et al.*, 2018). Por esta razón es que la alta prevalencia del patógeno sigue siendo una preocupación para los apicultores y la comunidad científica a nivel mundial. En este estudio la prevalencia de *N. ceranae* fue la más alta (63%), y tres veces más alta que la encontrada en 2011 (14%), estando en ambos casos ampliamente distribuida en el país (Anido *et al.*, 2015). Esta notoria diferencia en las prevalencias podría deberse a las fechas de muestreo, ya que en el trabajo de Anido *et al.* (2015) las muestras fueron tomadas en el mes de marzo (fines de verano-comienzo de otoño), mientras que las muestras de este trabajo fueron colectadas mayormente en mayo (mediados de otoño). Esto concuerda con el trabajo de Antúñez *et al.* (2015), donde encontraron un mayor nivel de infestación por *N. ceranae* en los meses de invierno (junio-septiembre) que a fines del verano (marzo).

En esta tesis se detectó el microsporidio con dos técnicas distintas y complementarias. Por un lado, el conteo de esporas por microscopía óptica, y por otro, PCR-multiplex. Si bien la microscopía permite cuantificar las esporas en el intestino de las abejas, también tiene como limitación la dificultad de distinguir entre

especies (Martín-Hernández *et al.*, 2018). Es por esto que la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) recomienda el método molecular de PCR-multiplex para identificar la presencia del microsporidio en abejas, y actualmente es el único método “aceptado” como confiable para la identificación de *Nosema* spp. (Marín-García *et al.*, 2022; Martín-Hernández *et al.*, 2007, 2018). En este trabajo se obtuvieron diferentes resultados según la técnica empleada (38% por PCR-multiplex y 55% por microscopía). Esto podría deberse a que se utilizaron diferentes abejas para cada técnica, siendo razonable que exista variación dentro de una colonia, donde no todas las abejas tienen por qué estar infectadas, ni tener la misma carga de esporas.

En esta tesis *Nosema ceranae* se correlacionó negativamente con el número de abejas adultas y también con la cantidad de cría, coincidiendo con estudios previos (Branchiccela *et al.*, 2019). Además, en el trabajo realizado por Antúnez *et al.* (2013), se reportó que un alto nivel de parasitación con *N. ceranae* disminuyó la población de abejas adultas y la cantidad de cría de las colonias afectadas, también en concordancia con esta tesis. Este microsporidio genera daño en las abejas a varios niveles. Por un lado, consume parte de los carbohidratos que la abeja ingiere, privando a la abeja de utilizar estos nutrientes (Mayack y Naug, 2009) provoca la pérdida de reservas lipídicas, pudiendo llevar a un estado de desnutrición (Li *et al.*, 2018). A nivel de sistema inmune, se reportó que suprime la expresión de genes vinculados a la defensa frente a patógenos (Antúnez *et al.*, 2009a). Los cambios generados por la infección inducen un pecoreo temprano, interrumpiendo el cuidado de las larvas (Dussaubat *et al.*, 2010). Todo esto podría desencadenar en una disminución en la población de abejas, lo que podría explicar la correlación encontrada en este estudio. La estacionalidad del microsporidio también podría estar involucrada, ya que los niveles de infestación aumentan hacia el invierno, cuando la población de abejas desciende por su ciclo natural (Martín-Hernández *et al.*, 2018).

En cuanto a *P. larvae*, agente causal de la Loque Americana, los resultados de la prevalencia de esporas en miel son preocupantes. A principios de los años 2000 se detectaron los primeros casos de esta enfermedad en Uruguay (Piccini y Zunino, 2001). Posteriormente se comprobó que la bacteria se había extendido rápidamente a casi todo el país, presentando una prevalencia en miel del 51% (Antúnez *et al.*,

2004). Después de un gran esfuerzo de informar y recomendar medidas preventivas a los apicultores, incluyendo la quema de colmenas afectadas, la prevalencia de la bacteria en miel disminuyó a 2% en 2011 (Antúñez *et al.*, 2012). En estos diez años la prevalencia aumentó a 11%, siendo un llamado de atención. Cabe destacar que en Uruguay no se aplica ningún tratamiento antibiótico en las colonias, y que aún así la prevalencia de *P. larvae* se ha mantenido relativamente baja en los últimos 10 años. Por lo tanto, para evitar que la prevalencia siga aumentando se deben tomar medidas preventivas. Los apicultores pueden examinar las colonias y detectar a tiempo los síntomas visibles de la enfermedad (larvas de aspecto gomoso amarronado o escamas; Hansen y Brødsgaard, 1999). Entender el patrón de distribución del patógeno también contribuye al conocimiento de esta enfermedad de denuncia obligatoria en Uruguay. Con este fin, nuestro laboratorio trabaja en colaboración con el DILAVE desde 2001, monitoreando la situación a través del análisis de muestras de miel, Palacios *et al.* (en preparación).

En este estudio la bacteria *P. larvae* fue identificada en la región oeste, que como se mencionó previamente, es la zona que posee mayor densidad de colonias en nuestro país. Una posible explicación de por qué esta bacteria siempre ha sido detectada principalmente en esta región podría ser por la cercanía con Argentina, país donde fue detectada por primera vez en Sudamérica (Alippi, 1992b), y donde sigue presente en la actualidad (Maggi *et al.*, 2020). El comercio e intercambio de material entre los países podría favorecer la diseminación de las esporas, además de la cercanía geográfica que podría permitir el vuelo de abejas infectadas entre los países.

Por último, la prevalencia de *L. passim* en 2021 fue 4,6 veces más alta que la encontrada en el monitoreo del 2011 para Uruguay (13%; Castelli *et al.*, 2019). Este tripanosomátido ha sido reportado también en países de la región como Argentina (38%) y Chile (40-90%; Castelli *et al.*, 2019; Arismendi *et al.*, 2016). En el caso de Chile, esta prevalencia no puede tomarse como nacional, ya que el número de muestras utilizadas no es representativo del país (Castelli *et al.*, 2019). Dos estudios realizados en apiarios del Uruguay reportaron un aumento en la prevalencia del tripanosomátido hacia el invierno/primavera (Arredondo, 2021; Branchiccela *et al.*, 2019), lo que coincide con la alta prevalencia encontrada en este trabajo. Con

respecto a su distribución, *L. passim* estuvo presente en muestras de casi todo el territorio nacional, la cual es más amplia que la encontrada por Castelli *et al.* (2019) en 2011.

En esta tesis se encontró una asociación entre *L. passim* y *N. ceranae*. Esta correlación ya había sido reportada por Arismendi *et al.* (2020) en Chile. Sin embargo, la relación aún no está clara, ya que se han encontrado resultados contradictorios. Por un lado, el estudio realizado en Chile encontró una supresión competitiva entre el tripanosomátido y el microsporidio, mientras que en esta tesis se encontró que en presencia de *L. passim* hay un mayor riesgo de encontrar *N. ceranae*. Este tripanosomátido está siendo cada vez más estudiado, y sin embargo, la evidencia actual sigue siendo contradictoria. Se debe continuar investigando sobre su biología, la interacción con otros patógenos y las consecuencias que tienen en la salud de las abejas melíferas.

En líneas generales, los mayores niveles de infestación o infección en el oeste del país (de *V. destructor*, *N. ceranae* y virus) podrían ser explicados por la alta densidad de colonias en esa zona. Ha sido propuesto que una mayor densidad de hospederos aumenta las oportunidades para la transmisión de patógenos (Bull, 1994), por lo que regiones con mayor cantidad de colonias, también implican un mayor contacto entre abejas (por ejemplo: pillaje) y el uso compartido de los mismos recursos florales (Fries y Camazine, 2001; Pfeiffer y Crailsheim, 1998).

Este monitoreo fue abarcativo de todo el territorio nacional, y permitió obtener un panorama general de la distribución geográfica de los patógenos, así como analizar correlaciones entre ellos. Además, los datos y muestras recabadas en este trabajo servirán de insumo para futuras investigaciones. Este tipo de monitoreo repetidos en el tiempo permiten generar estudios longitudinales que analicen la situación sanitaria de las colonias de abejas en Uruguay.

La vigilancia periódica de las plagas y patógenos en las colonias de abejas melíferas es sumamente importante para su prevención y tratamiento a tiempo. En este sentido, es recomendable realizar capacitaciones para apicultores en todo el país, ya que se ha reportado que la educación de los apicultores puede mejorar la supervivencia de las colonias (Jacques *et al.*, 2017). Además la colaboración y el

trabajo conjunto entre apicultores, técnicos y científicos, genera instancias enriquecedoras, mezclando conocimientos teóricos y salidas al campo. Esto podría ayudar a los apicultores a identificar los síntomas de diversas enfermedades, evaluar si están presentes algunas de las plagas y cómo y cuándo se deben realizar las aplicaciones de tratamientos.

Las implicancias de este estudio van más allá de la escala nacional, ya que la dispersión global de patógenos es considerada una amenaza grave a la biodiversidad, y una posible causa principal de la pérdida de polinizadores, sobre todo con la emergencia de nuevas especies o cepas (Maggi *et al.*, 2016a).

Además, estudiar el estado de salud de la abeja melífera da información acerca de los potenciales peligros para las especies nativas en Latinoamérica (Maggi *et al.*, 2016a).

Dado que no existen muchos monitoreos nacionales en países de Latinoamérica, este es un ejemplo y antecedente para futuras investigaciones. Este estudio aporta datos valiosos de esta región, y suma al análisis de patrones y tendencias globales de las plagas y patógenos que afectan la salud de las abejas melíferas en el mundo.

6. Conclusiones

Todos los patógenos de mayor importancia sanitaria a nivel mundial analizados en este estudio y presentes hace 10 años, continúan estando presentes en el país.

Varroa destructor está ampliamente distribuido en todo el territorio a pesar de los esfuerzos por controlarlo.

Los virus ABPV, BQCV, CBPV, DWV y SBV se detectaron en todo el país, en algunos casos con amplias distribuciones y otros con distribuciones restringidas al oeste y sur del país.

El microsporidio *N. apis*, y los virus IAPV y KBV no fueron detectados.

El virus DWV se correlacionó positivamente con *V. destructor*, y se encontró un mayor riesgo de encontrar el DWV en colonias con más de 7% de infestación con el ácaro.

Nosema ceranae es la única especie de microsporidio identificado en el país, y tiene una alta prevalencia.

A pesar de la creciente prevalencia de *P. larvae*, ninguna de las colonias presentó síntomas de Loque Americana.

Lotmaria passim mostró una alta prevalencia y amplia distribución en el país, y se encontró una asociación con *N. ceranae*.

7. Perspectivas

Teniendo en cuenta la importancia del monitoreo periódico de plagas y patógenos que afectan a las abejas a nivel nacional, para conocer su distribución y prevalencia, aprender sobre la biología y la interacción hospedero - patógeno, y para diseñar tratamientos adecuados, es necesario continuar estos monitoreos con periodicidad.

Por otro lado, dado que *V. destructor* es la mayor amenaza biótica para la apicultura, es necesario optimizar los tratamientos acaricidas. El ácaro ha generado resistencia a muchos acaricidas sintéticos, por lo que el uso correcto (frecuencia y modos de aplicación) de acaricidas orgánicos puede presentar una ventaja para los apicultores. Para ello sería necesario un estudio experimental con distintas frecuencias y tipos de tratamiento, con el fin de optimizar las estrategias de control.

Finalmente, sería interesante estudiar el fenómeno de *spill-over* de los patógenos de la abeja melífera hacia especies nativas. En Uruguay se ha reportado este fenómeno, por ejemplo se detectó la presencia de *N. ceranae* y los virus ABPV, BQCV, DWV y SBV en los abejorros nativos *Bombus pauloensis* y *Bombus bellicosus* (Arbulo *et al.*, 2015; Salvarrey *et al.*, 2021). Sin embargo, aún no se conoce el rol de estas especies nativas en los ciclos de los patógenos ni las consecuencias que pueden tener sobre ellas. Se podría realizar un monitoreo de plagas y patógenos a nivel nacional con especies de abejas nativas, y ahondar en los mecanismos de transmisión de los patógenos entre diferentes especies de abejas.

8. Bibliografía

- Aizen, M. A., Garibaldi, L. A., Cunningham, S. A., y Klein, A. M. (2008). Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency. *Current Biology: CB*, 18(20), 1572-1575. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.08.066>
- Alippi, A. M. (1992a). Characterization of *Bacillus* larvae White, the causative agent of American foulbrood of honey-bees. First record of its occurrence in Argentina. *Revista Argentina De Microbiologia*, 24(2), 67-72.
- Alippi, A. M. (1992b). Detection of *Bacillus* larvae in mixed populations of bacterial spores from larval remains. *Microbiologia (Madrid, Spain)*, 8(2), 115-118.
- Alippi, A. M. (1996). Characterization of isolates of *Paenibacillus* larvae with biochemical type and oxytetracycline resistance. *Revista Argentina De Microbiologia*, 28(4), 197-203.
- Almecija, G., Poirot, B., Cochard, P., y Suppo, C. (2020). Inventory of *Varroa destructor* susceptibility to amitraz and tau-fluvalinate in France. *Experimental y Applied Acarology*, 82(1), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00535-w>
- Anderson, D. L., y Trueman, J. W. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental y Applied Acarology*, 24(3), 165-189. <https://doi.org/10.1023/a:1006456720416>
- Anido, M., Branchiccela, B., Castelli, L., Harriet, J., Campá, J., Zunino, P., y Antúnez, K. (2015). Prevalence and distribution of honey bee pests and pathogens in Uruguay. *Journal of Apicultural Research*, 54(5), 532-540. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1175731>
- Annoscia, D., Brown, S. P., Di Prisco, G., De Paoli, E., Del Fabbro, S., Frizzera, D., Zanni, V., Galbraith, D. A., Caprio, E., Grozinger, C. M., Pennacchio, F., y Nazzi, F. (2019). Haemolymph removal by *Varroa* mite destabilizes the dynamical interaction between immune effectors and virus in bees, as predicted by Volterra's model. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1901), 20190331. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0331>
- Antúnez, K., Anido, M., Arredondo, D., Evans, J. D., y Zunino, P. (2011). *Paenibacillus* larvae enolase as a virulence factor in honeybee larvae infection. *Veterinary Microbiology*, 147(1-2), 83-89. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.06.004>
- Antúnez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campa, J., Invernizzi, C., Santos, E., Higes, M., Martín-Hernández, R., y Zunino, P. (2015). Seasonal Variation of Honeybee Pathogens and its Association with Pollen Diversity in Uruguay. *Microbial*

- Ecology*, 70(2), 522-533. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0594-7>
- Antúñez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campá, J., Martín-Hernández, R., Higes, M., y Zunino, P. (2013). *Despoblación de colmenas. Proyecto FPTA-258 Despoblación de colmenas: Determinación de sus causas en Uruguay. Serie FPTA-INIA 41.*
- Antúñez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campá, J., y Zunino, P. (2012). American Foulbrood in Uruguay: Twelve years from its first report. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(1), 129-131. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.02.008>
- Antúñez, K., Anido, M., Evans, J. D., y Zunino, P. (2010). Secreted and immunogenic proteins produced by the honeybee bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Veterinary Microbiology*, 141(3-4), 385-389. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.006>
- Antúñez, K., Anido, M., Schlapp, G., Evans, J. D., y Zunino, P. (2009a). Characterization of secreted proteases of *Paenibacillus larvae*, potential virulence factors involved in honeybee larval infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102(2), 129-132. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.010>
- Antúñez, K., D' Alessandro, B., Corbella, E., y Zunino, P. (2005). Detection of chronic bee paralysis virus and acute bee paralysis virus in Uruguayan honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90(1), 69-72. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.07.001>
- Antúñez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E., Ramallo, G., y Zunino, P. (2006). Honeybee viruses in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93(1), 67-70. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.05.009>
- Antúñez, K., D'Alessandro, B., Piccini, C., Corbella, E., y Zunino, P. (2004). *Paenibacillus larvae* spores in honey samples from Uruguay: A nationwide survey. *Journal of Invertebrate Pathology*, 86(1-2), 56-58. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.03.011>
- Antúñez, K., Invernizzi, C., Mendoza, Y., vanEngelsdorp, D., y Zunino, P. (2017). Honeybee colony losses in Uruguay during 2013–2014. *Apidologie*, 48(3), 364-370. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0482-2>
- Antúñez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., y Higes, M. (2009b). Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology*, 11(9), 2284-2290. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01953.x>
- Antúñez, K., Requier, F., Aldea Sánchez, P., Basualdo, M., Branchiccela, B., Calderón, R., Correa-Benítez, A., Delgado-Cañedo, A., Fuselli, S., Morales, C., Pérez-Castro, E., Plischuk, S., Pablo Porrini, M., ... Invernizzi, C. (2018). SOLATINA: A Latin-American Society for Bee Research to Foster the Interactions Between Scientists and Coordinate Large-Scale Research Programs. *Bee World*, 95(4), 124-127.

<https://doi.org/10.1080/0005772X.2018.1508813>

- Araújo, J. P. M., & Hughes, D. P. . Diversity of Entomopathogenic Fungi. En *Advances in Genetics* (Vol. 94, pp. 1-39). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.01.001>
- Arbulo, N., Antúnez, K., Salvarrey, S., Santos, E., Branchiccela, B., Martín-Hernández, R., Higes, M., y Invernizzi, C. (2015). High prevalence and infection levels of *Nosema ceranae* in bumblebees *Bombus atratus* and *Bombus bellicosus* from Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*, 130, 165-168. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.018>
- Arismendi, N., Bruna, A., Zapata, N., & Vargas, M. (2016). PCR-specific detection of recently described *Lotmaria passim* (Trypanosomatidae) in Chilean apiaries. *Journal of Invertebrate Pathology*, 134, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.12.008>
- Arismendi, N., Caro, S., Castro, M. P., Vargas, M., Riveros, G., y Venegas, T. (2020). Impact of Mixed Infections of Gut Parasites *Lotmaria passim* and *Nosema ceranae* on the Lifespan and Immune-related Biomarkers in *Apis mellifera*. *Insects*, 11(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/insects11070420>
- Arredondo, D. (2021). *Efecto de la administración de un probiótico basado en cepas de Apilactobacillus kunkeei sobre la salud de las abejas melíferas*. Universidad de la República.
- Arredondo, D., Añón, G., Campá, J., Harriet, J., Castelli, L., Zunino, P., y Antúnez, K. (2023). Supplementation of honey bee production colonies with a native beneficial microbe mixture. *Beneficial Microbes*, 1-16. <https://doi.org/10.1163/18762891-20220099>
- Arrese, E. L., y Soulages, J. L. (2010). Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*, 55, 207-225. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356>
- Ascher, J., y Pickering, J. (2020). *Discover Life bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila)*. https://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species
- Aurell, D., Bruckner, S., Wilson, M., Steinhauer, N., y Williams, G. R. (2023). A national survey of managed honey bee colony losses in the USA: Results from the Bee Informed Partnership for 2020–21 and 2021–22. *Journal of Apicultural Research*, 1-14. <https://doi.org/10.1080/00218839.2023.2264601>
- Australian Government. (2023). *Varroa mite (Varroa destructor) | Outbreak*. https://www.outbreak.gov.au/current-outbreaks/varroa-mite#toc_3
- Bacandritsos, N., Papanastasiou, I., Saitanis, C., Nanetti, A., y Roinioti, E. (2007). Efficacy of repeated trickle applications of oxalic acid in syrup for varroosis control in *Apis mellifera*: Influence of meteorological conditions and presence of brood. *Veterinary Parasitology*, 148(2), 174-178. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.06.001>

- Bailey, L. (1971). Honey-bee viruses. *Science Progress (1933-)*, 59(235), 309-323.
- Bailey, L., y Ball, B. V. (1991). *Honey Bee Pathology—2nd Edition* (2nd ed.). Academic Press.
<https://shop.elsevier.com/books/honey-bee-pathology/bailey/978-0-12-073481-8>
- Bailey, L., Ball, B. V., y Perry, J. N. (1981). The prevalence of viruses of honey bees in Britain. *Annals of Applied Biology*, 97(1), 109-118.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1981.tb02999.x>
- Bailey, L., Gibbs, A. J., y Woods, R. D. (1968). The Purification and Properties of Chronic Bee-paralysis Virus. *Journal of General Virology*, 2(2), 251-260.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-2-2-251>
- Bailey, L., y Woods, R. D. (1974). Three previously undescribed viruses from the honey bee. *The Journal of General Virology*, 25(2), 175-186.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-25-2-175>
- Baker, A., y Schroeder, D. (2008). Occurrence and genetic analysis of picorna-like viruses infecting worker bees of *Apis mellifera* L. populations in Devon, South West England. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(2), 239-242.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.02.010>
- Ball, B. V. (1989). *Varroa jacobsoni* as a virus vector. En *Present Status of Varroa Mite Control* (pp. 241-244).
- Ball, B. V., y Allen, M. F. (1988). The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Annals of Applied Biology*, 113(2), 237-244. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1988.tb03300.x>
- Ball, B. V., y Bailey, L. (1991). *Viruses of honey bees* (J. R. Adams y J. R. Bonami, Eds.; pp. 525-551). CRC Press, Boca Raton, Florida.
<https://repository.rothamsted.ac.uk/item/867vy/viruses-of-honey-bees>
- Beaurepaire, A., Krieger, K. J., y Moritz, R. F. A. (2017). Seasonal cycle of inbreeding and recombination of the parasitic mite *Varroa destructor* in honeybee colonies and its implications for the selection of acaricide resistance. *Infection, Genetics and Evolution*, 50, 49-54. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.02.011>
- Beaurepaire, A., Piot, N., Doublet, V., Antunez, K., Campbell, E., Chantawannakul, P., Chejanovsky, N., Gajda, A., Heerman, M., Panziera, D., Smagghe, G., Yañez, O., de Miranda, J. R., y Dalmon, A. (2020). Diversity and Global Distribution of Viruses of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. *Insects*, 11(4), 239.
<https://doi.org/10.3390/insects11040239>
- Benaets, K., Van Geystelen, A., Cardoen, D., De Smet, L., de Graaf, D. C., Schoofs, L., Larmuseau, M. H. D., Brettell, L. E., Martin, S. J., y Wenseleers, T. (2017). Covert deformed wing virus infections have long-term deleterious effects on honeybee

- foraging and survival. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1848), 20162149. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2149>
- Bowen-Walker, P. L., Martin, S. J., y Gunn, A. (1999). The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73(1), 101-106. <https://doi.org/10.1006/jipa.1998.4807>
- Branchiccela, B., Aguirre, C., Parra, G., Estay, P., Zunino, P., y Antúnez, K. (2014). Genetic changes in *Apis mellifera* after 40 years of Africanization. *Apidologie*, 45(6), 752-756. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0293-2>
- Branchiccela, B., Castelli, L., Corona, M., Díaz-Cetti, S., Invernizzi, C., Martínez De La Escalera, G., Mendoza, Y., Santos, E., Silva, C., Zunino, P., y Antúnez, K. (2019). Impact of nutritional stress on the honeybee colony health. *Scientific Reports*, 9(1), 10156. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46453-9>
- Brødsgaard, C. J., Ritter, W., y Hansen, H. (1998). Response of in vitro reared honey bee larvae to various doses of *Paenibacillus* larvae spores. *Apidologie*, 29(6), 569-578. <https://doi.org/10.1051/apido:19980609>
- Bruckner, S., Wilson, M., Aurell, D., Rennich, K., vanEngelsdorp, D., Steinhauer, N., y Williams, G. R. (2023). A national survey of managed honey bee colony losses in the USA: Results from the Bee Informed Partnership for 2017–18, 2018–19, and 2019–20. *Journal of Apicultural Research*, 62(3), 429-443. <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2158586>
- Buendía-Abad, M., García-Palencia, P., de Pablos, L. M., Alunda, J. M., Osuna, A., Martín-Hernández, R., y Higes, M. (2022). First description of *Lotmaria passim* and *Crithidia mellificae* haptomonad stages in the honeybee hindgut. *International Journal for Parasitology*, 52(1), 65-75. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.06.005>
- Bull, J. J. (1994). Virulence. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 48(5), 1423-1437. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1994.tb02185.x>
- Burgett, M., Shorney, S., Cordara, J., Gardiol, G., y Sheppard, W. S. (1995). The present status of Africanized honey bees in Uruguay. *American Bee Journal*, 135(5), 328-330.
- Calderone, N. W. (1999). Evaluation of Formic Acid and a Thymol-Based Blend of Natural Products for the Fall Control of *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) in Colonies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 92(2), 253-260. <https://doi.org/10.1093/jee/92.2.253>
- Castelli, L., Branchiccela, B., Invernizzi, C., Tomasco, I., Basualdo, M., Rodríguez, M., Zunino, P., y Antúnez, K. (2019). Detection of *Lotmaria passim* in Africanized and European honey bees from Uruguay, Argentina and Chile. *Journal of Invertebrate Pathology*, 160, 95-97. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.11.004>

- Castelli, Loreley, L., Branchiccela, Belén, B., Garrido, P. M., Invernizzi, C., Porrini, M. P., Romero, H., Santos, E., Zunino, P., y Antúnez, K. (2020). Impact of Nutritional Stress on Honeybee Gut Microbiota, Immunity, and *Nosema ceranae* Infection. *Microbial Ecology*, 80(4), 908-919. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01538-1>
- Chase, A. F., y Chase, D. Z. (2005). *The early classic period at Caracol, Belize: Transitions, complexity, and methodological issues in Maya archaeology*. 2, 17-38.
- Chen, Y.-P., Evans, J. D., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., Litkowski, A. M., y Pettis, J. S. (2009). Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(3), 204-209. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.05.012>
- Chen, Y.-P., Pettis, J. S., Zhao, Y., Liu, X., Tallon, L. J., Sadzewicz, L. D., Li, R., Zheng, H., Huang, S., Zhang, X., Hamilton, M. C., Pernal, S. F., Melathopoulos, A. P., Yan, X., y Evans, J. D. (2013). Genome sequencing and comparative genomics of honey bee microsporidia, *Nosema apis* reveal novel insights into host-parasite interactions. *BMC Genomics*, 14(1), 451. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-451>
- Chen, Y.-P., y Siede, R. (2007). Honey bee viruses. En *Advances in Virus Research* (Vol. 70, pp. 33-80).
- Cordara, J. J. (2010). *Apicultura: La primer colonia de abejas en la República Oriental del Uruguay*.
- Cornman, R. S., Chen, Y.-P., Schatz, M. C., Street, C., Zhao, Y., Desany, B., Egholm, M., Hutchison, S., Pettis, J. S., Lipkin, W. I., y Evans, J. D. (2009). Genomic Analyses of the Microsporidian *Nosema ceranae*, an Emergent Pathogen of Honey Bees. *PLOS Pathogens*, 5(6), e1000466. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000466>
- Coulon, M., Schurr, F., Martel, A.-C., Cougoule, N., Bégaud, A., Mangoni, P., Dalmon, A., Alaux, C., Le Conte, Y., Thiéry, R., Ribière-Chabert, M., y Dubois, E. (2018). Metabolisation of thiamethoxam (a neonicotinoid pesticide) and interaction with the Chronic bee paralysis virus in honeybees. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 144, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.10.009>
- Crane, E. (1999). *The World History of Beekeeping and Honey Hunting*. Routledge, Inc.
- Dalmon, A., Desbiez, C., Coulon, M., Thomasson, M., Le Conte, Y., Alaux, C., Vallon, J., y Moury, B. (2017). Evidence for positive selection and recombination hotspots in Deformed wing virus (DWV). *Scientific Reports*, 7, 41045. <https://doi.org/10.1038/srep41045>
- Damayo, J. E., McKee, R. C., Buchmann, G., Norton, A. M., Ashe, A., y Remnant, E. J. (2023). *Virus replication in the honey bee parasite, Varroa destructor* (p. 2023.07.16.549232). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.07.16.549232>
- de Miranda, J. R., Bailey, L., Ball, B. V., Blanchard, P., Budge, G. E., Chejanovsky, N., Chen,

- Y.-P., Gauthier, L., Genersch, E., de Graaf, D. C., Ribière, M., Ryabov, E., De Smet, L., y van der Steen, J. J. M. (2013). Standard methods for virus research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1-56. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.22>
- de Miranda, J. R., Cordoní, G., y Budge, G. (2010). The Acute bee paralysis virus–Kashmir bee virus–Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S30-S47. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.014>
- Delaplane, K. S., y Hood, W. M. (1999). Economic threshold for *Varroa jacobsoni* Oud. In the southeastern USA. *Apidologie*, 30(5), 383-395. <https://doi.org/10.1051/apido:19990504>
- Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S., Anderson, D., Locke, B., Delaplane, K., Wauquiez, Q., Tannahill, C., Frey, E., Ziegelmann, B., Rosenkranz, P., y Ellis, J. (2013). Standard methods for varroa research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-54. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.09>
- Dolan, P. T., Whitfield, Z. J., y Andino, R. (2018). Mechanisms and Concepts in RNA Virus Population Dynamics and Evolution. *Annual Review of Virology*, 5(1), 69-92. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041718>
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Alaux, C., Tchamitchan, S., Brunet, J.-L., Plettner, E., Belzunces, L. P., y Le Conte, Y. (2010). Nosema spp. Infection alters pheromone production in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Chemical Ecology*, 36(5), 522-525. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9786-2>
- Evans, J. D. (2006). Beepath: An ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93(2), 135-139. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.04.004>
- Evans, J. D., y Cook, S. C. (2018). Genetics and physiology of *Varroa* mites. *Current Opinion in Insect Science*, 26, 130-135. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.005>
- Fluri, P., Lüscher, M., Wille, H., y Gerig, L. (1982). Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *Journal of Insect Physiology*, 28(1), 61-68. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(82\)90023-3](https://doi.org/10.1016/0022-1910(82)90023-3)
- Francis, R. M., Nielsen, S. L., y Kryger, P. (2013). Varroa-virus interaction in collapsing honey bee colonies. *PloS One*, 8(3), e57540. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057540>
- Fries, I. (1989). Short-interval treatments with formic acid for control of *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies in cold climates. *Short-interval treatments with formic acid for control of Varroa jacobsoni in honey bee (Apis mellifera) colonies in cold climates*, 19(4), 213-216.
- Fries, I. (2010). Nosema ceranae in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of*

- Invertebrate Pathology*, 103. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.017>
- Fries, I., y Camazine, S. (2001). Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie*, 32(3), 199-214. <https://doi.org/10.1051/apido:2001122>
- Fries, I., Chauzat, M.-P., Chen, Y.-P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., Higes, M., McMahon, D. P., Martín-Hernández, R., Natsopoulou, M., Paxton, R. J., Tanner, G., Webster, T. C., y Williams, G. R. (2013). Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1). <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.14>
- Fries, I., Feng, F., da Silva, A., Slemenda, S. B., y Pieniazek, N. J. (1996). *Nosema ceranae* n. Sp. (Microspora, Nosematidae), Morphological and Molecular Characterization of a Microsporidian Parasite of the Asian Honey bee *Apis ceranae* (Hymenoptera, Apidae). 32, 356-365.
- Fuchs, S. (1992). Choice in *Varroa jacobsoni* Oud. Between honey bee drone or workerbrood cells for reproduction. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 31(6), 429-435. <https://doi.org/10.1007/BF00170610>
- Garibaldi, L. A., Steffan-Dewenter, I., Winfree, R., Aizen, M. A., Bommarco, R., Cunningham, S. A., Kremen, C., Carvalheiro, L. G., Harder, L. D., Afik, O., Bartomeus, I., Benjamin, F., Boreux, V., Cariveau, D., Chacoff, ... Klein, A. M. (2013). Wild Pollinators Enhance Fruit Set of Crops Regardless of Honey Bee Abundance. *Science*, 339(6127), 1608-1611. <https://doi.org/10.1126/science.1230200>
- Garrido, P. M., Antúnez, K., Martín, M., Porrini, M. P., Zunino, P., y Eguaras, M. J. (2013). Immune-related gene expression in nurse honey bees (*Apis mellifera*) exposed to synthetic acaricides. *Journal of Insect Physiology*, 59(1), 113-119. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.10.019>
- Genersch, E. (2010). American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103 Suppl 1, S10-19. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.015>
- Genersch, E., Forsgren, E., Pentikäinen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J., y Fries, I. (2006). Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *Pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *Larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(3), 501-511. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63928-0>
- 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., y Rosenkranz, P. (2010). The German bee monitoring project: A long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*, 41(3), 332-352. <https://doi.org/10.1051/apido/2010014>

- Gisder, S., y Genersch, E. (2021). Direct Evidence for Infection of Varroa destructor Mites with the Bee-Pathogenic Deformed Wing Virus Variant B - but Not Variant A - via Fluorescence-in situ-Hybridization Analysis. *Journal of Virology*, 95(5), e01786-20, JVI.01786-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.01786-20>
- Gómez-Moracho, T., Buendía-Abad, M., Benito, M., García-Palencia, P., Barrios, L., Bartolomé, C., Maside, X., Meana, A., Jiménez-Antón, M. D., Olías-Molero, A. I., Alunda, J. M., Martín-Hernández, R., y Higes, M. (2020). Experimental evidence of harmful effects of Crithidia mellificae and Lotmaria passim on honey bees. *International Journal for Parasitology*, 50(13), 1117-1124. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.06.009>
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., y Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6229), 1255957. <https://doi.org/10.1126/science.1255957>
- Govan, V. A., Allsopp, M. H., y Davison, S. (1999). A PCR Detection Method for Rapid Identification of Paenibacillus larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 2243-2245.
- Gray, A., Nouredine, A., Arab, A., Ballis, A., Brusbardis, V., Douglas, A. B., Cadahía, L., Charrière, J. D., Chlebo, R., Coffey, M. F., Cornelissen, B., Costa, C. A. da, Danneels, E., Danihlík, J., Dobrescu, C., Evans, G., Fedoriak, M., Forsythe, I., Gregorc, A., ... Brodschneider, R. (2023). Honey bee colony loss rates in 37 countries using the COLOSS survey for winter 2019–2020: The combined effects of operation size, migration and queen replacement. *Journal of Apicultural Research*, 62(2), 204-210. <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2113329>
- Gregorc, A., y Planinc, I. (2002). The control of Varroa destructor using oxalic acid. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 163(3), 306-310. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2001.0675>
- Grozinger, C. M., y Flenniken, M. L. (2019). Bee Viruses: Ecology, Pathogenicity, and Impacts. *Annual Review of Entomology*, 64(1), 205-226. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011118-111942>
- Guzmán-Novoa, E., Eccles, L., Calvete, Y., McGowan, J., Kelly, P. G., y Correa-Benítez, A. (2010). Varroa destructor is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (Apis mellifera) colonies in Ontario, Canada. *Apidologie*, 41(4). <https://doi.org/10.1051/apido/2009076>
- Hansen, H., y Brødsgaard, C. J. (1999). *American foulbrood: A review of its biology, diagnosis and control*. 80(1), 5-23.
- Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Janssen, P., Kersters, K., De Vos, P., Logan, N. A., Ali, N., y Berkeley, R. C. (1996). Reclassification of Paenibacillus

- (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *Larvae* and *P. larvae* subsp. *Pulvifaciens*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(1), 270-279. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-1-270>
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., y Meana, A. (2007). Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(3), 211-217. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.11.001>
- Higes, M., Martín, R., y Meana, A. (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92(2), 93-95. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.02.005>
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailon, E., García-Palencia, P., y Meana, A. (2008). *Short Communication Detection of infective Nosema ceranae (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees.*
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Hernández-Rodríguez, C. S., y González-Cabrera, J. (2020). Assessing the resistance to acaricides in *Varroa destructor* from several Spanish locations. *Parasitology Research*, 119(11), 3595-3601. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06879-x>
- Hornitzky, M. A. Z. (1998). The pathogenicity of *Paenibacillus larvae* subsp. *Larvae* spores and vegetative cells to honey bee (*Apis mellifera*) colonies and their susceptibility to royal jelly. *Journal of Apicultural Research*, 37(4), 267-271. <https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100982>
- Hornitzky, M. A. Z., y Nicholls, P. J. (1993). J Medium is Superior to Sheep Blood Agar and Brain Heart Infusion Agar for the Isolation of *Bacillus Larvae* from Honey Samples. *Journal of Apicultural Research*, 32(1), 51-52. <https://doi.org/10.1080/00218839.1993.11101287>
- Human, H., Brodschneider, R., Dietemann, V., Dively, G., Ellis, J. D., Forsgren, E., Fries, I., Hatjina, F., Hu, F.-L., Jaffé, R., Jensen, A. B., Köhler, A., Magyar, J. P., Özkýrým, A., Pirk, C. W. W., ... Zheng, H.-Q. (2013). Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1-53. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.10>
- Invernizzi, C., Abud, C., Tomasco, I. H., Harriet, J., Ramallo, G., Campá, J., Katz, H., Gardiol, G., y Mendoza, Y. (2009). Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(2), 150-153. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.03.006>
- Invernizzi, C., Antúnez, K., Arredondo, D., Branchiccela, B., Castelli, L., Juri, P., Mendoza, Y., Nogueira, E., Salvarrey, S., y Santos, E. (2022). Situación sanitaria de las abejas

- melíferas en Uruguay Novedades de la última década. *Veterinaria (Montevideo)*, 217. <https://doi.org/10.29155/VET.58.217.4>
- Jacques, A., Laurent, M., EPILOBEE Consortium, Ribière-Chabert, M., Saussac, M., Bougeard, S., Budge, G. E., Hendriks, P., y Chauzat, M.-P. (2017). A pan-European epidemiological study reveals honey bee colony survival depends on beekeeper education and disease control. *PloS One*, 12(3), e0172591. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172591>
- James, R., y Li, Z. (2012). *From silkworms to bees: Diseases of beneficial insects*. 2nd. Ed., 425-459.
- Johnson, R. M., Evans, J. D., Robinson, G. E., y Berenbaum, M. R. (2009). Changes in transcript abundance relating to colony collapse disorder in honey bees (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(35), 14790-14795. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906970106>
- Keeling, P. J., y Fast, N. M. (2002). Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 93-116. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160854>
- Kevill, J. L., de Souza, F. S., Sharples, C., Oliver, R., Schroeder, D. C., y Martin, S. J. (2019). DWV-A Lethal to Honey Bees (*Apis mellifera*): A Colony Level Survey of DWV Variants (A, B, and C) in England, Wales, and 32 States across the US. *Viruses*, 11(5), 426. <https://doi.org/10.3390/v11050426>
- Klein, A.-M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., y Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608), 303-313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
- Kritsky, G. (2017). Beekeeping from Antiquity Through the Middle Ages. *Annual Review of Entomology*, 62(1), 249-264. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035115>
- Kukielka, D., Perez, A. M., Higes, M., Del Carmen Bulboa, M., y Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2008). Analytical sensitivity and specificity of a RT-PCR for the diagnosis and characterization of the spatial distribution of three *Apis mellifera* viral diseases in Spain. *Apidologie*, 39(6), 607-617. <https://doi.org/10.1051/apido:2008040>
- Lanzi, G., de Miranda, J. R., Boniotti, M. B., Cameron, C. E., Lavazza, A., Capucci, L., Camazine, S. M., y Rossi, C. (2006). Molecular and Biological Characterization of Deformed Wing Virus of Honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Virology*, 80(10), 4998-5009. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.10.4998-5009.2006>
- Leza, M. M., Miranda-Chueca, M. A., y Purse, B. V. (2016). Patterns in *V. arrea destructor* depend on bee host abundance, availability of natural resources, and climate in Mediterranean apiaries. *Ecological Entomology*, 41(5), 542-553.

<https://doi.org/10.1111/een.12327>

- Li, W., Chen, Y., y Cook, S. (2018). Chronic *Nosema ceranae* infection inflicts comprehensive and persistent immunosuppression and accelerated lipid loss in host *Apis mellifera* honey bees. *International Journal for Parasitology*, 48. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.11.004>
- Locke, B., Forsgren, E., Fries, I., y de Miranda, J. R. (2012). Acaricide Treatment Affects Viral Dynamics in *Varroa destructor*-Infested Honey Bee Colonies via both Host Physiology and Mite Control. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 227-235. <https://doi.org/10.1128/AEM.06094-11>
- Lodesani, M., Costa, C., Serra, G., Colombo, R., y Sabatini, A. G. (2008). Acaricide residues in beeswax after conversion to organic beekeeping methods. *Apidologie*, 39(3), 324-333. <https://doi.org/10.1051/apido:2008012>
- Maggi, M., Antúnez, K., Invernizzi, C., Aldea, P., Vargas, M., Negri, P., Brasesco, C., De Jong, D., Message, D., Teixeira, E., Principal, J., Barrios, C., Ruffinengo, S., Da Silva, R. R., y Eguaras, M. (2016a). Honeybee health in South America. *Apidologie*, 47(6), 835-854. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0445-7>
- Maggi, M., Quintana, S., Revainera, P. D., Porrini, L. P., Meroi Arcerito, F. R., Fernández De Landa, G., Brasesco, C., Di Gerónimo, V., Ruffinengo, S. R., y Eguaras, M. J. (2020). Biotic Stressors Affecting Key Apiaries in Argentina. *Bee World*, 97(2), 45-52. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2019.1699007>
- Maggi, M., Ruffinengo, S. R., Mendoza, Y., Ojeda, P., Ramallo, G., Floris, I., y Eguaras, M. J. (2011). Susceptibility of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) to synthetic acaricides in Uruguay: *Varroa* mites' potential to develop acaricide resistance. *Parasitology Research*, 108(4), 815-821. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2122-5>
- Maggi, M., Tourn, E., Negri, P., Szawarski, N., Marconi, A., Gallez, L., Medici, S., Ruffinengo, S., Brasesco, C., De Feudis, L., Quintana, S., Sammataro, D., y Eguaras, M. (2016b). A new formulation of oxalic acid for *Varroa destructor* control applied in *Apis mellifera* colonies in the presence of brood. *Apidologie*, 47(4), 596-605. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0405-7>
- Marín-García, P. J., Peyre, Y., Ahuir-Baraja, A. E., Garijo, M. M., y Llobat, L. (2022). The Role of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in Honey Bee Colony Losses and Current Insights on Treatment. *Veterinary Sciences*, 9(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/vetsci9030130>
- Martel, A.-C., Zeggane, S., Aurières, C., Drajnudel, P., Faucon, J.-P., y Aubert, M. (2007). Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar® or Asuntol®50. *Apidologie*, 38(6), 534-544. <https://doi.org/10.1051/apido:2007038>

- Martin, S. J., y Brettell, L. E. (2019). Deformed Wing Virus in Honeybees and Other Insects. *Annual Review of Virology*, 6(1), 49-69. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015700>
- Martín-Hernández, R., Bartolomé, C., Chejanovsky, N., Le Conte, Y., Dalmon, A., Dussaubat, C., García-Palencia, P., Meana, A., Pinto, M. A., Soroker, V., y Higes, M. (2018). *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: A 12 years postdetection perspective. *Environmental Microbiology*, 20(4), 1302-1329. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14103>
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A. M., Garrido-Bailón, E., y Higes, M. (2007). Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20), 6331-6338. <https://doi.org/10.1128/AEM.00270-07>
- Mayack, C., y Naug, D. (2009). Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 100(3), 185-188. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.12.001>
- McMahon, D. P., Natsopoulou, M. E., Doublet, V., Fürst, M., Weging, S., Brown, M. J. F., Gogol-Döring, A., y Paxton, R. J. (2016). Elevated virulence of an emerging viral genotype as a driver of honeybee loss. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1833), 20160811. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.0811>
- Mendoza, Y., Antúnez, K., Branchiccela, B., Anido, M., Santos, E., y Invernizzi, C. (2013). *Nosema ceranae* and RNA viruses in European and Africanized honeybee colonies (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Apidologie*, 45. <https://doi.org/10.1007/s13592-013-0241-6>
- Mendoza, Y., Tomasco, I. H., Antúnez, K., Castelli, L., Branchiccela, B., Santos, E., y Invernizzi, C. (2020). Unraveling Honey Bee-Varroa destructor Interaction: Multiple Factors Involved in Differential Resistance between Two Uruguayan Populations. *Veterinary Sciences*, 7(3), 116. <https://doi.org/10.3390/vetsci7030116>
- MGAP. (2022). *ANÁLISIS SECTORIAL Y CADENAS PRODUCTIVAS TEMAS DE POLÍTICA ESTUDIOS*.
- Michener, C. D. (2000). *The Bees of the World*. JHU Press.
- Milani, N. (1999). The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. To acaricides. *Apidologie*, 30(2-3), 229-234.
- Molineri, A. I., Pacini, A., Giacobino, A., Bulacio-Cagnolo, N., Aignasse, A., Zago, L., Fondevila, N., Ferrufino, C., Merke, J., Orellano, E., Bertozzi, E., Pietronave, H., y Signorini, M. L. (2017). Prevalence of honey bee (*Apis mellifera*) viruses in temperate and subtropical regions from Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(2), 166-173. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.12.004>

- Moore, J., Jironkin, A., Chandler, D., Burroughs, N., Evans, D. J., y Ryabov, E. V. (2011). Recombinants between Deformed wing virus and Varroa destructor virus-1 may prevail in Varroa destructor-infested honeybee colonies. *The Journal of General Virology*, 92(Pt 1), 156-161. <https://doi.org/10.1099/vir.0.025965-0>
- Morawetz, L., Köglberger, H., Griesbacher, A., Derakhshifar, I., Crailsheim, K., Brodschneider, R., y Moosbeckhofer, R. (2019). Health status of honey bee colonies (*Apis mellifera*) and disease-related risk factors for colony losses in Austria. *PLOS ONE*, 14(7), e0219293. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219293>
- Mordecai, G. J., Wilfert, L., Martin, S. J., Jones, I. M., y Schroeder, D. C. (2016). Diversity in a honey bee pathogen: First report of a third master variant of the Deformed Wing Virus quasispecies. *The ISME Journal*, 10(5), 1264-1273. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.178>
- Morse, R. A., y Flottum, K. (1997). *Honey Bee Pests, Predators, and Diseases*. A.I. Root Company.
- Nanetti, A., Ralph, B., Charrière, J.-D., Friesd, I., Helland, S., Imdorf, A., Korpela, S., y Kristiansen, P. (2003). Oxalic acid treatments for varroa control (review). *Apiacta*, 38.
- Nordström, S., y Fries, I. (1995). A comparison of media and cultural conditions for identification of *Bacillus larvae* in honey. *Journal of Apicultural Research*, 34(2), 97-103. <https://doi.org/10.1080/00218839.1995.11100894>
- OIE. (1999). *World Animal Health*. 606-607.
- OIE. (2023). Loque americana de las abejas melíferas (infección de las abejas melíferas por *paenibacillus larvae*). En *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres* (12.^a ed.).
- Oldroyd, B. P. (1999). Coevolution while you wait: Varroa jacobsoni, a new parasite of western honeybees. *Trends in Ecology y Evolution*, 14(8), 312-315. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(99\)01613-4](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(99)01613-4)
- Ongus, J. R., Peters, D., Bonmatin, J.-M., Bengsch, E., Vlak, J. M., y van Oers, M. M. (2004). Complete sequence of a picorna-like virus of the genus Iflavirus replicating in the mite Varroa destructor. *The Journal of General Virology*, 85(Pt 12), 3747-3755. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80470-0>
- Oudemans, A. C. (1904). On a new genus and species of parasitic Acari. *Notes from the Leyden Museum*, 24, 216-222.
- Peck, D. T., y Seeley, T. D. (2019). Mite bombs or robber lures? The roles of drifting and robbing in Varroa destructor transmission from collapsing honey bee colonies to their neighbors. *PLOS ONE*, 14(6), e0218392. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218392>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time

- RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pfeiffer, K. J., y Crailsheim, K. (1998). Drifting of honeybees. *Insectes Sociaux*, 45(2), 151-167. <https://doi.org/10.1007/s000400050076>
- Piccini, C., D'Alessandro, B., Antúnez, K., y Zunino, P. (2002). Detection of *Paenibacillus* larvae subspecies larvae spores in naturally infected bee larvae and artificially contaminated honey by PCR. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(8), 761-765. <https://doi.org/10.1023/A:1020435703165>
- Piccini, C., y Zunino, P. (2001). American Foulbrood in Uruguay: Isolation of *Paenibacillus* larvae larvae from Larvae with Clinical Symptoms and Adult Honeybees and Susceptibility to Oxytetracycline. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78(3), 176-177. <https://doi.org/10.1006/jipa.2001.5055>
- Posit team. (2022). *RStudio: Integrated Development Environment for R* (2022.12.0.353) [Software]. Posit Software, PBC. <http://www.posit.co/>
- Potts, S. G., Imperatriz-Fonseca, V., Ngo, H. T., Aizen, M. A., Biesmeijer, J. C., Breeze, T. D., Dicks, L. V., Garibaldi, L. A., Hill, R., Settele, J., y Vanbergen, A. J. (2016). Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature*, 540(7632), 220-229. <https://doi.org/10.1038/nature20588>
- Pybus, O. G., y Rambaut, A. (2009). Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease. *Nature Reviews. Genetics*, 10(8), 540-550. <https://doi.org/10.1038/nrg2583>
- Quintana, S., Plischuk, S., Brasesco, C., Revainera, P., Genchi García, M. L., Bravi, M. E., Reynaldi, F., Eguaras, M., y Maggi, M. (2021). *Lotmaria passim* (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) in honey bees from Argentina. *Parasitology International*, 81, 102244. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102244>
- Rademacher, E., y Harz, M. (2006). Oxalic acid for the control of varroosis in honey bee colonies – a review. *Apidologie*, 37(1), 98-120. <https://doi.org/10.1051/apido:2005063>
- Ramsey, S. D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J. D., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J. M., Ellis, J. D., Hawthorne, D., y vanEngelsdorp, D. (2019). *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(5), 1792-1801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818371116>
- Ravoet, J., Maharramov, J., Meeus, I., Smet, L. D., Wenseleers, T., Smagghe, G., y Graaf, D. C. de. (2013). Comprehensive Bee Pathogen Screening in Belgium Reveals *Crithidia mellificae* as a New Contributory Factor to Winter Mortality. *PLOS ONE*, 8(8), e72443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072443>
- Requier, F., y Leonhardt, S. D. (2020). Beyond flowers: Including non-floral resources in bee conservation schemes. *Journal of Insect Conservation*, 24(1), 5-16. <https://doi.org/10.1007/s10841-019-00206-1>

- Requier, F., Leyton, M. S., Morales, C. L., Garibaldi, L. A., Giacobino, A., Porrini, M. P., Rosso-Londoño, J. M., Velarde, R. A., Aignasse, A., Aldea-Sánchez, P., Allasino, M. L., Arredondo, D., Audisio, C., Cagnolo, N. B., Basualdo, M., Branchiccela, B., Calderón, R. A., Castelli, L., Castilhos, D., ... Antúnez, K. (2023a). *First large-scale study reveals important losses of honey bee and stingless bee colonies in Latin America*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3378800/v1>
- Requier, F., Pérez-Méndez, N., Andersson, G. K. S., Blareau, E., Merle, I., y Garibaldi, L. A. (2023b). Bee and non-bee pollinator importance for local food security. *Trends in Ecology y Evolution*, 38(2), 196-205. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2022.10.006>
- Reynaldi, F. J., Sguazza, G. H., Tizzano, M. A., Fuentealba, N., Galosi, C. M., y Pecoraro, M. R. (2011). First report of Israeli acute paralysis virus in asymptomatic hives of Argentina. *Revista Argentina De Microbiología*, 43(2), 84-86. <https://doi.org/10.1590/S0325-75412011000200003>
- Rinkevich, F. D. (2020). Detection of amitraz resistance and reduced treatment efficacy in the Varroa Mite, Varroa destructor, within commercial beekeeping operations. *PLoS ONE*, 15(1), e0227264. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227264>
- Riveros, G., Arismendi, N., Zapata, N., Smagghe, G., Rodríguez, M., Gerding, M., y Vargas, M. (2018). A scientific note on first detection of Kashmir bee virus in Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) in South America. *Apidologie*, 49(2), 220-223. <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0545-z>
- Rodríguez, M., Vargas, M., Antúnez, K., Gerding, M., Ovidio Castro, F., y Zapata, N. (2014). Prevalence and phylogenetic analysis of honey bee viruses in the Biobío Region of Chile and their association with other honey bee pathogens. *Chilean journal of agricultural research*, 74(2), 170-177. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392014000200007>
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., y Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of Varroa destructor. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S96-S119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>
- Ruffinengo, S. R., Maggi, M., Marcangeli, J. A., Eguaras, M. J., Principal, J., Barrios, C., De Piano, F., y Giullia, M. (2014). Integrated Pest Management to control Varroa destructor and its implications to Apis mellifera colonies. *Zootecnia Tropical*, 32(2), 149-168.
- Runckel, C., Flenniken, M. L., Engel, J. C., Ruby, J. G., Ganem, D., Andino, R., y DeRisi, J. L. (2011). Temporal Analysis of the Honey Bee Microbiome Reveals Four Novel Viruses and Seasonal Prevalence of Known Viruses, Nosema, and Crithidia. *PLoS ONE*, 6(6), e20656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020656>
- Ryabov, E. V., Wood, G. R., Fannon, J. M., Moore, J. D., Bull, J. C., Chandler, D., Mead, A.,

- Burroughs, N., y Evans, D. J. (2014). A virulent strain of deformed wing virus (DWV) of honeybees (*Apis mellifera*) prevails after *Varroa destructor*-mediated, or in vitro, transmission. *PLoS Pathogens*, 10(6), e1004230. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004230>
- Salvarrey, S., Antúnez, K., Arredondo, D., Plischuk, S., Revainera, P., Maggi, M., y Invernizzi, C. (2021). Parasites and RNA viruses in wild and laboratory reared bumble bees *Bombus pauloensis* (Hymenoptera: Apidae) from Uruguay. *PLOS ONE*, 16(4), e0249842. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249842>
- Santillan-Galicia, M. T., Ball, B. V., Clark, S. J., y Alderson, P. G. (2010). Transmission of deformed wing virus and slow paralysis virus to adult bees (*Apis mellifera* L.) by *Varroa destructor*. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 49, 141-148. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.2.01>
- Santos, E., Daners, G., Morelli, E., y Galván, G. A. (2020). Diversity of Bee Assemblage (Family Apidae) in Natural and Agriculturally Intensified Ecosystems in Uruguay. *Environmental Entomology*, 49(5), 1232-1241. <https://doi.org/10.1093/ee/nvaa078>
- Schatton-Gadelmayer, K., y Engels, W. (1988). Hemolymph Proteins and Body Weight in Newly Emerged Worker Honey Bees According to Different Rates of Parasitation by Brood Mites (Hymenoptera: Apidae: *Apis mellifera* / Acarina: Varroidae: *Varroa jacobsoni*). *Entomologia Generalis*, 14(2), 93-101. <https://doi.org/10.1127/entom.gen/14/1988/093>
- Schober, P., Boer, C., y Schwarte, L. A. (2018). Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. *Anesthesia and Analgesia*, 126(5), 1763-1768. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002864>
- Schwarz, R. S., Bauchan, G. R., Murphy, C. A., Ravoet, J., De Graaf, D. C., y Evans, J. D. (2015). Characterization of Two Species of Trypanosomatidae from the Honey Bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(5), 567-583. <https://doi.org/10.1111/jeu.12209>
- Schwarz, R. S., y Evans, J. D. (2013). Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. *Developmental and Comparative Immunology*, 40(3-4), 300-310. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.03.010>
- Smith, M. L. (2012). The Honey Bee Parasite *Nosema ceranae*: Transmissible via Food Exchange? *PLOS ONE*, 7(8), e43319. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043319>
- Stavert, J. R., Liñán-Cembrano, G., Beggs, J. R., Howlett, B. G., Pattemore, D. E., y Bartomeus, I. (2016). Hairiness: The missing link between pollinators and pollination. *PeerJ*, 4, e2779. <https://doi.org/10.7717/peerj.2779>

- Teixeira, E., Chen, Y.-P., Message, D., Boncristiani, H., Pettis, J., y Evans, J. (2012). Israeli acute paralysis virus in Africanized honey bees in southeastern Brazilian Apiaries. *Journal of Apicultural Research*, 51, 282-284. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.3.11>
- Teixeira, E., Chen, Y.-P., Message, D., Pettis, J., y Evans, J. D. (2008). Virus infections in Brazilian honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 99(1), 117-119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.03.014>
- Texier, C., Vidau, C., Viguès, B., El Alaoui, H., y Delbac, F. (2010). Microsporidia: A model for minimal parasite–host interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 13(4), 443-449. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.05.005>
- Tihelka, E. (2018). Effects of synthetic and organic acaricides on honey bee health: A review. *Slovenian Veterinary Research*, 55(3). <https://doi.org/10.26873/SVR-422-2017>
- Traynor, K. S., Mondet, F., de Miranda, J. R., Techer, M., Kowallik, V., Oddie, M. A. Y., Chantawannakul, P., y McAfee, A. (2020). Varroa destructor: A Complex Parasite, Crippling Honey Bees Worldwide. *Trends in Parasitology*, 36(7), 592-606. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.004>
- Traynor, K. S., Rennich, K., Forsgren, E., Rose, R., Pettis, J., Kunkel, G., Madella, S., Evans, J., Lopez, D., y Vanengelsdorp, D. (2016). Multiyear survey targeting disease incidence in US honey bees. *Apidologie*, 47(3), 325-347. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0431-0>
- Van der Zee, R., Gray, A., Pisa, L., y de Rijk, T. (2015). An Observational Study of Honey Bee Colony Winter Losses and Their Association with Varroa destructor, Neonicotinoids and Other Risk Factors. *PloS One*, 10(7), e0131611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131611>
- Van der Zee, R., Pisa, L., Andonov, S., Brodschneider, R., Charrière, J.-D., Chlebo, R., Coffey, M. F., Crailsheim, K., Dahle, B., Gajda, A., Gray, A., Drazic, M. M., Higes, M., Kauko, L., Kence, A., Kence, M., Kezic, N., Kiprijanovska, H., Kralj, J., ... Wilkins, S. (2012). Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008–9 and 2009–10. *Journal of Apicultural Research*, 51(1), 100-114. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.1.12>
- vanEngelsdorp, D., Hayes, J., Underwood, R. M., y Pettis, J. (2008). A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. *PloS One*, 3(12), e4071. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004071>
- van Engelsdorp, D., Lengerich, E., Spleen, A., Dainat, B., Cresswell, J., Baylis, K., Nguyen, B. K., Soroker, V., Underwood, R., Human, H., Le Conte, Y., y Saegerman, C. (2013). Standard epidemiological methods to understand and improve *Apis mellifera* health. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-16. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.08>
- van Engelsdorp, D., Underwood, R. M., y Cox-Foster, D. L. (2008). Short-term fumigation of

- honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies with formic and acetic acids for the control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Journal of Economic Entomology*, 101(2), 256-264. [https://doi.org/10.1603/0022-0493\(2008\)101\[256:sfohbbh\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-0493(2008)101[256:sfohbbh]2.0.co;2)
- Vargas, M., Arismendi, N., Riveros, G., Zapata, N., Bruna, A., Vidal, M., Rodríguez, M., & Gerding, M. (2017). Viral and intestinal diseases detected in *Apis mellifera* in Central and Southern Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 77(3), 243-249. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392017000300243>
- Vejnovic, B., Stevanovic, J., Schwarz, R. S., Aleksic, N., Mirilovic, M., Jovanovic, N. M., y Stanimirovic, Z. (2018). Quantitative PCR assessment of *Lotmaria passim* in *Apis mellifera* colonies co-infected naturally with *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 151, 76-81. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.11.003>
- Wadley, L., Trower, G., Backwell, L., y d'Errico, F. (2015). Traditional Glue, Adhesive and Poison Used for Composite Weapons by Ju'hoan San in Nyae Nyae, Namibia. Implications for the Evolution of Hunting Equipment in Prehistory. *PLOS ONE*, 10(10), e0140269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140269>
- Waters, T. L. (2018). *The distribution and population dynamics of the honey bee pathogens Crithidia mellificae and Lotmaria passim in New Zealand*. Victoria University of Wellington.
- Wegener, J., Ruhnke, H., Scheller, K., Mispagel, S., Knollmann, U., Kamp, G., y Bienefeld, K. (2016). Pathogenesis of varroosis at the level of the honey bee (*Apis mellifera*) colony. *Journal of Insect Physiology*, 91-92, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.06.004>
- Wilfert, L., Long, G., Leggett, H. C., Schmid-Hempel, P., Butlin, R., Martin, S. J. M., y Boots, M. (2016). Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by *Varroa* mites. *Science*, 351(6273), 594-597. <https://doi.org/10.1126/science.aac9976>
- Williams, M.-K. F., Tripodi, A. D., y Szalanski, A. L. (2019). Molecular survey for the honey bee (*Apis mellifera* L.) trypanosome parasites *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim*. *Journal of Apicultural Research*, 58(4), 553-558. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1568956>
- Yamamoto, S., Nakamura, S., Nakayama, K., Kusakisako, K., Watanabe, K., Ikadai, H., y Tanabe, T. (2023). Molecular detection of *Lotmaria passim* in honeybees in Japan. *Parasitology International*, 93, 102711. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2022.102711>
- Yang, X., y Cox-Foster, D. L. (2005). Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(21),

7470-7475. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501860102>

Ye, L., Liu, P., Shi, T., Wang, A., Zhu, Y., Li, L., y Yu, L. (2020). Transcriptomic analysis to elucidate the response of honeybees (Hymenoptera: Apidae) to amitraz treatment. *PLoS ONE*, 15(3), e0228933. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228933>

Yue, D., Nordhoff, M., Wieler, L. H., y Genersch, E. (2008). Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*, 10(6), 1612-1620. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01579.x>