

Informe final publicable de proyecto

Relevamiento de los problemas sanitarios que afectan a las colonias de abejas melíferas, como herramienta de base para la planificación de la producción apícola y el mantenimiento del potencial polinizador

Código de proyecto ANII: FMV_1_2019_1_155734

02/02/2023

ANTÚNEZ CLAUSTRE, Karina (Responsable Técnico - Científico)

PALACIOS, Sofia (Investigador)

AÑON, Guillermo (Investigador)

ARREDONDO PAPIOL, Daniela (Investigador)

BRANCHICCELA CORREA, Maria Belen (Investigador)

CAMPA, Juan Pablo (Investigador)

CASTELLI NORANDO, Loreley (Investigador)

KATZ GONZÁLEZ, Helena (Investigador)

ZUNINO ABIRAD, Pablo (Investigador)

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE"

(Institución Proponente) \\ INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA \\

MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA. DIVISIÓN DE LABORATORIOS VETERINARIOS "MIGUEL C RUBINO" \\

Resumen del proyecto

En la última década las pérdidas de colonias de *Apis mellifera* han sido alarmantes en todo el mundo. En Uruguay estas pérdidas alcanzan el 20-30% anual, siendo la presencia de plagas y patógenos una de las principales causas. Nuestro objetivo fue relevar la presencia, prevalencia y distribución de las principales plagas y patógenos que afectan a las abejas melíferas, y comparar los resultados con los obtenidos en un monitoreo similar realizado en 2011. En otoño-invierno muestreamos 100 colonias de *A. mellifera* de todo el país, según la densidad de colmenas por departamento. Analizamos la presencia del ácaro *Varroa destructor* y virus ARN en abejas nodrizas, del microsporidio *Nosema* spp. y el tripanosomátido *Lotmaria passim* en abejas pecoreadoras y la bacteria *Paenibacillus larvae* en miel, siguiendo los métodos estándar (recuento directo y microscópico, cultivo microbiológico, PCR, RT-qPCR). *V. destructor* fue la plaga más prevalente y distribuida en todo el país. También encontramos una alta prevalencia de *N. ceranae* y *L. passim*, aumentando de 15 y 13% a 63 y 60%, respectivamente. La prevalencia de esporas de *P. larvae* en miel también aumentó de 2 a 10%. En cuanto a los virus ARN, la prevalencia del SBV aumentó de 19,4 al 26,5%, el DWV se mantuvo estable (30%), y el BQCV y ABPV disminuyeron (a 22,4 y 6,1% respectivamente), mientras que la prevalencia de CPBV fue de 24,5%. El movimiento de colmenas, actividad que ha aumentado en los últimos años, podría estar jugando un papel importante en la dispersión de estos patógenos. Coincidiendo con 2011, no se detectó la presencia de *N. apis*, IAPV ni KBV. Estos resultados demuestran la importancia de los monitoreos para conocer la distribución y prevalencia de patógenos, evaluar el éxito de las estrategias recomendadas y estar alerta ante el ingreso de nuevas amenazas.

Ciencias Agrícolas / Ciencias Veterinarias / No Corresponde / Sanidad apícola

Palabras clave: abejas melíferas / patógenos / producción de miel /

Introducción

Las abejas melíferas desempeñan una tarea esencial en el mantenimiento de los ecosistemas naturales y en la producción agrícola, a través de la polinización de plantas silvestres y cultivos comerciales (1,2). Esto contribuye directamente a la obtención de alimentos (1,2). Por otro lado, las abejas melíferas producen diversos productos, como miel, polen, jalea real y propóleos, que el hombre utiliza para su provecho con fines industriales, medicinales y alimenticios.

En Uruguay, en las últimas décadas la actividad apícola ha adquirido gran relevancia en el sector agro-exportador, contando hoy con 3000 productores y 550.000 colmenas (3). Se producen cerca de 12.000 toneladas de miel al año, de las cuales el 95% se exporta (3). Sin embargo, actualmente el sector apícola se encuentra atravesando una severa crisis (4). Por un lado, se ha constatado la pérdida anual de entre el 20-30% de las colmenas (5,6). Este fenómeno no es exclusivo de nuestro país, sino que se está reportando alrededor del mundo (7-10). Entre las principales causas se encuentran la presencia de plagas y patógenos, la intoxicación con pesticidas y el estrés nutricional, asociado al aumento en la superficie dedicada a monocultivos (9,10). Estos episodios de pérdidas de colmenas conllevan graves pérdidas a los apicultores, quienes deben invertir trabajo y recursos económicos para poder mantener el número de colmenas y la producción de miel, estable. Por otro lado, la presencia de pesticidas y en menor medida de ciertos patógenos (como *Paenibacillus larvae*) en la miel, han restringido significativamente el comercio internacional.

El ácaro *Varroa destructor* es la mayor amenaza biótica para la supervivencia de las abejas melíferas (11). Este ácaro parásito debilita la abeja, deprime su sistema inmune y favorece la infección por otros patógenos (12). Es letal si no es tratado adecuadamente (9,10). Además del daño directo que causa, es capaz de transmitir virus ARN (10). Se han descrito más de 25 virus que afectan a las abejas melíferas, de los cuales 7 revisten mayor importancia por su patogenicidad (13). Tanto *V. destructor* como diferentes virus ARN están presentes en nuestro país, incluyendo el virus de la parálisis aguda (ABPV), de la parálisis crónica (CBPV), de las alas deformes (DWV), de las celdas reales negras (BQCV) y de la cría ensacada (SBV)(14-16). El virus que ha adquirido mayor notoriedad es el DWV, por su impacto negativo en la salud de la colmena (17). Los síntomas típicos son alas deformes o vestigiales, abdomen hinchado, parálisis y disminución de la vida media (17). Existen diferentes variantes genéticas (A,B,C) con virulencia diferencial (18).

Nosema apis y *Nosema ceranae* son microsporidios parásitos intracelulares obligatorios (19), agentes causales de la Nosemosis. Se reproducen en las células epiteliales del ventrículo, afectando las funciones digestivas, generando desnutrición, envejecimiento fisiológico y reducción de la vida media de las abejas (19). En nuestro país el agente etiológico de la Nosemosis es principalmente *N. ceranae*, que se encuentra presente al menos desde 1990 (16,20).

En cuanto a los tripanosomátidos, dos especies se han descrito como parásitos de abejas, *Crithidia mellificae* y *Lotmaria*

passim (21). Ambos parasitan el lumen intestinal de los insectos. Su presencia ha sido asociada a otros patógenos como *N. ceranae* (22) o *V. destructor* (23), y la coinfección podría generar un efecto sinérgico afectando la salud de la colmena (24). Nuestro grupo ha reportado la presencia de *L. passim* en la región, aunque *C. mellificae* no ha sido detectado (23).

Por último, *Paenibacillus larvae* es el agente causal de la Loque Americana (25), una severa enfermedad que afecta a las larvas de las abejas melíferas. La primera detección en Uruguay fue en 2000 (26), y posteriormente se expandió en el territorio nacional, con una prevalencia cercana al 50% en miel (27). Gracias a las medidas recomendadas por el MGAP que incluían la quema de colmenas con síntomas y uso del extracto etanólico de propóleos como agente preventivo (28), la prevalencia en miel disminuyó al 2% en 2010 (29). Finalmente, una preocupación emergente en Uruguay es el escarabajo *Aethina tumida* (30), una plaga originaria del África subsahariana. Aunque este escarabajo no causa severos daños en esa zona, ha invadido nuevas áreas, como Estados Unidos y Australia, reproduciéndose en las colonias de abejas melíferas y causando graves pérdidas. *Aethina tumida* ingresó a América Latina por México en 2007, y pronto se expandió a Cuba, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica. En 2015, 2016 y 2019 se detectaron brotes en Brasil (31). Si bien en Uruguay aún no se ha reportado, su ingreso es una preocupación para los apicultores.

Teniendo en cuenta los daños y pérdidas ocasionadas por estas plagas y patógenos al sector apícola, las escasas o nulas opciones disponibles para el tratamiento o prevención de estas infecciones, el riesgo de ingreso de nuevas plagas, y el transcurso de 10 años desde el último relevamiento a nivel nacional, también realizado por nuestro grupo de investigación (16), consideramos oportuno actualizar la información sobre esta problemática.

El objetivo general fue realizar un relevamiento a nivel nacional de las principales plagas y patógenos que afectan a las abejas melíferas en Uruguay, así como de las amenazas emergentes.

Para alcanzar este objetivo se seleccionaron colmenas de abejas melíferas de todo el país, de forma representativa en base a la densidad de colmenas por departamento, se colectaron muestras y se analizó la presencia, prevalencia y distribución de las principales plagas y patógenos, incluyendo: *V. destructor*, ABPV, BQCV, CBPV, DWV, SBV, virus Kashmir (KBV) y de la parálisis aguda israelí (IAPV), *N. apis*, *N. ceranae*, *L. passim*, *C. mellificae*, *P. larvae* y *A. tumida*.

Esto permitió la generación de conocimiento necesario para actualizar los datos disponibles referentes a la distribución y prevalencia de estos patógenos, evaluar si las estrategias recomendadas en años anteriores han tenido efecto a largo plazo, identificar las zonas más afectadas por cada uno de los patógenos y analizar las posibles consecuencias de la infección las colmenas. El conocimiento de base sobre las patologías presentes y su evolución en el período 2011-2021 reviste especial importancia para diseñar estrategias de control a nivel particular y oficial, que contemplen las particularidades de cada zona. Esto permitirá minimizar la aplicación incorrecta o abusiva de productos zooterápicos que pueden implicar la generación de resistencia o generar residuos químicos prohibidos a nivel comercial y perjudiciales para la salud. A largo plazo, esperamos contribuir a la mejora de las condiciones sanitarias de las colmenas de abejas melíferas en Uruguay y mejorar la calidad de los productos de la colmena, promoviendo de esta forma el desarrollo del sector apícola nacional.

Metodología/diseño del estudio

1. Selección de apiarios:

Se seleccionaron 100 apiarios distribuidos en los 19 departamentos del país. El número de apiarios/ departamento se determinó en base a la densidad de colmenas por departamento, disponible en la base de datos del Registro Nacional de Propietarios de Colmenas (DIGEGRA) (Tabla 1).

2. Muestreos:

Estaba previsto realizar un único muestreo en cada colmena en el mes de marzo, y previo al tratamiento acaricida. Debido a la pandemia de COVID-19 y los inconvenientes que generó para acceder a los apiarios, los muestreos se realizaron entre los meses de marzo a julio de 2021 y en muchos casos los productores ya habían aplicado acaricidas. En cada apiario se seleccionó al azar una colmena, y se colectaron muestras de:

- 150 abejas nodrizas para la detección y cuantificación de *V. destructor* y virus ARN
- 100 abejas pecoreadoras para la detección y cuantificación de *N. apis*, *N. ceranae* y *L. passim*
- miel del nido de cría para la detección de *P. larvae*
- restos del fondo de la colmena, para la detección de *A. tumida*.

Las abejas nodrizas y pecoreadoras se colocaron por separado en alcohol para evitar su descomposición. Cincuenta

abejas nodrizas se colocaron en bolsas de papel y se enviaron vivas inmediatamente al laboratorio, donde se almacenaron a -80°C , para evitar la degradación del ARN viral. Además, en las colonias seleccionadas se estimó la fortaleza de la colmena (abejas adultas, de cría, de reservas, y la sintomatología) de acuerdo a lo recomendado por el Beebook (32).

3. Análisis de laboratorio:

Se realizaron los siguientes análisis en las muestras colectadas:

-Detección y cuantificación de *V. destructor*: Se tomaron al menos 100 abejas nodrizas en alcohol, se agitaron vigorosamente con agua y jabón, se contaron los ácaros que se desprendieron y las abejas y se determinó el porcentaje de infestación (33).

-Detección y cuantificación de virus en abejas nodrizas: Se tomaron 20 abejas, se realizó la extracción de ARN, degradación del ADN genómico y retrotranscripción utilizando kits comerciales (Applied Biosystems). La presencia y nivel de infección de los virus se evaluó mediante qPCR empleando el kit Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y primers específicos para cada virus: ABPV y SBV (34), BQCV y DWV (35), IAPV (36), KBV (37), CBPV (38). Se realizó la cuantificación relativa del nivel de infección viral empleando la *b-actina* y *rps5* como genes de referencia (12, 60). Posteriormente se determinó la variante circulante del virus DWV empleando el sistema ABC (18).

-Detección y cuantificación de *N. apis*, *N. ceranae*, *L. passim* y *C. mellificae* en abejas pecoreadoras: Se tomaron 60 abejas pecoreadoras, se homogeneizaron en PBS y se realizó el conteo de esporas de *Nosema* spp. en "pool" empleando una cámara de Neubauer (39). Esto nos permitió determinar el nivel de infección en las colmenas. Posteriormente se extrajo el ADN de dichas muestras empleando 20 abejas y un kit de extracción de ADN comercial (QIAamp® DNA Mini and Blood Mini, Qiagen), y se determinó la especie de *Nosema* mediante PCR multiplex, empleando primers específicos para *N. apis* y *N. ceranae* (40). Este mismo ADN se utilizó para la detección de *L. passim* y *C. mellificae* utilizando también primers específicos para cada patógeno (21, 41,42).

-Detección y cuantificación de *P. larvae* en miel: Se tomaron 20 g de miel por muestra, se diluyeron en agua destilada y los tubos se centrifugaron a 6000g durante 40 minutos para concentrar las esporas. Se descartó el sobrenadante y los pellets se resuspendieron en 2 ml de PBS estéril. Posteriormente se incubaron a 80°C durante 15 min para estimular la germinación y se sembró en medio J (27). Las colonias sospechosas se analizaron mediante pruebas bioquímicas y se confirmó su identidad mediante PCR utilizando primers específicos para *P. larvae* (25,43).

- Puesta a punto de un método para la detección de *A. tumida*: Se emplearon diferentes primers para su identificación (44,45). Para poner a punto el método se emplearon individuos adultos y larvas de *A. tumida* conservados en alcohol (controles positivos, obtenidos mediante la colaboración con el proyecto REDLAC-FONTAGRO). Se realizó la extracción de ADN y PCR o qPCR de acuerdo a las metodologías publicadas (44,45). Los productos de amplificación obtenidos se enviaron a secuenciar. La metodología está disponible para cuando aparezcan ejemplares sospechosos.

- Detección de *A. tumida*. Las colmenas se inspeccionaron detenidamente para determinar la presencia de escarabajos.

- Pérdida de colmenas: Se divulgó el cuestionario para estimación de las pérdidas anuales de colmenas de SOLATINA, disponible en <http://solatina.org/temas-de-estudio/monitoreo/> (5,46) en los apiarios que forman parte del proyecto.

Resultados, análisis y discusión

Se colectaron muestras de 100 colonias de los 19 departamentos de nuestro país, seleccionadas en base a la densidad de colmenas por departamento (Tabla 1). Todas las colmenas empleadas en el monitoreo fueron colmenas de producción, aparentemente sanas, sin síntomas clínicos asociados a ninguna enfermedad (Tabla 2).

La mayoría de las plagas y patógenos estudiados fueron detectados, excepto el microsporidio *N. apis*, los virus IAPV y KBV y el escarabajo *A. tumida*, los cuales siguen sin ser reportados en Uruguay. Esto indica su ausencia o su presencia en muy baja prevalencia.

El 96% de las colmenas presentaron alguno de los patógenos estudiados, llegando incluso a colmenas co-infectadas con 7 patógenos (3% de las muestras, Figura 1). Sólo en el 4% de las colonias no se detectó ningún patógeno. Dado que estas eran colmenas de producción que no presentaban síntomas clínicos de enfermedad, los resultados sugieren que en ciertos casos los patógenos podrían co-existir en la colmena sin causar mayores daños. Sin embargo se debe estar alerta porque factores externos como el estrés nutricional, intoxicación con pesticidas, condiciones ambientales, etc, podrían alterar ese equilibrio promoviendo la multiplicación de estos patógenos generando daño en las colmenas.

Varroa destructor es la plaga más distribuida en el país (Figura 2, Tabla 3). El ácaro mantuvo una alta prevalencia entre

2011 y 2021, manteniéndose como uno de los principales problemas sanitarios (tabla 3). El control de *V. destructor* se basa en el uso de acaricidas sintéticos u orgánicos. En 2011, la alternativa más elegida por los apicultores era el uso de acaricidas sintéticos (amitraz, flumetrina, fluvalinato), realizado en el 69,9% de las colmenas analizadas en ese año; mientras que solo el 7,8% de las colmenas recibieron tratamiento con acaricidas orgánicos. Esta estrategia ha cambiado notoriamente en estos 10 años, aumentando el uso de acaricidas orgánicos (principalmente ácido oxálico) de 7,8% a 78% en 2021. En contraste, el uso de acaricidas sintéticos disminuyó a 5% en 2021 (Figura 3).

Este cambio disminuye el uso de sustancias químicas sintéticas en las colmenas y mejora la calidad de la miel.

El microsporidio *N. ceranae* aumentó notablemente su prevalencia (Tabla 3) y presentó una distribución muy amplia (Figura 4C). Por otra parte, *Nosema apis* no fue detectada en las muestras analizadas (Figura 4 Ay B). El aumento en la prevalencia de *N. ceranae* puede estar vinculado al traslado de las colonias a forestaciones de *Eucalyptis grandis* en febrero-marzo, para aprovechar la floración. Si bien en este ambiente aumenta la producción de miel, el nivel de infección por este microsporidio aumenta sensiblemente y las colmenas se debilitan.

Otro patógeno que aumentó su prevalencia con respecto a 2011 fue *Paenibacillus larvae*, pasando del 2% a 10% en 2021 (Tabla 3). Su distribución continúa concentrada principalmente en el litoral oeste, zona de mayor desarrollo apícola y mayor concentración de colmenas (Figura 5). Esto es preocupante, ya que la única alternativa de tratamiento es la quema y destrucción de las colmenas infectadas. Se realizarán instancias de divulgación con apicultores para estimular el diagnóstico temprano.

También se encontró un aumento en la prevalencia de *Lotmaria passim*, pasando del 13% en 2011 al 60% en 2021 (Figura 6). Su rango de distribución también se amplió, de 5 a 16 departamentos.

En el caso de los virus, 5 de los virus analizados fueron detectados: ABPV, BQCV, CBPV, DWV y SBV (Figura 7). La zona de mayor incidencia sigue siendo el litoral oeste, como lo era en 2011, sin embargo se observa la ampliación de su distribución hacia el resto del país. Dado que no hay ninguna estrategia de manejo disponible, se recomienda controlar el ácaro *V. destructor*, un importante medio de transmisión de virus.

Finalmente en cuanto al escarabajo *A. tumida*, la inspección rigurosa por parte del técnico del MGAP, sobretudo en las colmenas localizadas en zonas limítrofes con Brasil, no arrojó individuos sospechosos. Sin embargo la reciente detección (noviembre 2022) en apiarios del sur de Brasil, enciende la alerta ante una próxima llegada al país. La metodología de diagnóstico molecular está puesta a punto y disponible para su uso en cuanto se realicen los primeros registros.

Conclusiones y recomendaciones

- Este estudio constituye el segundo monitoreo a nivel nacional de las principales plagas y patógenos que afectan a las abejas melíferas en Uruguay, siendo el primero en 2011, realizado también por nuestro grupo de investigación. Esto permitió actualizar la prevalencia y distribución de estos patógenos. A la vez, constituye una gran oportunidad para mantener un registro histórico y de mantenerse alerta frente al ingreso de nuevas amenazas.
- Los principales patógenos que afectan a las abejas están presentes y ampliamente distribuidos en nuestro país. La amplia mayoría de las muestras (96%) presentó al menos uno de los patógenos estudiados. La ausencia de síntomas clínicos de enfermedad sugiere que en ciertos casos los patógenos podrían co-existir en la colmena sin causar mayores daños. Sin embargo se debe estar alerta porque factores externos como el estrés nutricional, intoxicación con pesticidas, condiciones ambientales, etc, podrían alterar ese equilibrio promoviendo la multiplicación de estos patógenos generando daño en las colmenas.
- *Varroa destructor* es la plaga más distribuida en el país. Se observa un gran esfuerzo por parte de los apicultores de realizar tratamientos con acaricidas orgánicos, lo que disminuye el uso de sustancias químicas sintéticas en las colmenas y mejora la calidad de la miel.
- *Nosema ceranae* aumentó notablemente su prevalencia y distribución en la última década. Esto puede estar vinculado al traslado de las colonias a forestaciones de *Eucalyptis grandis* en febrero-marzo, para aprovechar la floración. Si bien en este ambiente aumenta la producción de miel, en estas condiciones el microsporidio se multiplica y las colmenas se debilitan notoriamente.
- El aumento en la prevalencia de *P. larvae* es preocupante, ya que la única alternativa de tratamiento es la quema y destrucción de las colmenas infectadas. Se realizarán instancias de divulgación con apicultores para estimular el diagnóstico temprano.

- Los virus ABPV, BQCV, CBPV, DWV y SBV están presentes y distribuidos en el país, algunos habiendo aumentado su rango de distribución en los últimos 10 años. No hay disponible ninguna estrategia de manejo, excepto la de controlar el ácaro V. destructor, principal medio de transmisión de virus.
- En cuanto al escarabajo A. tumida durante este estudio no se encontró. Sin embargo la reciente detección (noviembre 2022) en apiarios del sur de Brasil, enciende la alerta ante una próxima llegada al país.
- Finalmente el hongo N. apis y los virus IAPV y KBV tampoco fueron detectados, indicando su ausencia en Uruguay o su presencia en muy baja prevalencia.

Referencias bibliográficas

- 1.Potts et al.,2016. Safeguarding pollinators and their values to human wellbeing.Nature,540(7632):220.
- 2.Klein et al.,2006. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops.Proc.R.Soc.Lond. [Biol],274(1608):303‐313.
- 3.Mgap‐digegra-http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/apicultura_-_datos_2018.pdf
- 4.<https://ladiaria.com.uy/articulo/2019/4/sociedad-de-apicultores-se-reune-con-precandidatos-y-entrega-carta-denunciando-situacion-critica-del-sector/>
- 5.Antúnez et al.,2017. Honeybee colony losses in Uruguay 2013‐2014.Apidologie,48:364–370
- 6.Requier et al.,2018. Trends in beekeeping and honeybee colony losses in Latinamerica.J.Apic.Res.,57:657‐662.
- 7.Kulhanek et al.,2017. A national survey of managed honeybee 2015–2016 annual colony losses in USA.J.Apic.Res.,56(4):328-340.
- 8.Brodschneider et al.,2018. Multi-country loss rates of honeybee colonies during winter 2016/2017 from the COLOSS survey.J.Apic.Res.,57(3):452-457.
- 9.Goulson et al.,2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers.Science,347(6229):1255957.
- 10.Steinbauer et al.,2018. Drivers of colony losses.Curr.Opin.Insect.Sci.,26:142‐148.
- 11.Rosenkranz et al.,2010. Biology and control of Varroa destructor.J.Invertebr.Pathol.,103:S96‐S119.
- 12.Yang & Cox-Foster,2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification.PNAS,102(21):7470-7475.
- 13.McMenamin & Genersch,2015. Honeybee colony losses and associated viruses.Curr.Opin.Insect.Sci.,8:121‐129.
- 14.Antúnez et al.,2005. Detection of chronic bee paralysis virus and acute bee paralysis virus in Uruguayan honeybees.J.Invertebr.Pathol.,90(1):69-72.
- 15.Antúnez et al.,2006. Honeybee viruses in Uruguay.J.Invertebr.Pathol.,93(1):67-70.
- 16.Anido et al.,2015. Prevalence and distribution of honeybee pests and pathogens in Uruguay.J.Apic.Res.,54(5):532-540.
- 17.DeMiranda & Genersch,2010. Deformed wing virus.J.Invertebr.Pathol.,103:48-61.
- 18.Kevill et al.,2019. DWV-A Lethal to honeybees: A Colony Level Survey of DWV Variants (A, B, and C) in England, Wales, and 32 States across the US.Viruses,11(5):426.
- 19.Higes et al.,2013. Nosema ceranae (Microsporidia), a controversial 21st century honeybee pathogen. Environ.Microbiol.Rep.,5(1):17‐29.
- 20.Invernizzi et al., 2009. Presence of Nosema ceranae in honeybees in Uruguay.J.Invertebr.Pathol.,101(2):150-153.
- 21.Schwarz et al.,2015. Characterization of Two Species of Trypanosomatidae from the Honeybee Apis mellifera: Crithidia mellificae Langridge and McGhee, and Lotmaria passim n.gen., n.sp.J.Eukaryot.Microbiol.,62(5):567-583.
- 22.Runckel et al.,2011. Temporal analysis of the honeybee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, Nosema, and Crithidia.PloSone,6(6):e20656.
- 23.Castelli et al.,2019. Detection of Lotmaria passim in Africanized and European honeybees from Uruguay, Argentina and Chile.J.Invertebr.Pathol.,160:95-97.
- 24.Ravoet et al.,2013. Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals Crithidia mellificae as a new contributory factor to winter mortality.PLoSone,8(8):e72443.
- 25.Genersch et al.,2006. Reclassification of Paenibacillus larvae subsp. pulvificiens and Paenibacillus larvae subsp. larvae as Paenibacillus larvae without subspecies differentiation.Int.J.Syst.Evol.Microbiol.,56(3):501‐511.
- 26.Piccini & Zunino,2001. American foulbrood in Uruguay: isolation of Paenibacillus larvae larvae from larvae with clinical symptoms and adult honeybees and susceptibility to oxytetracycline.J.Invertebr.Pathol.,78(3):176
- 27.Antúnez et al.,2004. Paenibacillus larvae larvae spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey.J.Invertebr.Pathol.,2004.86:56-58.
- 28.Antúnez et al.,2008. Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood.Vet.Microbiol.,131:324-331.
- 29.Antúnez et al.,2012. American Foulbrood in Uruguay: twelve years from its first report.J.Invertebr.Pathol.,110:129- 131.
- 30.Neumann et al.,2016. Quo vadis Aethina tumida? Biology and control of small hive beetles.Apidologie,47(3):427‐466
- 31.Antúnez et al.,2019. Distribution and impacts of Aethina tumida Murray (Coleoptera: Nitidulidae) in Latin America.46° Apimondia (Montreal-Canadá).
- 32.Delaplane et al.,2013. Standard methods for estimating strength parameters of Apis mellifera colonies.J.Apic.Res.,52(1):1-12.

33. Dietemann et al., 2013. Standard methods for varroa research. *J. Apic. Res.*, 52(1):1-54.
34. Johnson et al., 2009. Changes in transcript abundance relating to colony collapse disorder in honeybees (*Apis mellifera*). *PNAS-USA*, 106(35):14790-14795.
35. Kukielka et al., 2008. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. *J. Virol. Methods*, 147(2):275-281
36. Reynaldi 2011. First report of Israeli acute paralysis virus in asymptomatic hives of Argentina. *Rev. Arg. Microbiol.*, 43(2):84-86.
37. Riveros et al., 2018. A scientific note on first detection of Kashmir bee virus in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in South America. *Apidologie*, 49(2):220-223.
38. Corona, comunicación personal
39. Fries et al., 2013. Standard methods for Nosema research. *J. Apic. Res.* 52(52.51):14.
40. Martín-Hernández et al., 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(20):6331-6338.
41. Arismendi et al., 2016. PCR-specific detection of recently described *Lotmaria passim* (Trypanosomatidae) in Chilean apiaries. *J. Invertebr. Pathol.*, 134:1-5
42. Da Silva et al., 2004. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*, 129(5):549-561.
43. Piccini et al., 2002. Detection of *Paenibacillus* larvae subspecies larvae spores in naturally infected larvae and artificially contaminated honey by PCR. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, 18:761-765.
44. Ward et al., 2007. A DNA method for screening hive debris for the presence of small hive beetle (*Aethina tumida*). *Apidologie*, 38(3):272-280.
44. Silacci et al., 2018. An improved DNA method to unambiguously detect small hive beetle *Aethina tumida*, an invasive pest of honeybee colonies. *Pest. Manag. Sci.*, 74(12):2667-2670.
46. Antúnez et al., 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

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)