

## Importancia del diagnóstico molecular en las enfermedades que afectan a las abejas melíferas

Marisela Leal-Hernández \*<sup>1</sup>, Karla Itzel Alcalá Escamilla<sup>2</sup>, Fernando Cerón Téllez<sup>1</sup>.

1. CENID SAI (Palo alto), <sup>2</sup> CENID FISILOGIA Y MEJORAMIENTO ANIMAL.

<sup>1</sup>. Carretera México Toluca Km 15.5 col Palo Alto Cuajimalpa CDMX. CP 05110, México.

<sup>2</sup>. Km1 Carretera a Colón, Ajuchitlán, Colón, Querétaro, CP: 76280. México

leal.marisela@inifap.gob.mx y gopherus@yahoo.com

### Resumen

El impacto de las abejas y de la apicultura radica en los beneficios que estas generan al medio ambiente y en la cadena productiva de alimentos. Como cualquier organismo, las abejas son afectadas por agentes patógenos. Algunos síntomas de las enfermedades pueden ser detectados en campo; sin embargo las evaluaciones clínicas iniciales basadas en los signos visibles a menudo resultan insuficientes, siendo necesarios análisis de laboratorio para su confirmación. Las técnicas de biología molecular se han vuelto herramientas eficientes en el diagnóstico de las enfermedades y se pueden realizar a partir de diferentes tipos de muestras ante la sospecha de patógenos. Con la amplificación de genes de interés a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa es posible la detección específica, aún en muestras de abejas asintomáticas.

**Palabras Claves:** Abejas, Enfermedades, Diagnostico

### Abstract

The impact of bees and beekeeping lies in the benefits they generate for the environment and the food production chain. Like any organism, bees are affected by pathogens. Some disease symptoms can be detected in the field; however, initial clinical evaluations based on visible signs are often insufficient, and laboratory analysis is necessary for confirmation. Molecular biology techniques have become efficient tools in disease diagnosis and can be performed on different types of samples. The amplification of genes of interest through the Polymerase Chain Reaction makes specific detection of suspected pathogens possible, even in asymptomatic bee samples.

**Key Words:** Abejas melíferas, enfermedades, diagnóstico, honey bees, diseases, diagnostic

### Introducción

Las abejas (*Apis mellifera* L.) son insectos considerados económica y ecológicamente importantes por los beneficios que proporcionan, al ser los principales polinizadores permiten conservar y mantener la biodiversidad de numerosas especies de plantas silvestres y cultivadas, además de

ayudan en el mantenimiento y la regeneración de los ecosistemas (Le Conte 2008, Nanetti 2021).

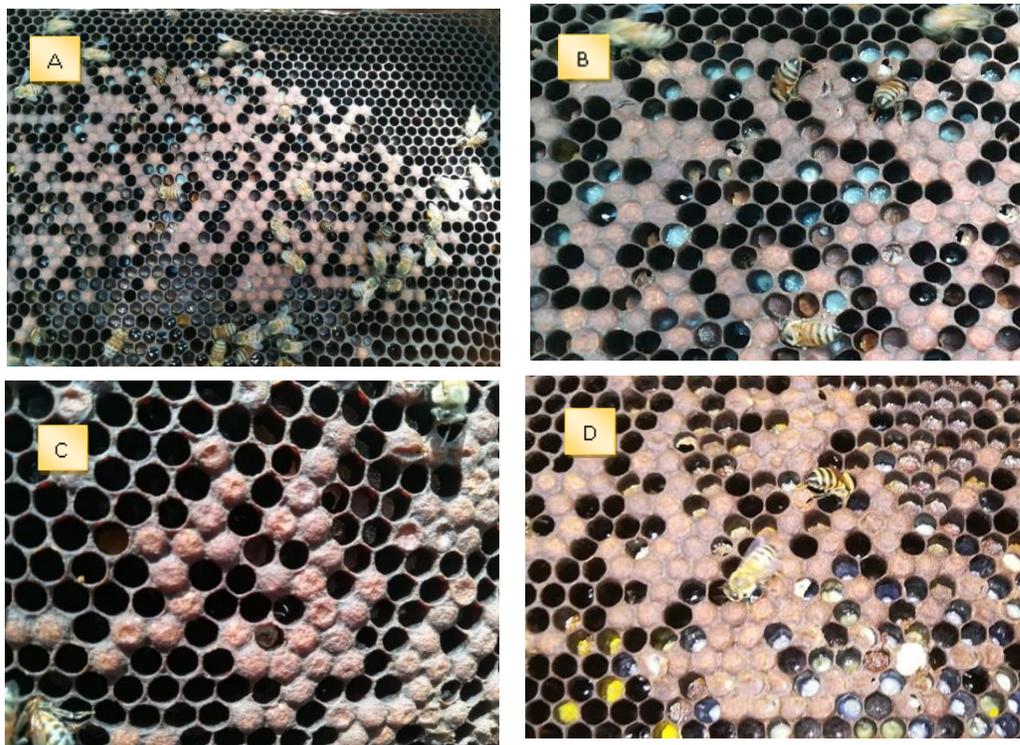
En México la actividad apícola es considerada importante por el impacto que genera principalmente la producción de miel. En el año 2022, nuestro país se ubicó en el quinto lugar como exportador y a nivel mundial ocupó el noveno lugar como

# Artículos

productor de miel con 62,079 toneladas (Panorama Agroalimentario 2022).

De forma habitual, en el apiario se debe realizar una revisión rutinaria para la detección temprana de enfermedades, siendo clave para evitar el contagio y la dispersión entre las colonias. Durante estas revisiones solo se puede realizar un diagnóstico presuntivo inicial basado en la presencia de signos, dentro de los que podemos observar, en el caso de enfermedades de la cría: Panales con un patrón salteado de postura, opérculos oscuros hundidos, perforados o con aspecto grasiento, cambios de coloración en las crías, restos de larvas o escamas café oscuro o negras y quebradizas, restos viscosos o de

consistencia elástica que carecen de forma, puede haber presencia de olores diferentes ácidos o agrios (figura 1) (Garrido 2013, Espinosa 2016, OIE 2018). En las abejas adultas se pueden identificar: abejas que presentan temblor de alas, abejas con parálisis, o con incapacidad para volar (arrastrándose) cerca de la entrada de la colmena, desprovistas de vellosidades, con coloración negruzca y abejas muertas o en el caso de infecciones ocasionadas por virus suelen ser asintomáticos y cuando llegan a observarse signos, estos son compartidos con otras enfermedades (Figura 2) (SADER 2019). Desafortunadamente, varios de los signos que se pueden identificar en campo también pueden ser un indicador de otros problemas, como una reina vieja o intoxicación de las abejas, consumo de alimento fermentado, etc.,



**Figura 1.** Principales signos en el caso de enfermedades de la cría, a) patrón de cría salteado con gran cantidad de celdas vacías, b) crías afectadas con cambios de coloración, c) opérculos oscuros hundidos, perforados, d) restos de larvas o escamas café oscuro o negras Fotos Leal Hernández Marisela.

# Artículos



**Figura 2.** Algunos signos en el caso de enfermedades de las abejas adultas: abejas desprovistas de vellosidades, abejas con coloración negruzca, abejas más pequeñas. Fotos Leal Hernández Marisela.

por lo que es necesario realizar un diagnóstico detallado.

Ante la sospecha de enfermedad, tras la identificación de los signos en la colonia, es necesario realizar su confirmación con un análisis de laboratorio rápido y específico de forma más certera hacia el patógeno de interés y así establecer un diagnóstico definitivo y posteriormente elaborar un plan de control y prevención de enfermedades, por lo que el objetivo de este artículo fue realizar una revisión de literatura sobre la importancia, metodologías y efectividad de realizar un diagnóstico a nivel molecular en algunas enfermedades que afectan a la abeja *Apis mellifera* L.

En la actualidad, las técnicas de biología molecular se han vuelto herramientas eficientes, de gran ayuda en el diagnóstico de las enfermedades para muchas especies animales productivas, incluyendo las abejas. El diagnóstico de enfermedades en una colonia se puede realizar a partir de diferentes tipos de muestras y productos apícolas como: larvas (cría), abejas (insecto adulto), miel o polen. Pruebas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que se basan en la amplificación y análisis de uno o más genes o segmentos genómicos, que permiten detectar, identificar

y cuantificar de forma certera con alta sensibilidad y especificidad la presencia de algún patógeno, incluso pudiendo detectarlos aún sin la presencia de signos clínicos de la enfermedad, también permite realizar análisis de co-infecciones, descripción de nuevas especies, determinar asociaciones entre genotipos y fenotipos y se pueden realizar estudios de estructura poblacional (Rivière 2013, OIE, 2018; Galajda *et al.*, 2021, Lannutti 2022). Desde que se empezó a emplear este tipo de herramientas se han diseñado una gran cantidad de PCR's para la detección de las diferentes enfermedades (Antúnez 2004, Rivière 2013).

Las enfermedades que afectan a las abejas que son consideradas de mayor importancia e impacto, porque pueden representar una amenaza para su salud y productividad, se dividen en 4 grupos, las producidas por bacterias: Loque europea, Loque americana; las producidas por parásitos: varroosis, acariosis; las producidas por hongos: Aspergilosis, Cría de piedra, Vairimorphosis (Nosemosis) y las producidas por virus: Virus de las alas deformes, Virus de las celdas reales negras, Virus de la parálisis aguda, Virus de la parálisis aguda Israelí, Virus de la cría ensacada y Virus de Cachemira son los más importantes por el grado de daño que pueden llegar a ocasionar. También están las

plagas que afectan a las abejas como son polilla de la cera, aethinosis y hormigas (Al Naggar 2020). Patologías como la varroosis y las plagas, se pueden identificar y diagnosticar a simple vista, por lo que el desarrollo de los diagnósticos moleculares se ha enfocado en las enfermedades más complejas de diagnosticar.

## **Principales enfermedades ocasionadas por bacterias**

La loque americana (American foulbrood AFB) producida por la bacteria *Paenibacillus larvae*; y la loque europea (European Foulbrood EFB), producida por *Melissococcus plutonius*, son enfermedades que se encuentran extendidas en todo el mundo y las cuales propician la disminución de las colonias. Ambas infectan a las larvas a través de la vía oral, por el consumo de alimento contaminado con las bacterias ofrecido por las abejas adultas quienes pueden ser portadoras asintomáticas pasivas o activas. En el caso de Loque americana, las esporas al ser consumidas se desarrollan en el intestino; la infección debe suceder dentro de las primeras horas después de la eclosión del huevo, matando a la cría en la etapa de prepupa o pupa, *P. larvae* tiene la capacidad de producir millones de esporas en cada larva infectada y con tan solo la ingesta de diez o menos esporas en el alimento es suficiente para iniciar una infección mortal (Chan 2009). Las larvas aumentan su resistencia a medida que se desarrollan y después de 53 horas de haber eclosionado las larvas no pueden ser infectadas. Las abejas adultas no son susceptibles a la Loque americana, pero las esporas pueden permanecer en su tracto digestivo por más de dos meses, favoreciendo su diseminación al momento de alimentar a la cría (Ribièrre 2007, Genersch 2010, Shimanuki 2010, OIE 2018). Respecto a Loque europea, la enfermedad se manifiesta sin importar la etapa de desarrollo de la cría. (Dainat 2018, OIE 2018).

El diagnóstico de estas enfermedades bacterianas se basa en la presencia de

signos clínicos, así como en la identificación del agente etiológico, su identificación se puede realizar a partir del aislamiento tanto de *P. larvae* y *M. plutonius* y su posterior identificación mediante la técnica de PCR o qPCR, que puede ser realizada a partir de cultivos bacterianos puros, larvas o miel (Bakonyi 2003, OIE 2018, Truong 2023). En el caso de *M. plutonius* su cultivo resulta complejo debido a los requerimientos nutricionales de la bacteria, además de que pueden crecer en el cultivo las bacterias secundarias asociadas a la Loque europea, bacterias presentes debido a que las larvas infectadas tienen una microflora variada que incluye diferentes tipos de bacterias saprófitas como el *Bacillus alvei*, *Bacillus laterosporus* y *Achromobacter eurydice*, estas bacterias no forman parte del ciclo infeccioso y se han reportado de manera normal en larvas aparentemente sanas (Sánchez- Esgua 2023).

Dainat, *et al.*, en 2018 diseñaron una qPCR triple para la detección de Loque europea y Loque americana (incluyendo ERIC tipo I a IV) y un gen específico de la abeja como control de la PCR, con la finalidad de obtener un diagnóstico precoz, utilizando herramientas de detección precisas, rápidas, baratas y fáciles de manejar. Los autores reportan que en 2008 cuando Roetschi y colaboradores implementaron el primer sistema de PCR en tiempo real aumentó drásticamente la prevalencia de Loque europea en la última década, pues pudieron detectar la enfermedad de forma precisa, demostrando la necesidad de tener herramientas adecuadas de diagnóstico para poder tener un resultado más certero y a tiempo para establecer métodos de control adecuados.

En México, a partir del año 2014 nuestro grupo de trabajo diseñó una PCR en punto final para cada uno de los diferentes patógenos, en el caso de Loque europea se logró la detección de *M. plutonius* mediante PCR en abejas adultas asintomáticas logrando amplificar un fragmento de 399 pb

en 61.9 % (179 de 293) del total de las muestras analizadas, demostrando la importancia de realizar un diagnóstico a nivel de laboratorio y el impacto que tiene la

presencia de la bacteria en las abejas adultas, a pesar de no presentar la enfermedad (Tabla 1). Si alguna cría afectada por las bacterias logra sobrevivir hasta la etapa adulta, puede transmitir las bacterias a las crías continuando el ciclo de infección.

**Tabla 1.** Prevalencias reportadas en diferentes estudios con el uso de PCR

Enfermedad	Prevalencia	Número de muestras	Referencia
Loque europea	61.9 %	179/293	Datos no publicados
(Vairimorphosis) Nosemosis	91.7 %	102/111	Elizalde 2014
Virus de las alas deformes	51.21 %	169/330	Leal 2021
Virus de la parálisis aguda israelí	7.8 %	39/501	Leal 2016
Virus de la cría ensacada	0.68 %		Leal 2016
Virus de las celdas reales negras	34.9 %	74/212	Leal 2015

### **Principales enfermedades ocasionadas por parásitos**

La acariosis, conocida también como acarapisosis, acariasis, traqueítis acariana, acarinosis o enfermedad de la isla de Wight es una enfermedad causada por el ácaro *Acarapis woodi* Rennie, endoparásito obligado del sistema respiratorio que se alimenta de la hemolinfa del hospedador y que afecta a los adultos de las tres castas de abejas. El ácaro se propaga por contacto directo, aunque solamente son susceptibles las abejas jóvenes que tienen menos de 10 días de emergidas. Los ácaros se encuentran principalmente en las tráqueas protorácicas y en ocasiones en los sacos aéreos de la cabeza, tórax y abdomen (Villa, 2007; OIE, 2018). El diagnóstico se debe de realizar en laboratorio mediante un examen microscópico de las tráqueas en abejas adultas. Para realizarlo se toma una muestra de abejas adultas en el interior de la colonia y se realiza una disección para exponer el primer par de tráqueas y posteriormente observar en el microscopio estereoscópico lesiones de queratinización y/o melanización,

estas lesiones son realizadas por el ácaro al momento de alimentarse y son consideradas típicas a la presencia del *A. woodi*; en ocasiones también se puede observar la presencia de los ácaros en el interior de las tráqueas (OIE, 2018).

La metodología de PCR ha demostrado ser una técnica rápida, eficaz y sensible en comparación con el examen microscópico. Kojima en 2011, para la detección de *Acarapis*, estableció una PCR para amplificar cuatro porciones de la subunidad I del citocromo oxidasa mitocondrial de las especies de *A. woodi*, *A. dorsalis* y *A. externus*, con base a las secuencias de ADN registradas en el Genbank, mientras que Quintana *et al.*, en 2019 con el uso de qPCR obtuvieron una sensibilidad del 100%, una especificidad del 91.67% y una precisión del 91.89%; demostrando que el uso de pruebas basadas en la tecnología molecular son una herramienta efectiva para el diagnóstico de la enfermedad.

## **Principales enfermedades ocasionadas por hongos**

La *Vairimorphosis* conocida como nosemosis, nosemiasis o enfermedad de la desaparición espontánea, es causada por los recientemente reclasificados microsporidios: *Vairimorpha apis* y *V. ceranae* (Tokarev 2020, OIE, 2018). Estos hongos poseen la capacidad de esporular, por lo que la enfermedad puede estar presente durante todo el año en la colonia. *Vairimorpha* spp. afecta a las tres castas de abejas adultas, produce una enfermedad intestinal, invasiva y contagiosa que se localizan y desarrollan en el interior de las células epiteliales del intestino medio de las abejas, ocasionando un debilitamiento progresivo, el acortamiento de la vida del hospedador y de no controlarse, la pérdida de la colonia (Formato *et al.*, 2022; Iorizzo *et al.*, 2022, Tokarev 2020). Para determinar la presencia de la enfermedad se deben de tomar muestras de abejas adultas en la entrada de la colmena y recurrir al diagnóstico de laboratorio a través del método Cantwell, en el que se utiliza una muestra de abdómenes macerados de abejas, con la finalidad de observar las esporas del patógeno bajo el microscopio, sin embargo; con este método no es posible distinguir entre los dos tipos de *Vairimorpha* y puede no detectar bajos niveles de infestación (Prendas-Rojas *et al.*, 2018). El uso de la PCR ha demostrado ser una prueba muy sensible que permite detectar el parásito aún en niveles muy bajos de infección.

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2018), describe el uso de una de PCR múltiple para identificar a *V. apis* y *V. ceranae* al mismo tiempo, amplificando fragmentos del gen 16S ARNr (=ARNr SSu) obteniendo un producto de 143 bp para *V. ceranae* y 224 bp para *V. apis*. Elizalde *et al.*, en 2014 ejecutaron la detección e identificación de *V. ceranae* y *V. apis* en colonias de abejas melíferas donde de manera previa realizaron un análisis por microscopía encontrando el 83.8% (93/111) de las muestras positivo a *Vairimorpha* spp y tras realizar la

comparación de los resultados que se obtuvieron, con la técnica de PCR en donde se identificó el 91.7% (102/111) de las muestras como positivas (Tabla 1), de las cuales 66.6% fueron a *V. ceranae*, 56.7% fue *V. apis* y el 31.5% presentaron co-infección con ambas especies de microsporidios, en este estudio demuestra que con la técnica de PCR se logró detectar un mayor número de muestras positivas al ser más sensible que la microscopía.

## **Principales enfermedades ocasionadas por virus**

Estas enfermedades se encuentran muy extendidas tanto en las abejas manejadas como en colonias silvestres, usualmente las infecciones virales en abejas no se asocian a los signos clínicos, en ciertos casos puede ocasionar una enfermedad seria o ser mortal en algunas abejas o colapsar las colonias enteras. Todo esto se ha documentado como un importante promotor en las pérdidas de colonias de abejas melíferas, algunos estudios reportan que se pueden compartir los virus de abejas melíferas con poblaciones de abejas silvestres y abejorros, particularmente cuando son transmitidas por el ácaro *Varroa destructor* el cual actúa como vector de los virus, (Berényi *et al.*, 2006, Dalmon *et al.*, 2021; Fearon and Tibbetts 2021). El ácaro se alimenta de la hemolinfa o del cuerpo graso de las abejas aumentando su capacidad para actuar como vector de varios virus, lo que da lugar a una ruta de transmisión viral, ayudando a la propagación y resurgimiento de varios virus de abejas (Chen and Siede 2007). Entre los virus que se han visto implicados en la disminución de colonias se encuentran el virus de cachemira (VC) (Johnson *et al.*, 2009), el virus de la parálisis lenta (VPL) (Neumann and Carreck 2010), el virus de la parálisis aguda israelí (VPAI) (Cox-Foster *et al.*, 2007), el virus de la parálisis aguda (VPA) (Genersch *et al.*, 2010) y el Virus de las alas deformes (VAD) (Francis, Nielsen, and Kryger 2013).

En el caso de las enfermedades virales se cuenta con el establecimiento de diferentes

PCR's para poder detectar y cuantificar virus. La mayoría de estas detectan solo una pequeña porción del genoma viral o las proteínas de la cápside. Los métodos para la detección del virus de las abejas melíferas se basan en la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) ya que todos los virus que afectan a las abejas son de tipo ARN. Varios autores han establecido RT-PCR o qRT-PCR para detectar en muestras de abejas asintomáticas los virus KBV, SBPV, IAPV, ABPV, DWV, (Tentcheva 2004, Gauthier 2007, Molineri en 2017). En 2021 Huang y colaboradores establecen una RT-PCR empleando como muestra hemolinfa para la detección viral.

En 2015 Leal, *et al.*, detectaron en dos regiones apícolas de México, el virus de las celdas reales negras (VCRN) por medio de RT-PCR en abejas obreras aparentemente sanas. El 34.9% (74/212) de las muestras de abejas obreras adultas estudiadas fueron positivas (Tabla 1) y comprobados mediante secuenciación y tras realizar el análisis se encontró un 95 % de similitud con las secuencias del VCRN reportadas en el Genbank. El VCRN afecta principalmente a las crías de las abejas reina y este estudio fue realizado en abejas obreras, quienes podrían actuar como portadoras y transmisoras del virus diseminando la enfermedad, al momento de alimentar a las crías de las reinas y de ahí la importancia de la detección del VCRN en estas abejas.

Leal, *et al.*, en 2016, desarrollaron una PCR para detectar VPAI y determinaron una prevalencia del 7.8% de un total de 501 muestras de abejas melíferas adultas asintomáticas con un porcentaje de similitud del 99% con las secuencias reportadas para el VPAI. En el mismo año, el grupo de trabajo también realizó la detección de virus de la cría ensacada en abejas melíferas en dos regiones apícolas de México, empleando la técnica de RT-PCR obteniendo una prevalencia del 0.68% para la región de la Península y del 6.2% para el Altiplano siendo relativamente baja en ambas regiones

(Tabla 1). La enfermedad de la cría ensacada rara vez adquiere carácter epizootico y por lo común presenta un curso inofensivo, así como lo observaron en este trabajo.

En 2021 Leal, *et al.*, detectaron mediante RT-PCR la presencia del virus de las alas deformes en abejas adultas asintomáticas y buscaron su relación con *Varroa destructor*, determinando primeramente los niveles infestación de varroa encontrando una prevalencia del 65.75% del total (330) de las muestras evaluadas, mientras que VAD se logró detectar por RT-PCR en el 51.21 % (169 de 330) del total de las muestras, de las cuales solo el 37.9% presento algún grado de infestación con varroa y el 13.6 % (145) fue negativo al ácaro pero positivo al virus y el 26.66% de muestras negativas al virus fueron positivas a varroa con algún grado de infestación (Tabla 1). Este tipo de estudios muestra la importancia de realizar un diagnóstico integral a nivel de laboratorio y también que no porque varroa esté presente necesariamente van a estar infectadas con el virus. Sin embargo; es necesario siempre mantener los niveles de infestación del parásito lo más bajo posible, ya que a niveles elevados aumenta la probabilidad de transmisión de enfermedades a las colonias de abejas débiles, pues es considerado el principal factor predisponente para los virus ya por su forma de alimentarse aumenta su capacidad para actuar como vector ayudando a la propagación de diferentes virus (Berényi *et al.*, 2006, Chen and Siede 2007, Dalmon *et al.*, 2021; Fearon and Tibbetts 2021).

## Conclusiones

Los resultados obtenidos en México y en otras partes del mundo permiten confirmar que el diagnóstico molecular a través de las técnicas de PCR son una potente herramienta no solo para diagnosticar enfermedades, sino también para investigar los agentes patógenos, generar información para conocer y entender mejor las diferentes enfermedades y el fenómeno de la pérdida

de colmenas (Antúnez 2004, Rivière 2013). Este tipo de análisis permite diseñar medidas de control oportunas para diferentes patologías, sin importar si se trata de virus, bacterias o parásitos.

Siempre será mejor realizar un manejo preventivo, el cual incluye mantener colonias sanas, fuertes y bien alimentadas, además de realizar de manera periódica muestreos al azar en al menos el 10% de las colonias aparentemente sanas que conforman un apiario, para conocer el estatus sanitario de la unidad de producción. Es muy importante tomar en cuenta los posibles vectores y transmisores de las diferentes enfermedades, como pueden ser las abejas adultas asintomáticas y el ácaro *V. destructor*. Otra recomendación es fomentar la vinculación entre productores e instituciones gubernamentales y de educación para apoyarlos en los manejos preventivos, diagnóstico y control de las enfermedades, esto con la finalidad de mantener sanas a las abejas y mejorar los niveles de producción.

## Referencias

Le Conte, Y., & Navajas, M. (2008). Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 27(2), 499-510.

Nanetti, A.; Bortolotti, L.; Cilia, G. (2021), Pathogens Spillover from honey bees to other Arthropods. *Pathogens*, 10, 1044. <https://doi.org/10.3390/pathogens10081044>.

Panorama Agroalimentario 2022. *Panorama\_Agroalimentario\_2022.pdf*-GoogleDrive <https://drive.google.com/file/d/1jVWS4EFKK7HGwQOBpGeIjUyaDT8X8lyz/view>

Garrido-Bailón E, Higes M, Martínez-Salvador A, Antúnez K, Botías C, Meana A, Prieto L, Martín-Hernández R. The prevalence of the honeybee brood *pathogens Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae* and

*Melissococcus plutonius* in Spanish apiaries determined with a new multiplex PCR assay. *Microb Biotechnol*. 2013 Nov;6(6):731-9. doi: 10.1111/1751-7915.12070.

Espinosa-Montaña LG. (2013). CRÍA ENSACADA En: Leal-Hernández M y Arechavaleta VME. Principales Enfermedades de las Abejas en México. Ed. INIFAP. 90-95.

OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. Chapter 3.2.1. Acarapisosis de las abejas melíferas (Infestación de las abejas melíferas por *Acarapis woodi*) In: OIE Terrestrial Manual 2018.

OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. Chapter 3.2.4. Nosemosis de las abejas melíferas. In: OIE Terrestrial Manual 2018.

OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. Chapter 3.2.2. Loque americana de las abejas melíferas (infección de las abejas melíferas por *Paenibacillus larvae*) In: OIE Terrestrial Manual 2018.

OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. Chapter 3.2.3. Loque europea de las abejas melíferas (infección de las abejas melíferas por *Melissococcus plutonius*) In: OIE Terrestrial Manual 2018.

SADER. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. Manual de Buenas prácticas pecuarias en la producción de miel. 4a Edición, 2019.

Al Naggar Y, Paxton RJ. Mode of transmission determines the virulence of Black Queen Cell virus in adult honey bees, posing a future threat to bees and apiculture. *Viruses*. 2020;12(5):535.

Sánchez-Esgua M, Veloz-Rendón JS, García Barrera LJ, Peralta CMC, Cruz-Nicolás G, Detección e Identificación mediante PCR de *Melissococcus plutonius* agente causal de la Loque europea en larvas de abeja. 29 Congreso Internacional de Actualización Apícola. 2023.

- Rivière MP, Ribière M, Chauzat MP. 2013. Recent molecular biology methods for foulbrood and noseosis diagnosis. *Rev Sci Tech.* Dec;32(3):885-92. doi: 10.20506/rst.32.2.2207.
- Galajda R, Valencakova A, Sucik M & Kandrácová P (2021) Nosema disease of european honey bees. *J. Fungi.* 7,714.
- Lannutti L, Gonzales FN, Dus Santos MJ, Florin-Christensen M, Schnittger L. Molecular Detection and Differentiation of Arthropod, Fungal, Protozoan, Bacterial and Viral Pathogens of Honeybees. *Vet Sci.* 2022 May 2; 9(5): 221. doi: 10.3390/vetsci9050221.
- Antúnez K, D'Alessandro B, Piccini C, Corbella E, Zunino P. Presencia de esporas de la bacteria causante de Loque americana en mieles de Uruguay. INIA URUGUAY. 2004: 335. Disponible en: [http://www.inia.org.ur/publicaciones/documentos/le/ad/2004/ad\\_335.pdf](http://www.inia.org.ur/publicaciones/documentos/le/ad/2004/ad_335.pdf).
- Bakonyi T, Derakhshifar I, Grabensteiner E, and Nowotny N. Development and Evaluation of PCR Assays for the Detection of *Paenibacillus* larvae in Honey Samples: Comparison with Isolation and Biochemical Characterization. *Appl Environ Microbiol.* 2003: 1504-1510.
- Truong AT, Yoo MS, Seo SK, Hwang TJ, Yoon SS, Cho YS. Prevalence of honey bee pathogens and parasites in South Korea: A five-year surveillance study from 2017 to 2021. *Heliyon.* 2023 Feb 4;9(2): e13494. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e13494.
- Dainat B, Grossar D, Ecoffey B, Haldemann C. (2018). Triplex real-time PCR method for the qualitative detection of European and American foulbrood in honeybee. *J Microbiol Methods.* Mar; 146:61-63. doi: 10.1016/j.mimet.2018.01.018.
- Formato G, Rivera-Gomis J, Bubnic J, Martín-Hernández R, Milito M, Cropp S & Higes M (2022) Nosemosis Prevention and Control. *Appl. Sci.* 12, 783.
- Elizalde SM, Leal HM, Arechavaleta VME, Tenorio GVR, Martínez PJF, Nieto LS. Detección e identificación de *Nosema ceranae* y *Nosema apis* en colonias de abejas de Yucatán y Campeche. L Reunión Nacional De Investigación Pecuaria.
- Prendas-Rojas JP, Figueroa-Mata G, Ramírez-Montero M, Calderón-Fallas RA, Ramírez-Bogantes M & Travieso-González CM (2018). Diagnóstico automático de infección por nosemosis en abejas melíferas mediante procesado de imágenes. *Tecnología en Marcha.* 31(2).
- Villa JD. (2007) Influence of worker age on the infestation of resistant and susceptible honey bees (*Apis mellifera*) with tracheal mites (*Acarapis woodi*). *Apidologie* 38: 573-578.
- Kojima Y, Yoshiyama M, Kimura K & Kadowaki T (2011) PCR-based detection of a tracheal mite of the honey bee *Acarapis woodi*. *J. Invertebr. Pathol.* 108: 135-137.
- Berényi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Köglberger H and Nowotny N. Occurrence of Six Honeybee Viruses in Diseased Austrian Apiaries. *Appl. Env. Microbiol.* 2006. 72:4:2414- 2420.
- Dalmon, Anne, Virgine Diévar, Maxime Thomasson, Romain Fouque, Bernard E. Vaissière, Laurent Guilbaud, Yves le Conte, and Mickaël Henry. 2021. 'Possible Spillover of Pathogens between Bee Communities Foraging on the Same Floral Resource'. *Insects* 12(2):122. doi: 10.3390/insects12020122.
- Iorizzo M, Letizia F, Ganassi S, Testa B, Petrarca S, Albanese G, Di Criscio D & De Cristofaro A (2022) Recent Advances in Biocontrol of Nosemosis in Honey Beer (*Apis mellifera* L.). *J. Fungi.* 8, 424.
- Fearon, Michelle L., and Elizabeth A. Tibbetts. 2021. 'Pollinator Community Species Richness Dilutes Prevalence of Multiple Viruses within Multiple Host Species. *Ecology* 102(5). doi: 10.1002/ecy.3305.

- Alippi AM, López AC and Aguilar OM. A PCR-based method that permits specific detection of *Paenibacillus* larvae subsp. larvae, the cause of American Foulbrood of honey bees, at the subspecies level. *Lett Appl Microbiol*. 2004; (39): 25–33.
- Chen YP y Siede R. Honey Bee Viruses, *Advances in Virus Research* 2007; 70: 33-80.
- Johnson, Reed M., Jay D. Evans, Gene E. Robinson, and May R. Berenbaum. 2009. 'Changes in Transcript Abundance Relating to Colony Collapse Disorder in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(35):14790–95. doi: 10.1073/pnas.0906970106.
- Neumann, Peter, and Norman L. Carreck. 2010. 'Honey Bee Colony Losses'. *Journal of Apicultural Research* 49(1):1–6. doi: 10.3896/IBRA.1.49.1.01.
- Cox-Foster, Diana L., Sean Conlan, Edward C. Holmes, Gustavo Palacios, Jay D. Evans, Nancy A. Moran, Phenix-Lan Quan, Thomas Briese, Mady Hornig, David M. Geiser, Vince Martinson, Dennis vanEngelsdorp, Abby L. Kalkstein, Andrew Drysdale, Jeffrey Hui, Junhui Zhai, Liwang Cui, Stephen K. Hutchison, Jan Fredrik Simons, Michael Egholm, Jeffery S. Pettis, and W. Ian Lipkin. 2007. 'A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder'. *Science* 318(5848):283–87. doi: 10.1126/science.1146498.
- Genersch, Elke, Werner von der Ohe, Hannes Kaatz, Annette Schroeder, Christoph Otten, Ralph Büchler, Stefan Berg, Wolfgang Ritter, Werner Mühlen, Sebastian Gisder, Marina Meixner, Gerhard Liebig, and Peter Rosenkranz. 2010. 'The German Bee Monitoring Project: A Long Term Study to Understand Periodically High Winter Losses of honey bee Colonies'. *Apidologie* 41(3):332–52. doi: 10.1051/apido/2010014.
- Francis, Roy M., Steen L. Nielsen, and Per Kryger. 2013. 'Varroa-Virus Interaction in Collapsing Honey Bee Colonies'. *PLoS ONE* 8(3): e57540. doi: 10.1371/journal.pone.0057540.
- Tentcheva D., Gauthier L., Zappulla N., Dainat B., Cousserans F., Colin M.E., Bergoin M. 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl Environ Microbiol.*; 70: 7185-7191.
- Gauthier L., Tentcheva D., Tournaire M., Dainat B., Cousserans F., Colin M.E., Bergoin M. Viral load estimation in asymptomatic honey bee colonies using the quantitative RT-PCR technique. *Apidologie*. 2007; 38: 426-436.
- Molineri AI, Pacini Adriana, Giacobino Agostina, Bulacio-Cagnolo Natalia, Aignasse Andrea, Zago Luis, Fondevila Norberto, Ferrufino Cecilia, Merke Julieta, Orellano Emanuel, Bertozzi Ezequiel, Pietronave Hernán, Signorini Marcelo. (2017) Prevalence of honey bee (*Apis mellifera*) viruses in temperate and subtropical regions from Argentina. *Rev Argent Microbiol* 49(2):166-173.
- Huang S, Li J, Zhang Y, Li Z, Evans JD, Rose R, Gilligan TM, LeBrun A, He N, Zheng T, Zhang T, Hamilton M, Chen YP. 2021. A novel method for the detection and diagnosis of virus infections in honey bees. *J Virol Methods*. 293:114163. doi: 10.1016/j.jviromet.2021.114163.
- Leal HM, Elizalde SM, Dainat B, Arechavaleta VME, Tenorio GVR, Carrillo ML. Detección del Virus de las Celdas Reales Negras en *Apis mellifera* en dos regiones apícolas de México. 22º Congreso Internacional de Actualización Apícola, Puebla del 27 al 29 de mayo de 2015.
- Leal HM, Elizalde SM, Arechavaleta VME, Dainat B. Detección del virus de la parálisis aguda israelí en abejas melíferas en México. 23º Congreso Internacional de Actualización Apícola, Mérida. 8 al 10 junio de 2016.

# Artículos

Leal HM, Elizalde SM, Arechavaleta VME, Dainat B. Detección del virus *Morator aetatulas* en abejas melíferas en dos regiones apícolas de México. Reunión Internacional de Ciencias Veterinarias FMVZ-UNAM. 1 al 3 de junio de 2016.

Leal-Hernández M, Cerón-Téllez Fernando, Vivas-Rodríguez Jorge Ariel, Moguel-Ordoñez Yolanda Beatriz, Soto-Ruíz Lilia, Arechavaleta-Velasco Miguel Enrique, Córdova-López Dionisio.

Virus de las alas deformes y su relación con varroa en colmenas de abejas melíferas. LVI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Memoria. Ciudad de México, 10-12 de nov. 2021.

Tokarev Y.S., Huang W.-F., Solter L.F., Malysh J.M., Becnel J.J., Vossbrinck C.R. (2020). A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics. *Journal of Invertebrate Pathology* 169107279. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107279>.