UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA (UNLP)

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS (FCV)

Trabajo Final Integrador realizado como requisito para optar al título de Especialista en Diagnóstico Veterinario de Laboratorio.

Cohorte 2023

DETECCIÓN DE LAS VARIANTES DEL VIRUS DE LAS ALAS DEFORMADAS (DWV) EN ABEJAS INFECTADAS NATURALMENTE

ALUMNA: NUÑEZ Guadalupe

DIRECTOR: REYNALDI Francisco José

CO DIRECTOR: SGUAZZA Guillermo Hernán

Lugar de trabajo: Centro de Microbiología Básica y Aplicada (CEMIBA)

A mis amigos, los nuevos y los viejos. A mi familia, la que ya no está, la que comparte mi sangre y la que no.

A mi director y co-director, por enseñarme un nuevo mundo de ciencia, ayudarme a ver las cosas desde otra perspectiva y guiarme en este nuevo camino.

Al Centro de Microbiología Básica y Aplicada (CEMIBA) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de La Plata y sus profesionales por abrirme las puertas, darme consejos y hacerme reír.

A mi mama, por haberme criado con el amor más grande del mundo, tenerme paciencia en los momentos en los que no lo merecía, alentarme y entenderme. Sos la principal razón de que sea quién soy.

Para todas las personas que son y han sido parte de mi vida. Esto es tanto para ustedes como para mí.

“All we have to decide is what to do with the time that is given us.”

— J.R.R. Tolkien, The Fellowship of the Ring

“All have their worth and each contributes to the worth of the others.”

— J.R.R. Tolkien, The Silmarillion

1. Introducción

1.1 Transmisión de patógenos 7
1.2 Spillover y Spillback 9
1.3 Producción apícola en Argentina 10
1.4 Características del virus DWV 11
1.5 Variantes de DWV 13
1.6 Signología clínicos 15
1.7 Proceso metabólico y inmunidad 16
1.8 Papel del Varroa destructor en la transmisión de DWV 17

2. Hipótesis y Objetivos 19

Hipótesis
Objetivo general
Objetivos específicos

3. Materiales y Métodos

3.1 Origen de las colonias y obtención de muestras 20
3.2 Determinación del porcentaje de infestación de Varroa destructor 21
3.3 Diseño de primers 22
3.4 Extracción de ARN total 24
3.5 Obtención de ADN complementario 26
3.6 Selección de muestras positivas a DWV 27
3.7 Puesta a punto de PCR de punto final 27
3.8 Puesta a punto de la q-PCR 28

4. Resultados

4.1 Determinación del porcentaje de infestación de Varroa destructor 29
4.2 Determinación de la presencia de DWV 32
4.3 Puesta a punto de la PCR de punto final para determinar las variantes de DWV 33
4.4 Determinación de las variantes de DWV por q-PCR 35

5. Conclusiones 32

6. Anexos 35

7. Referencias 37

DWV: Virus de alas deformes
ARN: Ácido ribonucleico
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario
ARNasa: Ribonucleasa
RT-PCR: Retrotranscripción o transcripción inversa
q-PCR: PCR cuantitativa

“Detección de las variantes del virus de las alas deformadas (DWV) en abejas infectadas naturalmente”

Resumen

El virus de alas deformadas (DWV) es conocido por ser un patógeno de distribución mundial que afecta tanto a las abejas melíferas (*Apis mellifera*), como a otros insectos. Factores como la pérdida del ecosistema, la aparición de otros agentes infecciosos, dispersión del ácaro *Varroa destructor*, entre otros, han favorecido una disminución de la población de abejas melíferas.

El objetivo de este estudio fue investigar la presencia de DWV en infecciones naturales en tres provincias. Para lo cual se usó una técnica de RT-PCR para la detección de muestras positivas a DWV y, posteriormente, se diseñó una PCR en tiempo real que diferencia las variantes A y B del virus en abejas adultas. Este estudio realizado, demostró una baja prevalencia de DWV (23%), con una proporción similar entre las variantes DWV-A y DWV-B y la presencia de co- infecciones. Sin bien en ninguna de las colmenas muestreadas se detectó signología clínica característica (alas deformadas en abejas adultas), una de las colonias colapsó al final del muestreo.

Palabras clave: *Apis mellifera,* virus de alas deformadas (DWV), *Varroa destructor*, variantes,
RT-PCR, q-PCR

“Detection of deformed wing virus (DWV) variants in naturally infected bees”

Abstract

Deformed wing virus (DWV) is known to be a globally distributed pathogen that affects both honey bees (*Apis mellifera*) and other insects. Factors such as ecosystem loss, the emergence of other infectious agents, and the spread of the Varroa destructor mite, among others, have led to a decline in the honey bee population. The objective of this study was to investigate the presence of DWV in natural infections in three provinces. To this end, an RT-PCR technique was used to detect DWV-positive samples. A real-time PCR was subsequently designed to

differentiate the A and B variants of the virus in adult bees. This study demonstrated a low prevalence of DWV (23%), with a similar proportion between the DWV-A and DWV-B variants, and the presence of coinfections. Although no characteristic clinical signs (deformed wings in adult bees) were detected in any of the sampled hives, one of the colonies collapsed at the end of the sampling.

Keywords: *Apis mellifera, de*formed wing virus (DWV), Varroa destructor, viral variants, RT- PCR, q- PCR.

1. INTRODUCCIÓN

La protección de los ecosistemas, sus recursos y biodiversidad cumplen unos de los desafíos más importantes a nivel mundial, tanto para el presente como para el futuro. Por este motivo, identificar los organismos claves en el ambiente, así como sus posibles interrelaciones, permitirían encontrar posibles respuestas relacionadas a la preservación de la salud ambiental (Tittensor *et al*., 2014). Hace años que la *A. mellifera* es considerada una de las especies más valiosas para el ambiente por su rol como agente polinizador. Si bien los ápidos no son el grupo más diverso de insectos, cuentan con un gran número de géneros y especies relacionados taxonómicamente (Ollerton *et al*., 2017, Hung *et al.,* 2018). Las abejas polinizan tanto a cultivos de importancia agrícolas como a plantas silvestres (McMenamin *et al.,* 2016), siendo trascendentales por su función económica y ecológica. Si bien es cierto que las abejas realizan menos visitas totales a las flores que otros polinizadores (Rader *et al*., 2016) son muy importantes para la polinización y se ha demostrado que su aparición coincide con la expansión evolutiva de las plantas florales (Clarke *et al.,* 2017). Aproximadamente el 70% de los cultivos producidos en el mundo son polinizados por ellas (Klein *et al*., 2007). Su relación es una compleja adaptación co-evolutiva y un compromiso de cooperación constante (Clarke *et al.,* 2017). Las flores utilizan a las abejas como vehículos para mejorar el transporte de polen y su fertilización, mientras que las abejas se benefician enormemente del polen y el néctar como fuentes de alimento (Nicholls *et al*., 2017), mejorando así su inmunidad. Sin embargo, en los últimos años, se ha detectado una disminución en las poblaciones de abejas en todo el mundo, y diversos factores han sido propuestos como causantes de estas despoblaciones (Goulson *et al*., 2015; Sánchez-Bayo *et al*., 2019; Wagner *et*

al., 2020). Tanto los factores bióticos (patógenos, genética, contacto con animales y humanos, longevidad de la reina) como abióticos (exposición agroquímica, clima, las prácticas de manejo empleadas se encuentran estrechamente asociados e impactan de manera negativa en las colonias (Ravoet *et al*., 2013; Daughenbaugh *et al*., 2015; McMenamin *et al.,* 2016). En la actualidad se considera que uno de los principales factores es el cambio climático, cobrando una mayor importancia ya que exige una adaptación veloz tanto para las abejas como para los apicultores (Le Conte *et al*., 2008). Las modificaciones del ambiente, así como la disponibilidad de recursos han significado pérdidas de este insecto a nivel local, ya que determinadas genéticas no han podido acostumbrarse a estos nuevos cambios (Chen *et al*., 2007; Barron *et al*., 2015).

Por otro lado, muchas subespecies nuevas han sido introducidas en diversos ambientes, generando el riesgo de que nuevas enfermedades o plagas lleguen de otros entornos. De manera similar, la aparición de nuevas plantas exóticas para ese ambiente ha modificado la estabilidad de las plantas nativas y, por lo tanto, las especies polinizadoras asociadas a ellas (Kerr *et al*., 2015).

1.1. Transmisión de patógenos

Para que una infección ocurra debe haber una transmisión del agente infeccioso. De acuerdo a las características de las enfermedades virales que afectan a las abejas, es importante poder diferenciar el significado de una **infección** frente a una enfermedad (Chen *et al*., 2006). La primera se produce por la presencia y multiplicación del microorganismo en los tejidos del huésped (hospedador) o, dicho de otra manera, un proceso de invasión que puede atacar tejidos, fluidos o cavidades (Ruiz *et al*., 2006). En contraste, la **enfermedad** es la expresión clínica de la infección, originado un variado conjunto de signos clínicos por daños producido por el microorganismo (Mandell *et al*., 1979). Los patógenos, incluidos los virus, exploran múltiples rutas de transmisión a lo largo de las diferentes etapas de desarrollo, contribuyendo a la circulación del agente y produciendo diversos impactos en la fisiología y la vida del huésped (Grassly *et al*., 2008). Los cambios en los modos de transmisión de los patógenos fuerzan nuevas presiones evolutivas, pudiendo lograr cambios fenotípicos en los agentes, incluyendo la propia virulencia (Cressler *et al*., 2016).

Habitualmente, son dos las formas de transmisión de un patógeno. La transmisión denomina **horizontal** ocurre cuando el patógeno abandona un huésped infectado y pasa

a un huésped susceptible (no descendencia del huésped), pudiéndose dividirse en dos clasificaciones. La forma **directa** ocurre mediante el aire o alimentos e incluso puede incluir un componente espacial en la transmisión. En contraste, en la **indirecta**, un huésped biológico intermediario, como un vector, adquiere y transmite el virus de un hospedador a otro. El hecho de que las partículas virales permanezcan infecciosas fuera del huésped permite la infección de individuos de la misma generación o de generaciones posteriores. Por el contrario, la transmisión **vertical** ocurre cuando los padres infectados se reproducen y transmiten el patógeno a su descendencia. Este se transmite en un mecanismo de transmisión transgeneracional en patógenos que no matan a su huésped antes de la reproducción. Se debe tener en cuenta que los virus que afectan a los invertebrados generalmente adicionan dos rutas de transmisión horizontal: el canibalismo de individuos infectados y la transmisión durante el contacto sexual (Hajek *et al*., 2017). El hecho de poder persistir como una infección encubierta o asintomática dentro del mismo huésped o en el medio ambiente cumpliendo etapas infecciosas de larga duración, posibilitan que el virus pueda adoptar una estrategia letal o no letal. Esto lleva a que transmisiones mixtas puedan ocurrir con facilidad (Cory *et al.*, 2012).

Según algunos autores, los distintos tipos de transmisión tienen luego relevancia en la virulencia de un patógeno (Clayton *et al*., 1994; Ewald *et al*., 1994). Normalmente, la transmisión horizontal favorece una expansión más amplia de la enfermedad llevando a un aumento en la prevalencia de la infección en ciertas condiciones, un claro ejemplo es cuando se encuentra una alta densidad de la población del huésped junto a una alta tasa de replicación del patógeno. Opuestamente, la transmisión vertical representa un mecanismo de persistencia del virus a largo plazo y favorece la evolución de una infección benigna (Chen *et al*., 2006). Una de las particularidades de las abejas, al igual que algunos otros insectos, es que son eusociales (Engel *et al.*, 2001). Lo que significa que sus sociedades tienen la principal característica de estar constituidas no solo por individuos no reproductores (obreras) que cooperan para criar las crías de otra hembra (reina), sino que generaciones superpuestas viven al mismo tiempo en la propia colonia. Toda su estructura esta basadas en una división de trabajo (Fries *et al.*, 2001). Estas particularidades eusociales de las abejas permiten que las rutas de infección puedan diferenciarse tanto de manera **intracolonial** (entre individuos dentro de una colonia) e **intercolonial** (entre individuos de diferentes colonias) al momento de generar una infección (Fries *et al.*, 2001). El resultado de cualquier infección viral puede reflejar

el equilibrio entre los dos procesos de transmisión. Poder determinar cómo se transmite un agente patógeno, es esencial para poder saber los puntos en donde se debe efectuar las medidas determinadas y los métodos de control (Chen *et al*., 2006). Cabe mencionar que de las diversas enfermedades que afectan a las abejas ninguna es clasificada como zoonótica y en consecuencia no representan un riesgo para la salud pública (WOAH).

1.2. Spillover y Spillback

En las últimas tres décadas se ha detectado una significativa disminución en las poblaciones de insectos, entre ellos las abejas (Potts *et al*., 2010), lo que ha llevado a tomar distintas decisiones para poder sostener el papel crucial que cumplen en el medio ambiente. Uno de los inconvenientes menos estudiados es la reducción en la diversidad genética, que conlleva a la vulnerabilidad frente a agentes infecciosos (McCallum *et al*., 2002; Tarpy *et al*., 2003; Whitehorn *et al*., 2011). Las flores son, hoy en día, puntos críticos para la transmisión entre polinizadores y que incluso algunos autores las señalan como posibles vectoras y hospedadoras (Graystock *et al*., 2015). Si bien algunos sistemas planta-polinizadores son específicos, en la gran mayoría de los casos las flores son visitadas por múltiples especies de polinizadores en una compleja red de interacciones (Fontaine *et al*., 2006; Goulson *et al*., 2015). De esto se deduce que la vectorización por parte de especies no hospedadoras durante el uso compartido de flores puede ser de gran importancia en las interacciones con agentes infecciosos (Ruiz-Gonzalez *et al*., 2012; McArt *et al*., 2014).

El concepto de las enfermedades infecciosas emergentes (EIE) han generado un cambio en forma en que las infecciones son estudiadas (Daszak *et al*., 2001; Lederberg *et al*., 1992). Acá dos conceptos toman significación. El **spillover** como una de las consecuencias de las EIE, en donde un patógeno específico de una especie (huésped silvestre o autóctona) se transmite luego de una interacción con un huésped susceptible (Blitzer *et al*., 2012; Goulson *et al*., 2008). Un notorio modelo de esto es la importación de abejas, favoreciendo una disminución en la población de las polinizadores silvestres, originando amenazas a biodiversidad y produciendo alteraciones en los ecosistemas que previamente estaban equilibrados (Graystock *et al*., 2015). En el caso que las tasas de transmisión intraespecífica y/o interespecífica sean bajas, la infección se da solo en individuos susceptibles, sin que el agente se establezca en la población silvestre

(Hatcher *et al*., 2011). Cuando se originan la formación de nuevas poblaciones aisladas (especiación simpátrica) sin una barrera establecida con poblaciones nativas, un mayor potencial para la transmisión de patógenos puede suceder entre ellos (Graystock *et al*., 2013; Perlman *et al*., 2003; Schmid-Hempel *et al*., 2021).

Lo contrario también puede ocurrir cuando un patógeno es transmitido desde un huésped nuevo de vuelta a un huésped de origen. Esto es denominado **spillback**. Tras aumentar la prevalencia en el nuevo huésped pasa a diseminarse nuevamente a la población silvestre, generando un aumento de infecciones en las poblaciones autóctonas (Hatcher *et al*., 2011; Kelly *et al*., 2009). Aquí, los animales recién infectados pueden alcanzar una prevalencia de patógenos anormalmente alta debido a su alta densidad, como es el caso de las colonias de abejas melíferas en los apiarios, ya que son más densas que en las poblaciones de abejas silvestres. Cuando ya altas cargas de agentes se replican, se eleva en la población silvestre a niveles mayores de los que ocurren naturalmente (Hatcher *et al.*, 2011; Kelly *et al*., 2009). Los efectos secundarios pueden disminuirse en el caso de que las poblaciones estén bien manejadas, pero pueden estar infectadas siendo asintomáticas (Graystock *et al*., 2013). Muchos patógenos que afectan a las abejas melíferas, también han sido detectados en abejas silvestres y en otros invertebrados, lo que muestra la importancia de estos procesos (Bromenshenk *et al.*, 2010; Cornman *et al*., 2012; Martín-Hernández *et al*., 2012).

1.3. Producción apícola en Argentina

En Argentina la producción apícola está presente en 22 provincias (SENASA), pero la mayor concentración de colonias de abejas melíferas se encuentra en el centro del país. Entre Ríos, Santa Fé, Córdoba y Buenos Aires, representa el 35 % de las colmenas con cerca de 1.200.000. Los mejores rendimientos se obtienen en la zona del Valle de Río Negro en donde se concentra la fruticultura y sobre la cordillera y precordillera neuquina, debido a ser una zona de flora silvestre. El valle de Rio Negro supera la media nacional de producción de miel con rendimientos que oscilan entre 30 y 40 kg por colmena. Esto favorece el desarrollo de una práctica llamada trashumancia (o traslado de colmenas) que permite mejorar el rendimiento en función de las floraciones (Secretaría de Política Económica, 2018).

Productivamente, Argentina se posiciona como el segundo exportador mundial de miel con una producción anual promedio de 70.000 toneladas (Salina *et al.*, 2021). La demanda de la miel natural representa un 71%, seguido de un 21% de cera y un 5% de

polen, propóleo, jalea real, entre otros (Informes de cadenas de valor, 2018). No obstante, las exportaciones están concentradas en EE.UU. (48%) y Alemania (26%) (Secretaría de Política Económica, 2018).

1.4. Características del virus DWV

Los virus necesitan de un huésped vivo para poder replicarse y generar diversos niveles de daño a nivel individual o poblacional. Por un lado, el hospedador responde para controlar el efecto negativo por varios mecanismos de defensa frente al patógeno que trata de evadirlas. De acá surge el concepto de virulencia: el resultado cuantitativo de una injuria (Casadevall *et al.*, 1999; Schmid-Hempel *et al.*, 2021). En este sentido, la injuria es un rasgo flexible y adaptativo, en donde múltiples niveles de organización del huésped pueden estar afectados (molecular, celular, tisular, individual, población, especie), cada uno con diferentes resultados posibles, incluidos los niveles donde es más probable que el virus pueda encontrarse o causar su principal daño. El virus de las alas deformadas (DWV), es uno de los virus más comunes que afectan a las abejas melíferas y está ampliamente distribuido en el mundo. Recientemente reclasificado dentro del género *Iflavirus alasdeformis,* pertenece a la Familia *Iflaviridae*. Previamente, los miembros de esta familia se agrupaban dentro de un solo género. Sin embargo, el análisis filogenético de los genomas completos permitió separar taxonómicamente los virus en diferentes especies (Van Oers *et al*., 2010).

La particularidad de la Familia *Iflaviridae* es que cuenta con una asociación directa con los artrópodos, especialmente los insectos, ya que todos estos virus fueron aislados de ellos, generando distintas anomalías (Valles *et al.*, 2017). Son pequeños virus sin envoltura y sin ningún tipo de estructura en su superficie, icosaédricos de 30 nm, compuestos por un genoma de ARN de cadena única y polaridad positiva (McMenamin *et al*., 2015). Esto significa que tiene la propiedad de utilizar su propio genoma como ARN mensajero (ARNm), a partir del cual sintetizan una o varias poliproteínas que posteriormente son separadas en proteínas individuales mediante proteasas virales o celulares. Por medio de la enzima ARN polimerasa dependiente de ARN, se producen las cadenas de ARN positivas (que actúa como ARNm) y negativas (que sirven como productos intermedios de la replicación del genoma) (Modrow *et al.*, 2013). Todo este proceso de replicación ocurre en el citoplasma. El genoma de DWV cuenta con aproximadamente 10.000 pb de largo con un gran marco de lectura abierto y codifica una poliproteína de 2.894 aminoácidos (Organtini *et al.*, 2017). Esta única poliproteína

se compone de 4 proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3 y VP4) y 3 proteínas no estructurales: helicasa, proteasa 3C (3C-pro) más una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (Škubník *et al*., 2017). La VP1 tiene un tamaño de 44 kDa y es la proteína de la cápside más grande de todos los virus del orden *Picornavirales* (Organtini *et al*., 2017). Ambas regiones no traducidas participan en la regulación de la replicación y traducción del genoma (Vance *et al*., 2009) y, como resultado, tienen una interacción considerable con numerosos factores del hospedador necesarios para estos procesos. Por el contrario, el tamaño de VP2 (32 kDa) y VP3 (28 kDa) es similar al de otras proteínas de la cápside de picornavirus, y se ha descubierto tras varios estudios científicos que la VP2 tiene una buena inmunogenicidad (Fei et al., 2020). Estas tres proteínas estructurales están involucradas en la invasión y replicación viral (Brutscher et al., 2016; Zhao et al., 2019).

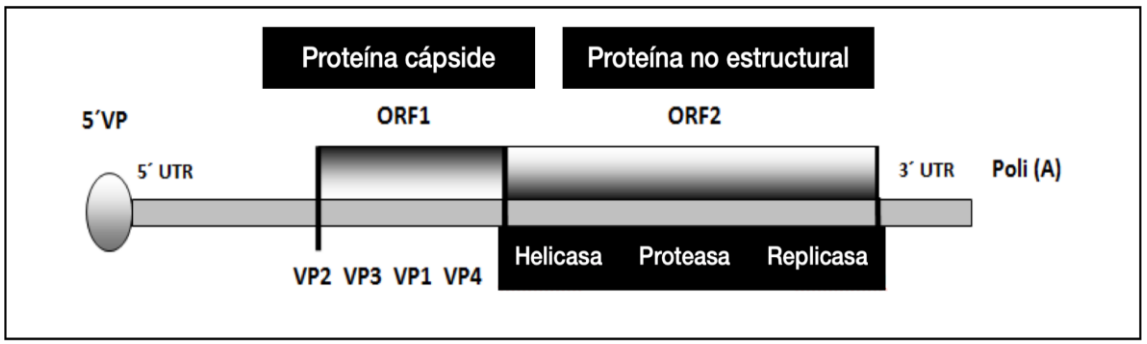

Figura. 1. Genoma Monopartito monocistrónico, que presentan genes estructurales en el extremo 5´ y genes no estructurales en el 3´. Por ejemplo, SBV y DWV (Salina *et al*., 2021).

La partícula viral de DWV presenta en su superficie una extensión de la proteína VP3 (C- terminal) que se une al receptor de la célula huésped, llamado dominio P. Junto a este, el virión de DWV llega a un diámetro máximo de 397 Å. La ubicación del dominio P puede modificarse por distintas condiciones, por ejemplo, altas concentraciones de sales en el medio, altas temperaturas a las que se exponen los residuos del dominio P y el pH que las rodea. Este dominio p, además de incluir el núcleo globular, contiene un bucle en forma de dedo con hebras β antiparalelas (β8 y β9) de cuatro residuos de longitud. El núcleo del dominio P consta de una lámina β antiparalela central formada a partir de las hebras β5 y β6 rodeadas por la hélice α1 de 11 residuos de largo, la α2 de 5 residuos de largo y dos hojas β que contienen las hebras β1 y β2 en una hoja y β3 a β7 en la contraria (Fig. 2). Las cadenas β están conectadas por bucles que varían en

longitud entre 6 y 45 residuos.

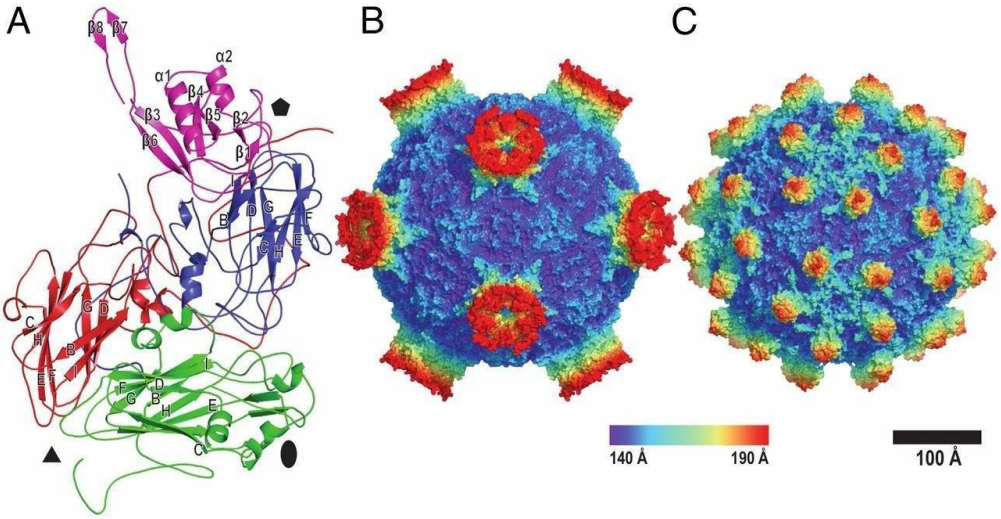

Figura. 2. Las **tres estructuras** de la unidad asimétrica icosaédrica de DWV y sus viriones en sus conformaciones alternativas. Esquema (A) muestra la proteína principal de la cápside VP1 en azul, VP2 en verde y la VP3 en rojo. El dominio P, que forma parte de VP3, está coloreado en magenta. Los elementos de estructura secundaria de los ejes de simetría quíntuple, triple y doble y sus ubicaciones se indican mediante un pentágono, un triángulo y un óvalo. Las superficies moleculares de viriones de DWV están determinadas mediante crio-EM (B) y cristalografía de rayos X (C) Los colores del arco iris en la superficie de los viriones muestran según su distancia al centro de la partícula. (Barra de escala: 100 Å.) (Škubník *et al*., 2017).

1.5 Variantes del DWV

Hoy en día se conocen cuatro genotipos del DWV: A, B, C y D (Mordecai *et al*., 2016a). El DWV tiene la particularidad de recombinarse entre los primeros dos, dando origen a la variante C. Son consideradas variantes, ya que cualquier virus que presente en su secuencia genómica diferencias de más >7,5% son establecidas como un nuevo genotipo. A pesar de esto, otros autores consideran a DWV como una cuasiespecie. Esta definición se basa en poblaciones que están formadas por un número extremadamente grande de genomas variantes, con altas tasas de mutación, que surgen continuamente y cambian a medida que avanza la replicación viral (Domingo *et al*., 2019). Esto es muy común en los virus ARN, como es el caso del DWV, donde el genotipo DWV-B comparte un 84% de identidad de secuencia de nucleótidos y un 95%

de aminoácidos en todo el genoma con el DWV-A (Ongus *et al*., 2004).

La primera variante (DWV-A) fue el genotipo principal antes de que el ácaro de Varroa destructor tomara importancia en la transmisión (Loope *et al*., 2019). Mientras que, en el último tiempo, la variante DWV-B (o virus Varroa destructor 1 o VDV-1) se ha transformado en el más prevalente en varios países (Kevill *et al*., 2019). Por último, mediante estudios filogenéticos se ha revelado la aparición de una nueva variante (DWV-C), originada de una recombinación de las previamente mencionadas (Mordecai *et al*., 2016b), lo que aumenta la diversidad de este virus (Brettell *et al*., 2017). Se debe mencionar, que una variante D **(DWV-D)** fue registrada una única vez en Egipto (de Miranda *et al.,* 2022).

Estas variantes cohabitan y se recombinan para dar origen a virus más virulentos dentro del mismo huésped (Moore *et al*., 2011; Zioni *et al*., 2011). Para algunos autores no existen diferencias en la signología clínica entre ambos genotipos, (Tehel *et al*., 2019; Brettell *et al*., 2017) aunque diversos estudios han reconocido que el DWV-B es más agresivo, y que ciertas colonias sanas de larga vida resistentes a Varroa infectadas solamente con la variante DWV-B han adquirido una protección, a través de un fenómeno conocido como exclusión de superinfección (SIE) (Mordecai *et al.,* 2016b). Este “evento” sucede cuando una infección viral preexistente previene una infección secundaria con un virus estrechamente relacionado (Dubois *et al*., 2019). El DWV-B, permite esto sólo a nivel de colonias, ya que todavía no se ha demostrado que esta variante puede excluir que DWV-A ingrese a las células (Norton *et al*., 2020; Tehel *et al*., 2019).

Se ha discutido que pueda existir competencia entre los dos genotipos cuando cohabitan dentro del mismo huésped, generando una menor mortalidad de pupas y mayores cargas de DWV-B comparado con DWV-A (Norton *et al*., 2020). Ya que DWV-B tiene una virulencia mayor, replica más rápido reduciendo la vida adulta de las abejas (Kevill *et al*., 2019). Las alteraciones en las prevalencias a nivel mundial de DWV-A a DWV-B se debe a estos factores (Tehel *et al*., 2019; McMahon *et al*., 2016; Norton *et al*., 2020). A pesar de esto, cuando se produce una co-infección con ambas variantes, la carga viral de DWV-A es inicialmente mayor que la de DWV-B solo por 72 horas, luego, las cargas más altas se corresponden con DWV-B (Tehel *et al*., 2019).

Por más que su distribución es mundial, el DWV-A es ampliamente encontrado en América del Norte mientras que la variante DWV-B es más prevalente en Europa. Sin embargo, la distribución de la variante DWV-C es más difícil de definir (Mordecai *et al.,* 2016a). En Argentina el virus de las alas deformadas se detectó por primera vez en 2013

(Sguazza *et al.,* 2013) siendo reportados únicamente las variantes A y B (Brasesco *et al.,* 2021).

1.6. Signología clínica

Aunque el DWV es uno de los pocos virus que tiene su propia manifestación clínica, puede estar presente sin causar síntomas, lo que se conoce como infecciones encubiertas (Chen *et al*., 2007). El hecho de no poder detectar signología clínica no refleja para nada la salud de la colonia (Power *et al*., 2021). Por el contrario, las infecciones sintomáticas denominadas infecciones manifiestas generan una alta mortandad de las pupas, deformidades en las alas en las crías, con apariencia arrugada, abdomen hinchado y descolorado y menor expectativa de vida de las abejas adultas (Brettell *et al*., 2017). Es posible detectar abejas sintomáticas principalmente en la etapa adulta, apareciendo en las etapas finales del colapso de la propia colonia, especialmente en el final de las estaciones de verano-otoño (Bowen *et al*., 1999). En las abejas con alas deformadas, se demostró que la replicación viral tiene lugar en la cabeza, el tórax y el abdomen, mientras que en las abejas infectadas sin signología clínica, la replicación ocurre en el tórax y/o el abdomen, pero no en la cabeza. Generalmente altos niveles de DWV en los ácaros se relacionan con altos niveles de DWV en las pupas (Bowen *et al*., 1999). Dado que el desarrollo del virus es lento, acompaña al ciclo de vida de la abeja desde la etapa de pupa hasta la edad adulta (Bailey *et al*., 1991). Investigaciones realizadas han encontrado que luego de inoculaciones virales, los niveles de DWV-B eran superiores que los de DWV-A y se acumulaban más rápidamente. En el caso del DWV-A, las patas traseras y las cabezas tuvieron los niveles iniciales más altos, mientras que el abdomen presentó los más bajos. Las patas traseras tuvieron en promedio los niveles más altos de DWV-A durante todo el experimento, pero no hubo diferencias entre los tipos de tejido en el momento pico. En el DWV-B, las cabezas y el abdomen comenzaron con mayores niveles, en tanto que las patas traseras tuvieron los niveles más bajos. Tanto las cabezas y el abdomen alcanzaron en un tiempo significativamente más corto los niveles máximos de DWV-B con respecto a las patas traseras. Los títulos virales en las glándulas hipofaríngeas fueron intermedios para ambos genotipos de virus durante todo el experimento, lo que indica una ruta potencial de transmisión del virus a la larva desde las abejas nodrizas junto con la transmisión obrera-obrera y obrera-reina (Yañez *et al*., 2020).

.

Figura. 3. (1) Abeja melífera con alas normales. (2) Infección por DWV, presentando el signo clínico característicos en las alas de una abeja melífera recién emergida (grado 5). Hay una ninfa de Varroa inmadura (flecha) en el abdomen. (3) Cabeza de una abeja obrera normal durante su emergencia. (4). Infección por DWV, cabeza durante la emergencia. Obsérvese la probóscide (trompa) protruida (flecha).

1.6. Proceso metabólico e inmunidad

La relación entre todos estos participantes se encuentra en continuo estudio, incluyendo la sucesión de pasos de la patogenia de este virus (Larsen *et al*., 2019). A pesar de esto, se reconoce que las abejas melíferas poseen un sistema inmune innato (barreras físicas, respuestas celulares y humorales). Sin embargo, estas vías se regulan a la baja poco después de la infección, lo que deja a la abeja susceptible a la replicación viral (Zhao *et al*., 2019). Las abejas infectadas con DWV-A experimentan cambios en la expresión de genes cerebrales. Esta variación del virus no sólo acelera la maduración del comportamiento de las abejas, sino que inicia vías moleculares en el cerebro

relacionadas con la transición de nodriza a obreras en abejas demasiado jóvenes. DWV altera las vías transcripcionales y se asocia con efectos neurogénicos como mala memoria espacial y déficits de aprendizaje (Traniello *et al*., 2020).
Se continúa debatiendo si las patologías más graves causadas por el DWV se deben a una adaptación genética generando una mayor virulencia (Ryabov *et al*., 2014; Gisder et al., 2018) o a títulos excesivos del virus, pudiendo incluso ocurrir en conjunto (Martin - Hernández et al., 2012).

1.8 Papel del Varroa destructor en la transmisión de DWV

Varroa destructor es hoy en día quizá para algunos autores la mayor amenaza para la salud de las abejas (Traynor *et al*., 2020). Las habilidades para resistir a los acaricidas, la necesidad de aumentar el dosaje de tratamiento para sobrepasar los umbrales tolerados por los ácaros (Plettner *et al*., 2017), más su aptitud para dispersarse rápidamente (Peck *et al*., 2019; Xie *et al*., 2016), le han dado a la Varroa las posibilidades de no solo actuar como vectores de otros virus (Wilfert *et al*., 2016) sino también de aumentar la virulencia de ellos (Conlon *et al*., 2019). El agente principal transmitido por este parásito es el DWV que, en ausencia de este ácaro, son relativamente inocuos. La presencia de ellos permite aumentar la prevalencia entre 10% a 100% de este virus dentro de las poblaciones de abejas melíferas, junto con elevación de un millón de veces en el título viral y una reducción masiva en la diversidad de DWV, generando predominio de una sola cepa.
Durante los últimos 50 años, la propagación mundial del ectoparásito Varroa destructor ha provocado la muerte de millones de colonias de abejas melíferas (Martin *et al*., 2001). Existe un consenso general de que la asociación de los ácaros con una variedad de virus ARN es un factor que contribuye al colapso global de las colonias (Johnson *et al*., 2009), porque la propagación de los ácaros ha facilitado la propagación de los virus al actuar como reservorio e incubadora viral. Por un lado, conocemos la transmisión más común por parte del Varroa destructor tanto a las pupas como a los adultos en donde se alimentan del tejido graso. No obstante, la transmisión vertical a través de óvulos y espermatozoides y la transmisión horizontal oral-fecal por alimentación, la limpieza celular, el canibalismo, el contacto entre abejas adultas son tan importantes como las interacciones ecológicas con el medio ambiente y otros insectos (Traynor *et al*., 2020).
Los ácaros no se distribuyen uniformemente por toda la colmena y su distribución depende de la época del año. Por esta razón, el muestreo de *Varroa destructor* debería

cambiar según las estaciones. En el invierno, la colonia está formada principalmente por abejas adultas junto a pocas crías obreras y una escasa cantidad de estos ácaros. Acá, todos los ácaros se encuentran en las abejas adultas, y la toma de muestra puede arrojar resultados muy precisos para determinar el porcentaje de infestación presente en las colmenas. Cuando van emergiendo nuevas abejas, la colonia va creciendo en la cantidad de abejas adultas como en la cría. En primavera, la cría de zánganos está en su mayor desarrollo junto a los de ácaros de Varroa. A medida que pasa el tiempo y se dejan de criar machos, los ácaros se encuentran en una situación en donde pasan a reproducirse en las abejas adultas alcanzando su máxima localización en las crías que emergen. Al final del verano, la población tanto de las abejas adultas como de las crías disminuye, pero la infección del *Varroa destructor* incrementa a tal punto en que algunos casos los propios tratamientos no funcionan para eliminarlos. Cuando el invierno llega, las crías nacidas se convierten en abejas con una capa extra de grasa corporal debido a las condiciones climáticas, lo que permite que estos ácaros puedan alimentarse y seguir sobreviviendo. Cuando las crías desaparecen, la Varroa no puede alimentarse ni por ende reproducirse, lo que lleva a una caída cuantitativa (Traynor *et al*., 2020).

En una cría de obreras de *Apis mellifera*, una fundadora de Varroa destructor con siete ciclos reproductivos produce aproximadamente entre 5 y 10 hijas maduras, o entre 10 y 17 hijas se reduce a solo entre 1,5 a 3 ciclos reproductivos (Rosenkranz *et al*., 2010).

Su ciclo de vida consta de una fase reproductiva en donde un ácaro fundador parasita las celdas de las abejas melíferas para alimentar a sus crías seguido de una fase de dispersión. Esta ocurre cuando una abeja parasitada emerge de su celda, llevando consigo los ácaros hembra maduros (madre e hijas). Las hijas frecuentemente afectan a una abeja nodriza (Xie *et al*., 2016) para activar sus ovarios (Häußermann *et al*., 2016) y así poder nutrirse de abejas adultas. Alimentarse del cuerpo graso de las larvas es un requisito esencial para la reproducción de varroa (Ramsey *et al*., 2019). Durante mucho tiempo, se creyó que la varroa era un parásito parecido a una garrapata que se alimentaba solo de la hemolinfa. Sin embargo, las piezas bucales y el sistema digestivo de Varroa están estructurados como un organismo que se alimenta también de tejido semisólido mediante digestión extraoral (Griffiths *et al*., 1988).

La posibilidad de que los virus puedan existir al mismo momento en un huésped puede deberse a muchos factores y el hecho de que ciertos organismos puedan actuar como vectores, como es el caso de la Varroa depende de condiciones secundarias, siendo crucial las distintas rutas de transmisión, lo que lleva a diferencias tanto en las virulencias de estos agentes (Gisder *et al*., 2018). El alimento del ácaro, la supervivencia del

patógeno entre la infección y la transmisión, la susceptibilidad del huésped receptor y si el patógeno también se replica o no en el ácaro (vector biológico) o no (vector mecánico) son variables a tener en cuenta (Gisder *et al*., 2018; Posada- Florez *et al*., 2019). Aunque es cierto, que la Apis mellifera presenta una larga lista de virus que pueden actuar como patógenos (Grozinger *et al*., 2019), solo el virus del ala deformada (DWV) y el de la parálisis aguda de las abejas (ABPV) tienen una correlación directa con el vector Varroa destructor (Martin *et al*., 2019; de Miranda *et al*., 2010).

Fig.4

Fig.5

Fig. 4. Abeja adulta con alas deformadas. Se observa un ácaro (círculo rojo) que parasitó a la pupa adherido a la abeja.
Fig. 5. *Varroa destructor* (círculo rojo) situada en el tórax de una abeja melífera (Roth *et al*., 2020).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Poder diferenciar la variación genética entre las variantes A, B y C del virus de alas deformadas, permitiría correlacionar posibles casos de despoblamiento de colmenas con la variante del virus.

Objetivo general

Detectar el virus DWV en colonias de la ciudad de La Plata, Gran La Plata y localidades

de Argentina para luego poder distinguir las variantes A, B o C mediante la técnica de PCR.

Objetivos específicos

1. Diseñar primers que permitan detectar y tipificar las distintas variantes del virus de las alas deformadas.

2. Poner a punto la extracción de ARN total y su posterior transcripción en ADN complementario (ADNc) por medio de una reacción de transcripción reversa (RT).

3. Optimizar la reacción de PCR en tiempo real para poder discriminar las variantes mencionadas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Origen de las colonias y obtención de muestras

Se tomaron 52 muestras de colmenas al azar durante el periodo de agosto a diciembre de 2024. Del total de ellas, 19 muestras fueron adquiridas de las colmenas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, 5 de las colmenas encontradas en la localidad de Bavio, Magdalena, 6 colmenas pertenecientes a la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Plata, 6 de la Escuela Agropecuaria N°1 Gral. Lucio Mansilla en Bavio, 14 fueron de Entre Ríos y 2 de la provincia de Córdoba.

Antes de tomar las muestras correspondientes de cada colmena, se realizó una observación externa e interna. En esta última se analizaron todos los cuadros observando tanto a las abejas adultas, la cría, la reina como el fondo de la colmena para tratar de identificar algún tipo de signología clínica. Debido a que existe una relación directa entre el virus DWV y el ácaro de *Varroa destructor*, las muestras fueron adquiridas de los cuadros con cría de la colonia, principalmente de lo que se denomina cría abierta, ya que en este lugar es más común encontrar abejas infectadas que adquirieron la virosis durante la metamorfosis, por la picadura del ácaro.

Se decidió tomar muestras individuales de cada colmena (más de 300 individuos) para así poder evaluar no solo la presencia o ausencia del DWV, sino también el porcentaje

del *Varroa destructor.* Todas las muestras de abejas adultas fueron tomadas con un frasco de boca ancha y colocadas rápidamente en conservadora de polipropileno en contacto con bolsas de hielo seco con capacidad para guardar las muestras. El ARN es muy inestable a temperatura ambiente ya que se puede llegar a degradar en aproximadamente media hora. Para evitar la degradación, las muestras fueron colocadas en bolsas de plástico y una vez arribadas al laboratorio fueron almacenadas a -80 °C para su conservación.

La cadena de frío es importante a la hora de poder procesar las muestras biológicas y obtener resultados óptimos a la hora de realizar las técnicas moleculares posteriores. La obtención de ARN de alta calidad es el primer paso, y a menudo el más crítico, en la realización de muchas técnicas moleculares, como la PCR en tiempo real con transcripción inversa (RT-PCR).

3.2 Determinación del porcentaje de infestación de Varroa destructor

Se determinó según SENASA que en el caso de que se trate de un apiario destinado a la producción de miel, polen, propóleos, entre otros, por lo menos el 10% de las colmenas que conforman el apiario o de 6 colmenas cuando lo conforman menos de 60. Debido a que el objetivo de este trabajo radica en el estudio científico para poder vincular la presencia del ácaro con el virus de alas deformadas, todas las colmenas fueron obtenidas luego de la realización del tratamiento acaricida con amitraz en la temporada anterior. Las muestras individuales recolectadas de 3 cuadros de cría abierta fueron colocadas cada una en frasco de boca ancha, con agua y alcohol en partes iguales. Cada uno se agitó por un mínimo de 5 minutos para que los ácaros se fueran desprendiendo para ser lavados posteriormente por agua y así evitar que los parásitos queden adheridos a las abejas. El contenido fue filtrado mediante un tamiz doble, ya que uno retiene las abejas y el otro con uno más pequeño, retiene a los ácaros. El conteo de ácaros y abejas se realizó por separado para calcular el % de infestación, dividiendo ácaros sobre abejas y multiplicando por 100.

Fig. 6. Esquema de Prueba del Frasco para el monitoreo de colmenas para prevenir los daños causados por la varroosis (SENASA).

3.3 Diseño de primers

Con el objetivo de poder distinguir entre las variantes A, B y C de DWV, se diseñaron primers específicos para cada una de ellas a partir de un alineamiento múltiple de secuencias del genoma completo del virus. Para el alineamiento, se utilizó el programa Clustal X (http://www.clustal.org/ clustal2/) a partir de secuencias de nucleótidos obtenidas del GenBank. El conjunto de secuencias estudiadas al momento de diseñar los primers fueron lo más heterogéneas posibles (distintos países y años) para poder identificar regiones del genoma con mayor similitud. Estas “zonas conservadas” son secuencias de nucleótidos en el material genético que no han sufrido cambios o que sus modificaciones han sido muy pocas a lo largo del tiempo evolutivo en referencia con su árbol filogenético.
Los primers se diseñaron para que sean complementarios a la región seleccionada de ADN y al mismo tiempo cumplieran con ciertas características:

A. Longitud de 18-24 bases: En el caso que los primers sean demasiados cortos producen un producto de amplificación de ADN inespecífico, mientras que los primers largos resultan menos eficientes.

B. **40-60% de contenido de G/C**: la citosina y la guanina tienen una afinidad de unión más fuerte que la adenina y la timina y las repeticiones de más de cuatro o más G/C pueden permitir la unión a muchos lugares del genoma lo que podría ocasionar la aparición de productos inespecíficos.
C. **Que el extremo 3' termine con 1-2 pares G/C (3' Clamp):** Esto es necesario ya que el primer debe concordar completamente a la cadena de ADN molde en ese extremo para que pueda continuar la elongación. Es por eso que se utiliza una guanina o citosina en el extremo 3'.
D. **Temperatura de melting (Tm) de 50-60°C:** debe estar entre 3° a 5° por encima de la temperatura de anneling (Ta). La temperatura de anneling (hibridación) debe ser más baja que la temperatura de melting (Tm) para que los primers puedan unirse eficientemente al ADN moldes, pero no tan baja como para que se unan en sitios no específicos.
E. **Los pares de primers deben tener una Tm con una diferencia no mayor de 5 °C entre sí:** esto asegura que se unan a sus cadenas de ADN complementarias al mismo tiempo, lo que reduce la posibilidad de que el primer que posea Tm más alta se una a secuencias de ADN no específicas.
F. Los pares de primers no deben tener regiones complementarias.
G. En el caso de una multiplex PCR, es necesario que los productos de amplificación obtenidos, sean de tamaños diferentes.

En base a las premisas anteriores, se diseñaron 3 primers (Tabla 1). Un primer forward universal común a ambas variantes y dos primers reversos específicos para las variantes A y B. Para comprobar que no se forman heterodímeros se utilizó el programa AnnHyb v4.944. (www.bioinformatics.org/annhyb), mientras que la especificidad de los primers fue corroborada utilizando el software Primer-Blast. (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). De esta forma, con los primers diseñados, se obtendría una banda de 735 pb para la variante A y la de 338 pb para DWV-B. En el caso de DWV-C, ya que se trata de una combinación de ambas variantes se obtendría ambas bandas simultáneamente.

Tabla 1. Primers utilizados para discriminar las variantes de DWV

NOMBRE DE PRIMER	SECUENCIA
Forward Universal DWV	5' -ACCACTGCAGTATCGAGTAGAG- 3'
Reverse A	5' -CCTAGCTTCATCAACTTCCCATG- 3'
Reverse B	5' -AAAGGAAATCCCGATACAGTCAC- 3'

3.4 Extracción de ARN total

Para la extracción de ARN a partir de las muestras obtenidas, se utilizó el reactivo comercial Trizol® de acuerdo a las indicaciones del fabricante con leves modificaciones, de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Colocar en una bolsa con cierre hermético 15 abejas con 1,5 ml de PBS estéril y macerar enérgicamente con Stomacher® hasta observar un macerado homogéneo.

**Opcional: El homogenato puede congelarse a -80°C y descongelarse. (Esto ayuda a romper celulas, garantizando la liberación de acidos nucleicos)*

2. Trasvasar aproximadamente 1 ml del homogenato a un tubo de 1,5 ml estéril y centrifugar a 4500 g durante 15 minutos.

3. Pasar 300µl del sobrenadante obtenido a un nuevo tubo y agregar 30µl de Proteinasa K (Concentración 20mg/ml), incubar en bloque térmico 1hs a 56°C.

4. Centrifugar 13.000 rpm durante 10 minutos.

5. Tomar 500µl del sobrenadante, pasar a un tubo 1,5 estéril y agregar 500µl de Trizol ® más 220µl de cloroformo.

6. Mezclar enérgicamente con Vortex por 10 minutos.

7. Centrifugar 13.000 rpm durante 10 minutos.

8. Trasvasar 500µl de la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf y agregar 750µl de isopropanol.

9. Enfriar 15 minutos a -70°C (o toda la noche a -20 °C).

10. Centrifugar 10 min a 13.000 rpm

11. Descartar el sobrenadante y agregar 500µl de etanol 70%

12. Mezclar con vortex durante 10 segundos y centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos.

13. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el pellet durante 15-20 min colocando el tubo boca abajo sobre un papel absorbente.

14. Resuspender el pellet con 25µl de agua libre de nucleasas. Conservar a -80°C o realizar la Retrotranscripción inmediatamente.

3.5 Obtención de ADN complementario

MEZCLA DE REACCIÓN A

Colocar los siguientes reactivos en un tubo 0,5 ml estéril:

Random Primers (0,5ug/ml)	5µl
Agua	5µl
ARN (previamente obtenido)	5µl
Volumen final:	**15µl**

Incubar: 5 minutos a 65°C y luego enfriar en hielo durante 2 minutos.

MEZCLA DE REACCIÓN B

Colocar los siguientes reactivos en un tubo 0,5 ml estéril:

Buffer de reacción	5µl
Agua	3,25µl
dNTPs	1,25µl
MMLV (Promega)	0,5µl
Volumen final:	**10µl**

Posteriormente, unir las reacciones A y B (volumen final: 25µl) e incubar 37°C durante 60 minutos.
Conservar a -80°C hasta su uso o realizar la reacción de PCR inmediatamente.

3.6 Selección de muestras positivas a DWV

La totalidad de las muestras fueron procesadas para detectar aquellas muestras de colmenas que estuvieran infectadas por el virus de las alas deformadas, para eso se utilizó un PCR multiplex (mPCR) previamente desarrollada por el grupo de trabajo (Sguaza *et al.,* 2012). Mediante esta mPCR se pueden detectar los 7 virus más comunes que afectan a las abejas: Virus de alas deformadas (DWV), Virus de la cría ensacada (SBV), Virus de Kashmir (KBV), Virus de la parálisis aguda de las abejas (ABPV), Virus de la parálisis israelí de las abejas (IAPV), Virus de la parálisis crónica de las abejas (CBPV) y el Virus de las celdas reales negras (BQCV). Las condiciones de ciclado fueron las siguientes:

1. Desnaturalización inicial: 1 ciclo a 94° C durante 5 minutos.
2. Ciclado: 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos.
3. Annealing: 54°C durante 30 segundos.
4. Extensión: 72°C por 45 segundos.
5. Extensión final: 1 ciclo a 72°C por 10 min.

Los productos de PCR obtenidos, fueron analizados en un gel de agarosa al 2,5%, preparado con TBE (tris borato EDTA) al 0,5%, con voltaje de 100 voltios y utilizando un marcador de peso molecular de 100pb (Promega). Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue colocado en bromuro de etidio entre 10 y 15 minutos. El resultado obtenido, permitió seleccionar las muestras positivas a DWV (peso molecular de 269 pb).
Las muestras que resultaron positivas a DWV fueron utilizadas posteriormente para determinar las distintas variantes del virus.

3.7 Puesta a punto de PCR de punto final

A partir de las muestras positivas guardadas a una temperatura de - 20°C, se prosiguió con la puesta a punto de la PCR. La primera meta de esta etapa fue reducir los dímeros de primers. Para evitar la formación de dichos dímeros, se probaron distintas concentraciones de primers, diferentes temperaturas de annealing y diferentes concentraciones de molde. El volumen final del protocolo fue de 20 ul. Se utilizaron 4 diferentes concentraciones (0,5 pM, 0,375 pM, 0,25 pM y 0,125 pM) de cada primer.

Esto se realizó para poder detectar inhibidores, contaminantes existentes y evaluar si existía una relación entre las más altas cantidades de primers utilizados en el protocolo con incrementos en la unión de forma no específica a sitios no deseados en el molde. Se evaluó la diferencia entre la utilización de dos polimerasas comerciales, Taq-Plus Polimerasa y Taq-Holmes (INBIO), a una concentración de 2,5 U en ambos casos. En ningún momento se determinó una diferencia entre ambas enzimas, incluso cuando se aumentó la proporción a 3,75 pensando en la longitud del molde. En ambos casos los productos se replicaron por completo. Debido a eso se mantuvo la concentración inicial con el uso Taq-Plus Polimerasa. Como la temperatura óptima para que la Taq-Plus Polimerasa es más activa entre 70 a 75 °C con estabilidad térmica a 92 °C, se tuvo en cuenta como una de las características más importantes al momento de programar la etapa de melting.

Para confirmar la especificidad de los primers, 4 productos**,** tomados al azar, de las PCR anteriores fueron enviados a secuenciar a Macrogen (Korea).

3.8 Puesta a punto de la q-PCR

En base a los resultados que se obtuvieron en la sección 3.7, se puso a punto una PCR en tiempo real. La desnaturalización fue constante a 95° durante 5 minutos para que la amplificación sea correcta. Para la temperatura de annealing, se probó un rango de 50 a 59 grados y se eligió 56°C durante 30 segundos. La extensión no fue modificada en ningún momento, siendo de 72°C por 30” ya que, a menor tiempo, menos posibilidad de amplificación de fragmentos inespecíficos.

El punto de melting fue uno de los parámetros más modificados, ya que cuando se chequearon los productos de PCR se detectó un pico inespecífico (artefactos) a los 77°C. Se utilizó EvaGreen® que debido a su propiedad de ser extremadamente estable tanto térmica como hidrolíticamente brindó un mejor resultado. La molécula es esencialmente no fluorescente por sí misma, pero se vuelve altamente fluorescente al unirse al ADNc o al producto de PCR. El reactivo EvaGreen® es menos mutagénico o citotóxico al ser completamente impermeable a las membranas celulares a diferencia de SYBR® Green, que ingresa a la célula rápidamente y se sabe que es un poderoso potenciador de mutaciones.

En base a los resultados obtenidos, el protocolo final diseñado fue:

1. Desnaturalización inicial: 1 ciclo a 94° C durante 5 minutos.

2. Ciclado: 40 ciclos a 94°C durante 45 segundos.
3. Annealing: 56°C durante 30 segundos.
4. Extensión: 72°C durante 30 segundos.
5. Curva de Melting: de 70° a 95°C, con incremento de 0,1° cada 10 segundos.

4. RESULTADOS

4.1 Determinación del porcentaje de infestación de Varroa destructor

A partir de la metodología de la "Prueba de Frasco" propuesta por SENASA, se pudo determinar el porcentaje de infestación de *Varroa destructor* en las muestras procesadas a partir del estudio de 300 individuos por colmenas. Los resultados se detallan a continuación:

Tabla 2. Resultados de la "Prueba de Frasco de cada colmena muestreada

NÚMERO DE COLMENA	LOCALIDAD	PORCENTAJE DE INFESTACIÓN DE VARROA	SUPERA LOS LÍMITES
1	AP - FCV-UNLP – La Plata	Negativo	NO
2	AP - FCV-UNLP – La Plata	0,34 %	NO
3	AP - FCV-UNLP – La Plata	0,72 %	NO
4	AP - FCV-UNLP – La Plata	Negativo	NO
5	AP - FCV-UNLP – La Plata	3,125 %	SI
6	AP - FCV-UNLP – La Plata	1,23 %	SI
7	AP - FCV-UNLP – La Plata	Negativo	NO
8	AP - FCV-UNLP – La Plata	3,53 %	SI
9	AP - FCV-UNLP – La Plata	0,57 %	NO
10	AP - FCV-UNLP – La Plata	Negativo	NO
11	AP - FCV-UNLP – La Plata	Negativo	NO
12	AP - FCV-UNLP - La Plata	Negativo	NO
13	AP - FCV-UNLP - La Plata	Negativo	NO
14	AP - FCV-UNLP - La Plata	Negativo	NO
15	AP - FCV-UNLP - La Plata	Negativo	NO
16	AP - FCV-UNLP - La Plata	Negativo	NO
17	AP - FCV-UNLP - La Plata	Negativo	NO

18	AP - FCV-UNLP - La Plata	Negativo	NO
19	AP - FCV-UNLP - La Plata	Negativo	NO
20	AP - FCAyF - La Plata	Negativo	NO
21	AP - FCAyF - La Plata	Negativo	NO
22	AP - FCAyF - La Plata	**2,29 %**	SI
23	AP - FCAyF - La Plata	Negativo	NO
24	AP - FCAyF - La Plata	Negativo	NO
25	AP - FCAyF - La Plata	Negativo	NO
26	AP - FCV - UNLP - Bavio	Negativo	NO
27	AP - FCV - UNLP - Bavio	**1,26 %**	SI
28	AP - FCV - UNLP - Bavio	Negativo	NO
29	AP - FCV - UNLP - Bavio	Negativo	NO
30	AP - FCV - UNLP - Bavio	**2,59 %**	Si
31	AP - EA – Bavio	Negativo	NO
32	AP - EA – Bavio	Negativo	NO
33	AP - EA – Bavio	Negativo	NO
34	AP - EA – Bavio	Negativo	NO
35	AP - EA – Bavio	Negativo	NO
36	AP - EA – Bavio	Negativo	NO

*AP- FCV- UNLP: Apiario de la Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de la Plata. Localidad: La Plata, Buenos Aires

*AP - FCAyF - UNLP: Apiario de la Facultad De Ciencias Agrarias y Forestales - Universidad Nacional de la Plata. Localidad: La Plata, Buenos Aires

*AP- FCV - UNLP - Bavio: Apiario de la Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de la Plata. Localidad: Bavio, Magdalena, Buenos Aires

* AP - EA - Bavio: Escuela de Educación Secundaria Agraria Gral. Lucio Mansilla Bartolomé Localidad: Bavio, Magdalena, Buenos Aires

No se realizó el conteo de Varroa de las muestras pertenecientes a **Córdoba y **Entre**

Ríos por falta de cantidad de individuos suficientes para la prueba correspondiente.

4.2 Determinación de la presencia de DWV

El análisis individual de cada colonia estudiada de distintas regiones por medio de la RT-PCR Multiplex revelaron la presencia del virus de DWV en 12 muestras (C2, C4, FCV7, FCV8, FCV9, E8, E9, E10, E11, E12, E13 y E14). La detección de DWV se representa en la Tabla 3

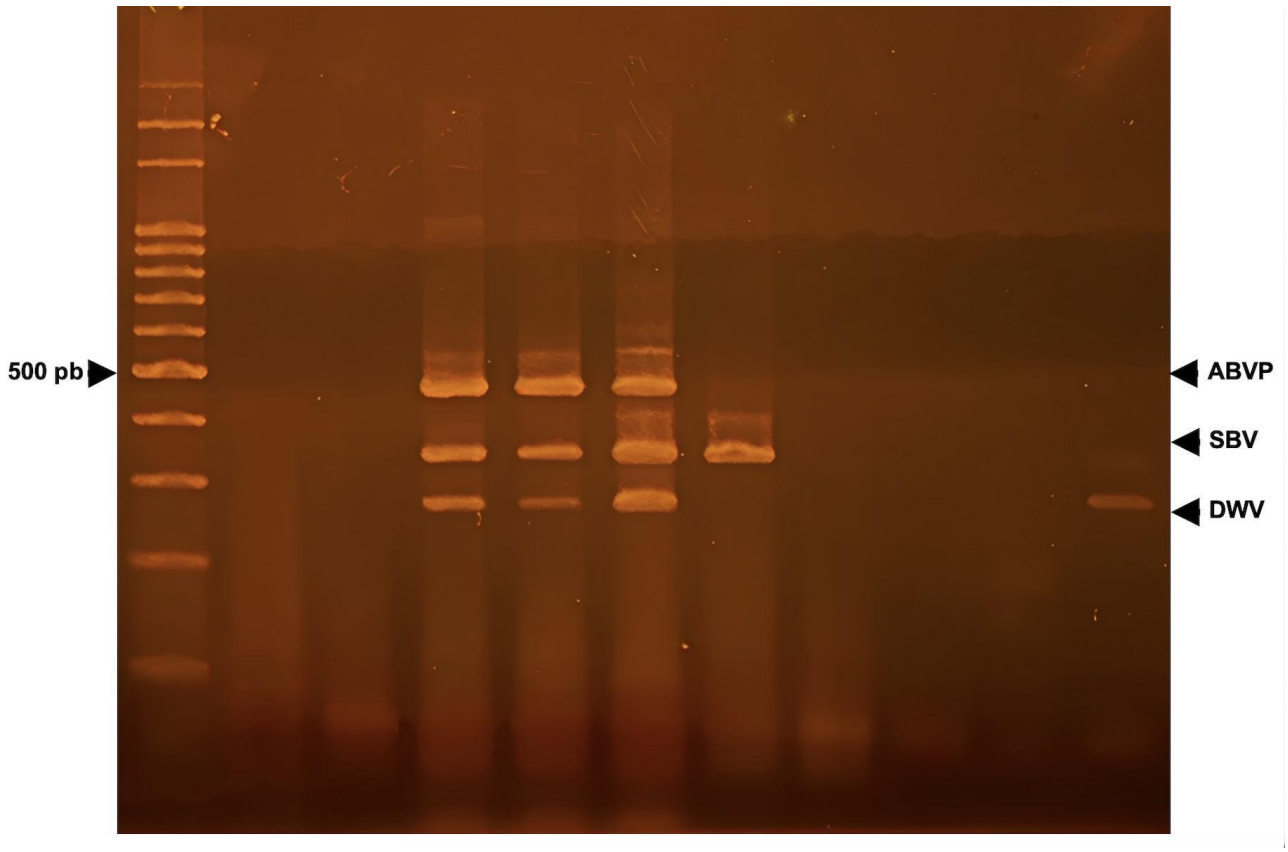

Fig. 7. Análisis de gel de agarosa por medio de detección simultánea a través de RT-PCR Multiplex en dilución de ADNc 1/100. Se evidencia una muestra positiva de DWV con un peso molecular de 269 pb y coinfección con SBV (342 pb) y ABPV (460 pb).

.

Tabla 3. Resultados de las variantes de las colmenas positivas a DWV.

NOMENCLATURA DE LA COLMENA	LOCALIDAD	DWV-A	DWV-B
FC-7	AP - FCV-UNLP - La Plata	**Positivo**	**Positivo**
FCV-8	AP - FCV-UNLP - La Plata	-	**Positivo**
FCV-9	AP - FCV-UNLP - La Plata	**Positivo**	-
C2	AP – Córdoba	**Positivo**	-
C4	AP – Córdoba	**Positivo**	**Positivo**
E8	AP - Entre Ríos	**Positivo**	-
E9	AP - Entre Ríos	**Positivo**	**Positivo**
E10	AP - Entre Ríos	**Positivo**	-
E11	AP - Entre Ríos	-	**Positivo**
E12	AP - Entre Ríos	-	**Positivo**
E13	AP - Entre Ríos	-	**Positivo**
E14	AP - Entre Ríos	**Positivo**	-

4.3 Puesta a punto de la PCR de punto final para determinar las variantes de DWV

Con el fin de validar los primers diseñados para confirmar la presencia de las variantes A y B, 4 muestras fueron enviadas a secuenciar. El producto perteneciente a la muestra de FCV-8 fue confirmado como variantes B, las muestras FCV-9, C2 fueron corroboradas como DWV-A. Para el caso particular de la muestra C4, en donde previamente se habían detectado ambas variantes, pudiendo representar tanto una co-infección o la presencia de la variante C del virus, la secuenciación permitió concluir que sé que se trataba del tipo A.

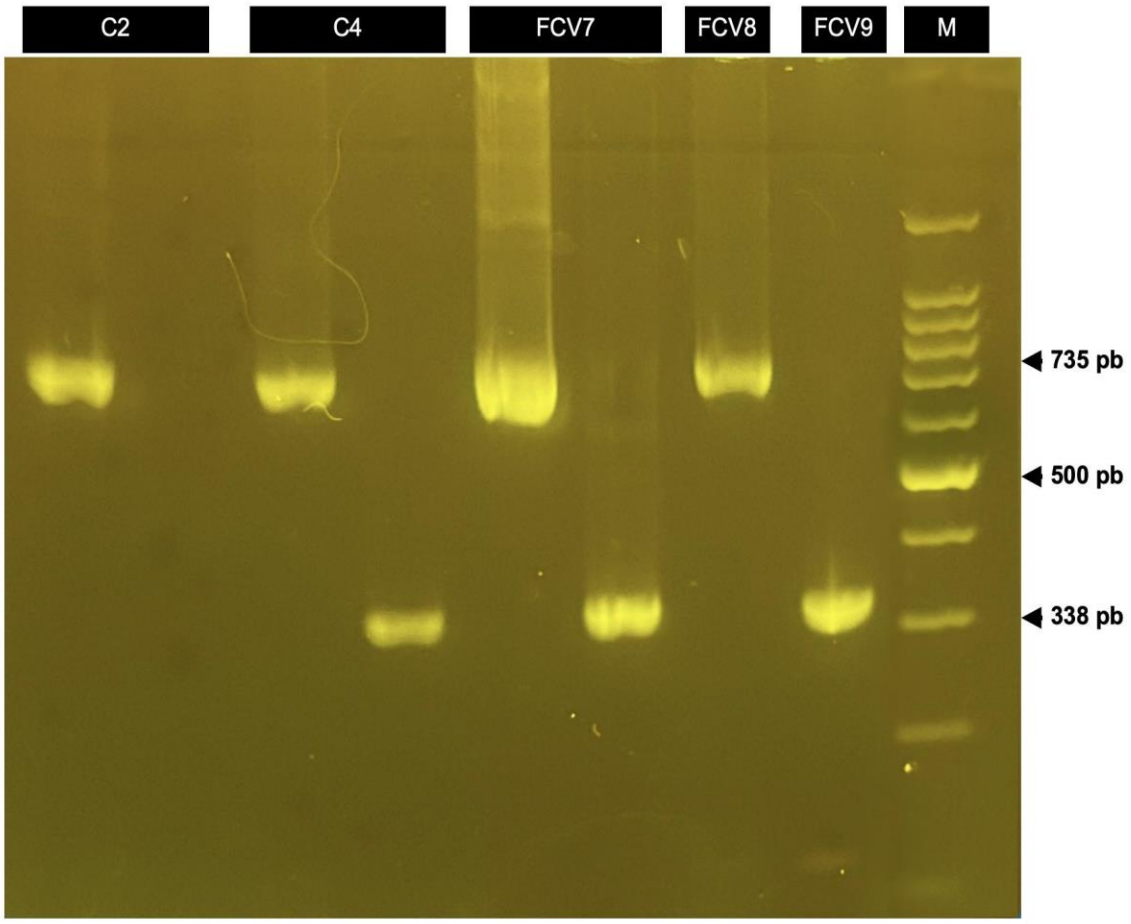

Fig. 8. Análisis de gel de agarosa por medio de detección simultánea de las variantes de DWV en dilución de ADNc 1/100. Las muestras positivas de DWV-A (C2, FCV9), DWV-B (FCV8) y coinfección (C4, FCV7). La banda de peso molecular de la variante DWV-A fue 735 pb y la de DWV-B de 338 pb.

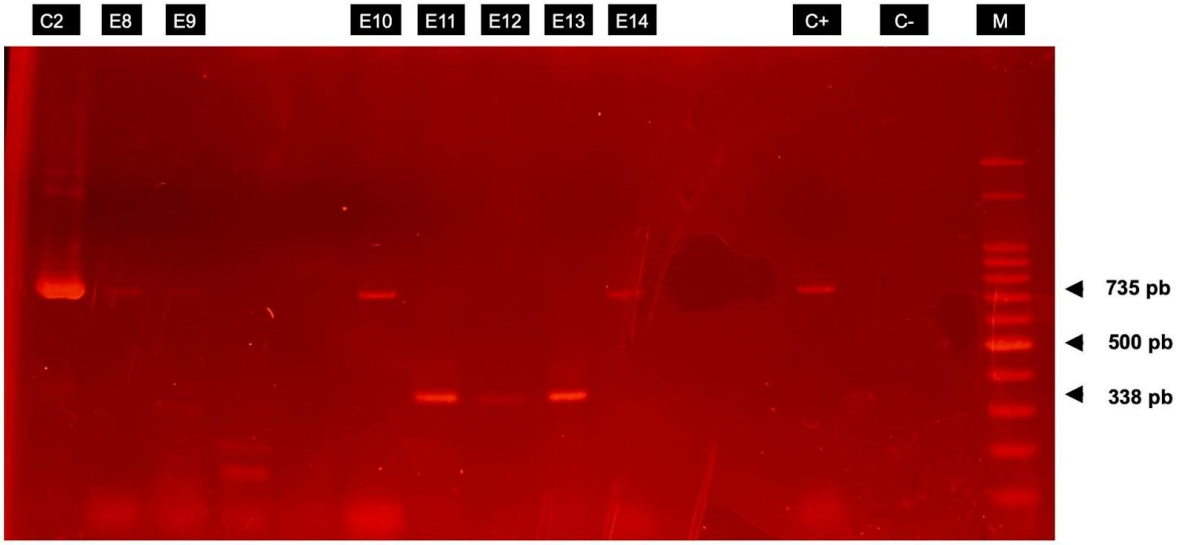

Fig. 9. Electroforesis en gel de agarosa por medio de detección simultánea de las variantes de DWV en dilución de ADNc 1/100. Las muestras positivas de DWV-A (C2, E8, E10, E14), DWV-B (E11, E12, E13) y coinfección (E9). La banda de peso molecular de la variante DWV-A fue 735 pb y la de DWV-B: 338 pb.

4.4 Determinación de las variantes de DWV por q-PCR

En base a los resultados previamente obtenidos se logró estandarizar una PCR de tiempo real para determinar las distintas variantes de DWV. Por medio de esta técnica se pudo establecer que las muestras C2, E8, E10, E14, FCV9 corresponden a las variantes DWV-A y las muestras E11, E12, E13 y FCV8 pertenecen a la variante DWV-B. También se observó la presencia de tres muestras positivas a ambas variantes (FCV7, E9, C4). De acuerdo, a los estudios realizados, se pudo establecer el punto de melting de la variante B en 80,5°C de 88°C para la variante A, debido a su mayor peso molecular.

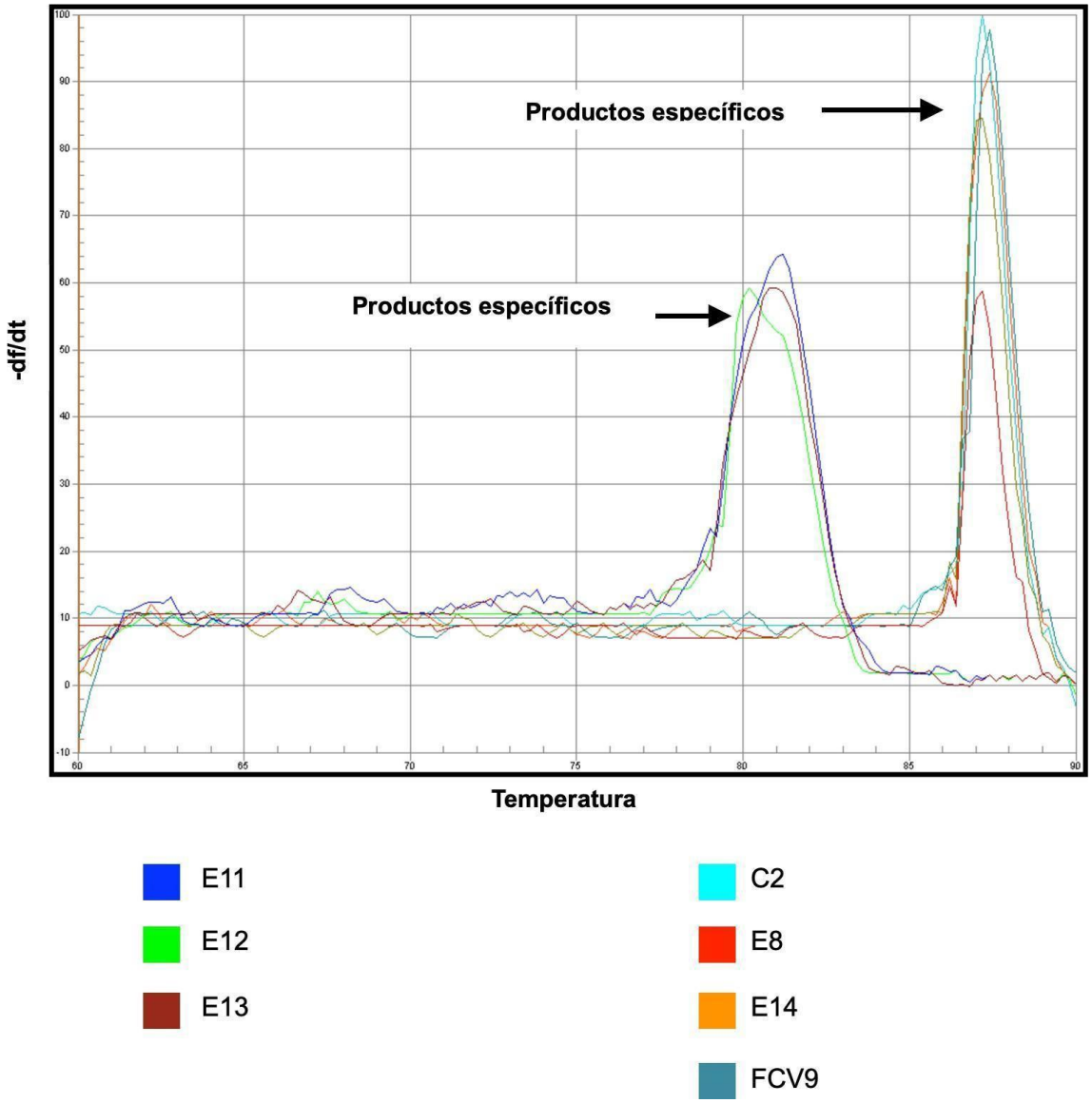

Fig. 10. Gráficos de curvas y picos de fusión de un análisis de Tm con EVA-Green. Muestras E11, E12, E13 en dilución 1/100 con picos de 82°C aproximadamente referente a DWV-A. Muestras C2, E8, E10, FCV9 en dilución 1/100 con picos de 88°C aproximadamente referente a DWV-B.

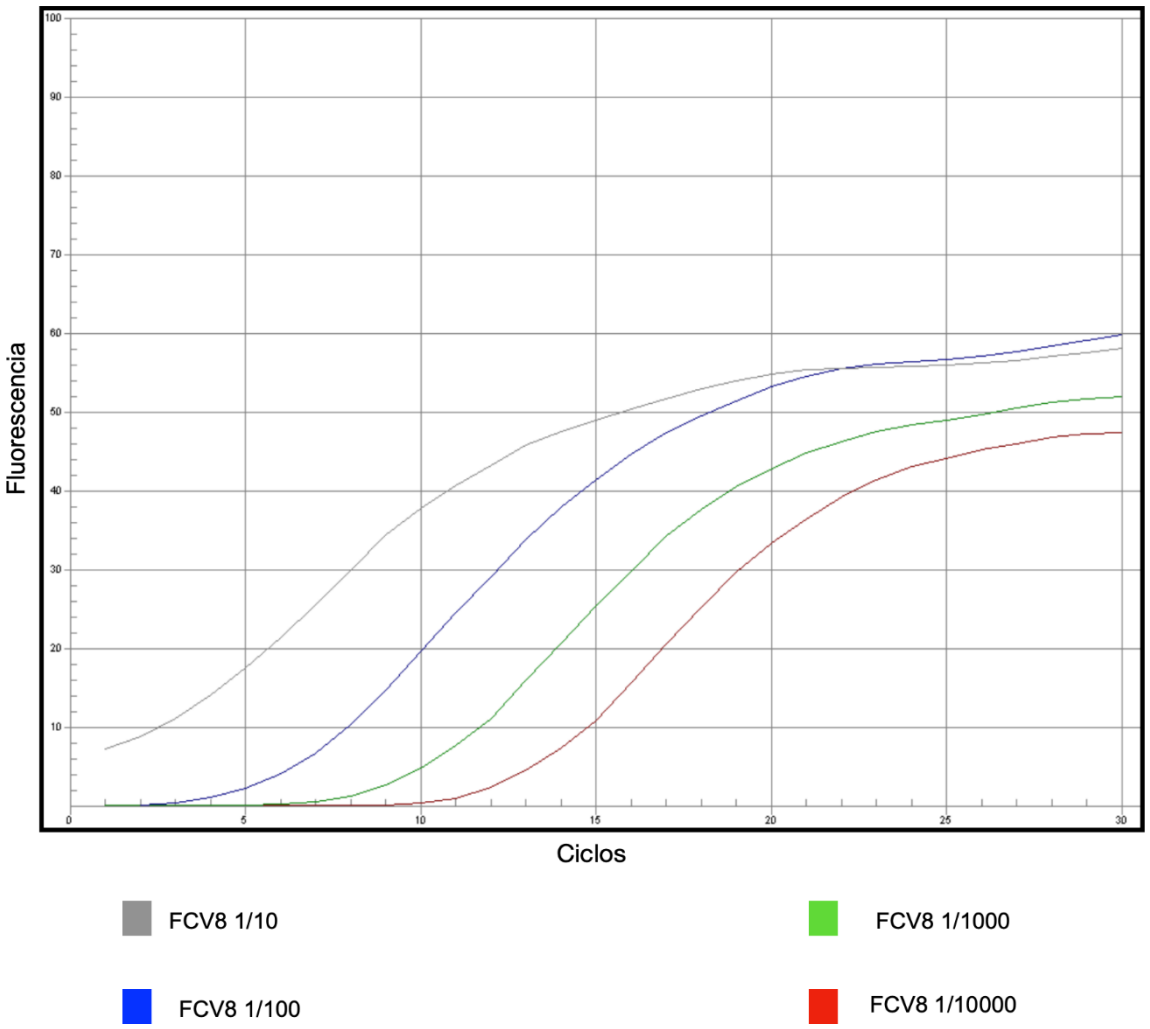

Fig. 11. Muestra FCV8 en 4 diluciones positivas a DWV-B (1/10 a 1/10.000). Revela el valor de Ct (señal) de cada una de ellas en un protocolo con 30 ciclos. A mayor dilución de ADNc de FCV8, mayor número de ciclos necesarios para superar el umbral. Cuando el valor de Ct es bajo, la fluorescencia cruza el umbral, lo que representa que la cantidad muestra en estudio es alta.

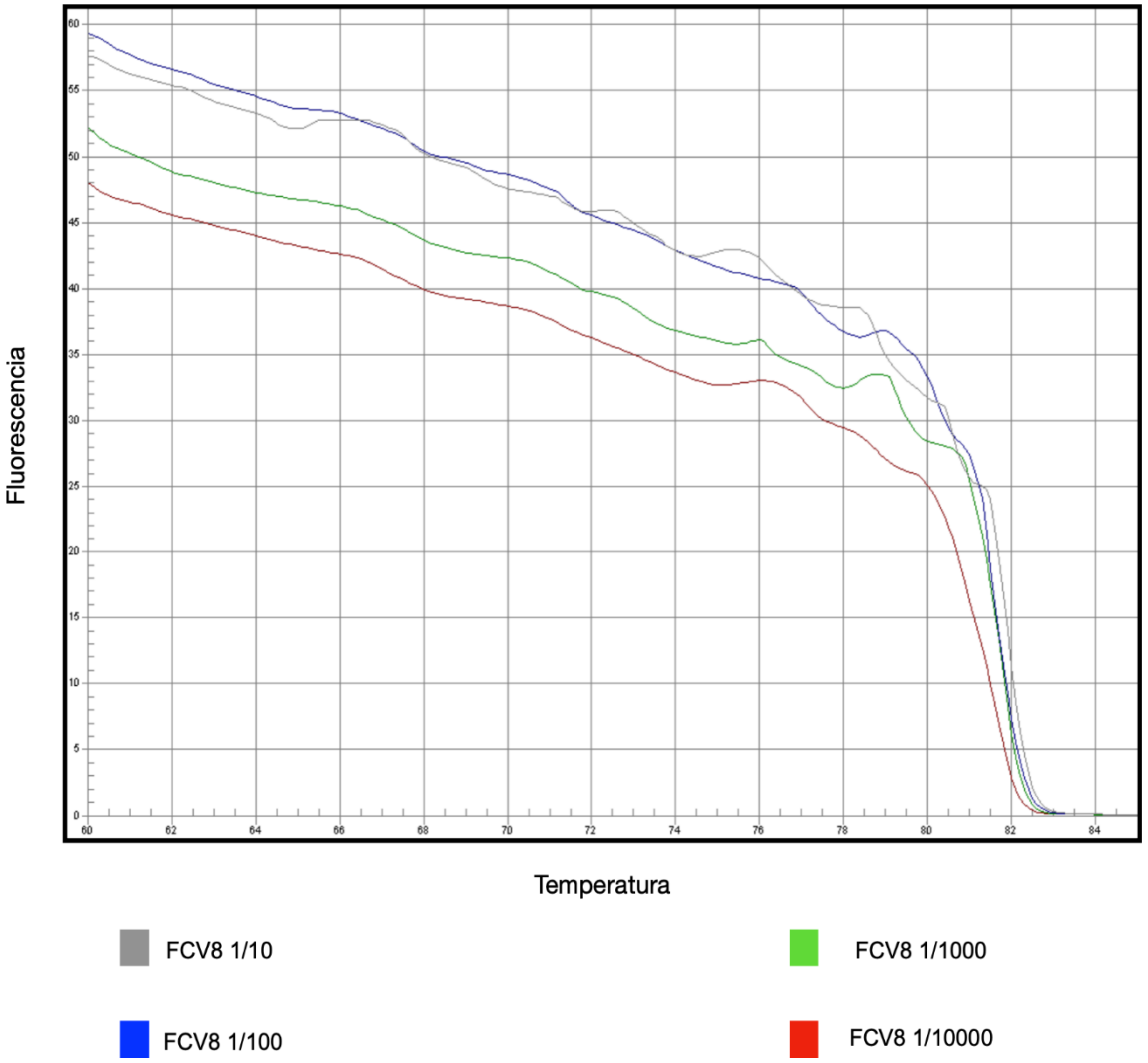

Fig. 12. Gráficos High Resolution Melt de curvas y picos de fusión de un análisis de Tm con EVA-Green. Muestra FCV8 en curvas de melting normalizadas en cuatro diluciones diferentes, cada una con su color correspondiente. El ADN bicentenario se va desnaturalizando a medida que la temperatura aumenta, lo que finalmente ocurre a los 82°C. Las 4 muestras pueden ser diferenciadas incluso luego del aumento de temperatura.

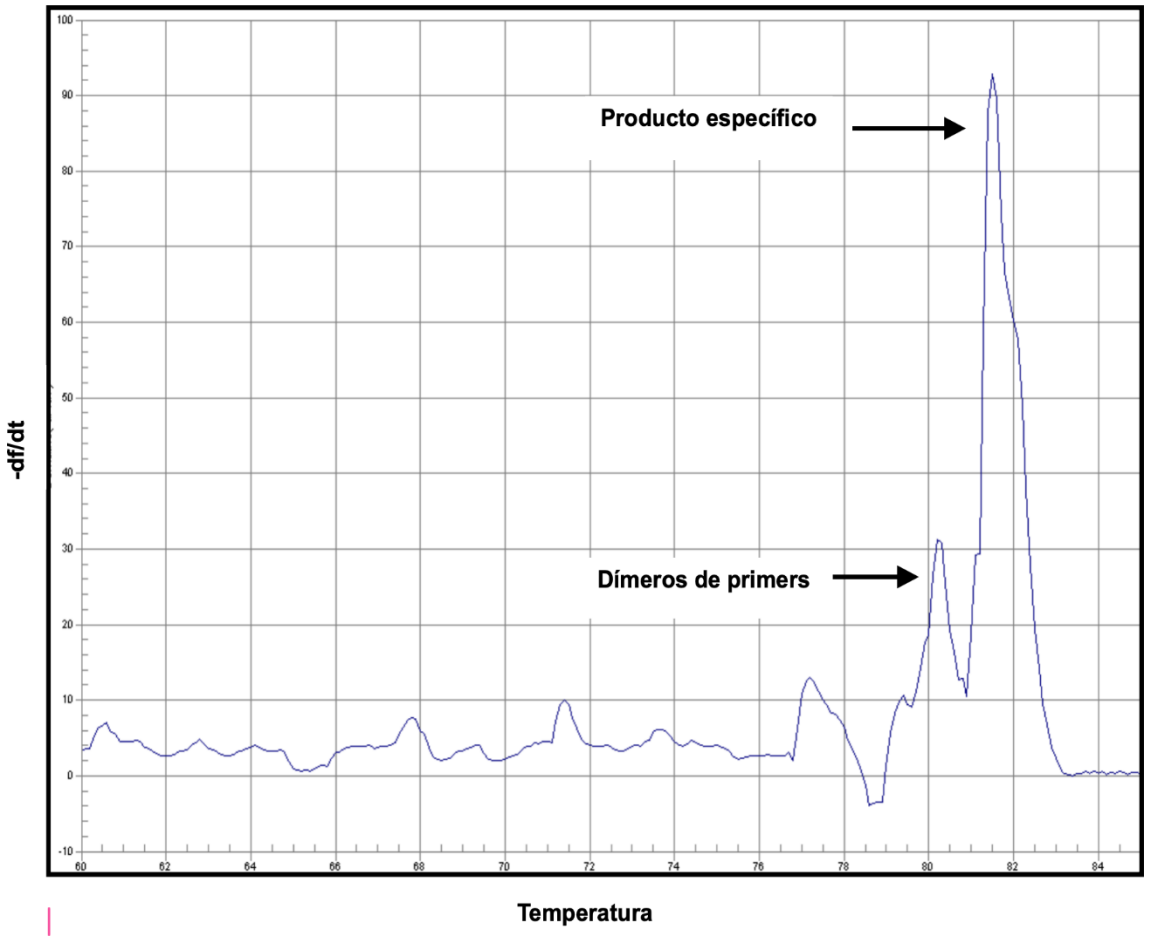

Fig. 13. Gráficos de curvas y picos de fusión de un análisis de Tm con EVA-Green. Muestra de ADNc de FCV8 en 4 diluciones positivas a DWV-B (1/10 a 1/10.000). El gráfico evidencia la fluorescencia de la muestra frente a la temperatura. Cuando aumenta la temperatura hay un descenso de la señal fluorescente. Las 2 hebras del amplicón se separan para formar ADN monocatenario, lo que hace que el tinte intercalante fluorescente se disocie del ADN y deje de emitir fluorescencia. Las muestras sin importar que tipo de dilución presenta refleja una Tm entre 83° y 83,5°, evidenciando ninguna diferencia significativa.

5. CONCLUSIONES

En este estudio, se logró poner a punto una PCR en tiempo real para poder diferenciar

las variantes de DWV. Con esta metodología se analizaron 52 muestras de zonas específicas de tres provincias (Buenos Aires, Entre Ríos y Córdoba). De las 52 muestras analizadas, 12 resultaron positivas para el virus de las alas deformadas (23%), 6 confirmadas como la variante A (11,5%),4 como la variante B (7,69%) y 2 coinfecciones (3,84%).

Los resultados revelan que 16 de las 19 muestras obtenidas de la zona del Gran La Plata tuvieron la particularidad de resultar negativas a los 7 virus estudiados, y solamente tres colmenas resultaron positivas para DWV (FCV7, FCV8, FCV9). Por otro lado, de las 14 colmenas analizadas de Entre Ríos, 7 resultaron positivas para el virus de DWV. Las 2 muestras procesadas de Córdoba (C2 y C4) fueron positivas. En este sentido, a partir de las muestras positivas para DWV se pudo diseñar un protocolo de q-PCR diseñado y, posteriormente, concluir la presencia de las variantes DWV-A (C2, E8, E10, E14, FCV9), DWV-B (E11, E12, E13, FCV8) y dos coinfecciones posibles (FCV7, E9). Solo la colmena FCV8 presentó signos clínicos compatibles con despoblamiento, una de las características propias de la variante B del virus de las alas deformadas, lo cual se correlaciona con la hipótesis de que la variante B es más patógena.

Estudios recientes han reportado un aumento a nivel mundial de casos de DWV-B, si bien en nuestro estudio no se evidenció una diferencia significativa entre estas dos variantes, reportes previos de nuestro país indican que la variante A era la más prevalente, lo que nos permite concluir que los casos de DWV-B han aumentado en los últimos años (Salina *et al.*, 2021).

Por otro lado, las muestras que fueron positivas a ambas variantes en nuestro estudio, podrían deberse a la presencia de una coinfección por las variantes A y B o a la infección por la presencia de DWV-C (recombinación de A y B) o incluso la aparición de una nueva variante. Para poder determinar si estas dos muestras son coinfecciones o una recombinación, a futuro estas muestras serán enviadas a secuenciar. Una continua vigilancia permitirá ver la evolución de posibles infecciones, especialmente teniendo en consideración que la variante DWV-C nunca ha sido reportada en este país (Reynaldi *et al.,* 2010).

Teniendo en cuenta el número de colmenas seleccionadas y la proporción de muestras positivas diagnósticas, se puede teorizar que la presencia de DWV y sus variantes en Argentina es más baja en relación a reportes previos realizados en nuestro país (Quintana *et al*., 2019, Salina *et al*., 2021). Existen varias alternativas que pudieran explicar esta baja frecuencia de detección. Por un lado, los cambios en temperatura ambiente que afectan de manera directa e indirecta, no solo a las abejas sino a otros

insectos y al medio ambiente en que se relacionan. El efecto de estos cambios térmicos sobre el ciclo de crecimiento de las propias plantas, variaciones en la calidad de los alimentos e incluso la aparición con otros seres vivos influyen sumamente de manera negativa (Rahimi *et al*., 2024). Estos factores deben tenerse en cuenta no solo en este virus sino para todos los patógenos que afectan a las abejas. Un claro ejemplo, es el hecho de que las muestras obtenidas del Buenos Aires hayan sido en su mayoría negativas. Las temperaturas reportadas durante el verano 2022-2023, previo al muestreo de las colmenas, batió el récord de más de 100 años con un promedio de 25.6°C diario (SMS 2024). Algunos estudios han demostrado, que las temperaturas superiores a la temperatura óptima de cría (32°C) reducen las cargas virales de DWV pudiendo generar estos resultados (Xu *et al.,* 2025).

La relación con el ácaro *Varroa destructor* y la función que cumplen en la transmisión con DWV, es otra cuestión a tener en cuenta. En este estudio se observó que la colmena FCV8 que presentó los más altos niveles de infestación de Varroa, fue una de las tres colonias de abejas en las que se detectaron ambas variantes, particularmente esta colonia finalmente colapsó.

El hecho que sea de conocimiento en la mayoría de los apicultores, la necesidad de prácticas de manejo para el tratamiento con acaricidas cada año, ha determinado que las colonias muestreadas en este estudio (colonias tratadas durante años contra Varroa), ha favorecido un bajo porcentaje de infestación por el ácaro. Sin embargo, es sabido que la ausencia de este ácaro no impide la presencia de DWV (Salina *et al*., 2023). Más estudios relacionados con la presencia del virus y su relación con Varroa son necesarios para poder comenzar a comprender la patogenicidad de las distintas variantes de DWV en colonias de abejas.

6. ANEXOS

Anexo 1

PROTOCOLOS ENZIMAS TAQ TAQ T-PLUS K-1000

(Inbio Highway)

Agua libre	14 ul
Buffer	2,5 ul
ClMg	1,5 ul
dNTPS	0,5 ul
Primers Forward	0,5 ul
Primers Reverse	0,5 ul
TAQ	0,25 ul
Molde	5 ul
Volumen total:	**25 ul**

Anexo 2

PROTOCOLO DE DETECCIÓN DE VARIANTES A, B Y C

1. Forward Universal DWV + Reverse A + Reverse B
2. Forward Universal DWV + Reverse A
3. Forward Universal DWV + Reverse B
4. Forward Universal DWV + Reverse A + Reverse B (Control negativo)

1.

Mezcla real	10 ul
Molde	3 ul
Primers Forward	0,5 ul
Primers Reverse A	0,5 ul
Primers Reverse B	0,5 ul
Agua ultrapura libre de nucleasas	5,5 ul

Volumen total:	**20 ul**

2.

Mezcla real	10 ul
Molde	3 ul
Primers Forward	0,5 ul
Primers Reverse A	0,5 ul
Agua ultrapura libre de nucleasas	6 ul

_____

Volumen total:	**20 ul**

3.

Mezcla real	10 ul
Molde	3 ul
Primers Forward	0,5 ul
Primers Reverse B	0,5 ul
Agua ultrapura libre de nucleasas	6 ul

_____

Volumen total:	**20 ul**

4.

Mezcla real	10 ul
Primers Forward	0,5 ul
Primers Reverse A	0,5 ul
Primers Reverse B	0,5 ul
Agua ultrapura libre de nucleasas	8,5 ul

_____

Volumen total:	**20 ul**

7. REFERENCIAS

Bailey L, Ball B. V. 1991. Honey bee pathology. 2° Ed. reimp. California, Academic Press.

Barron A. B. 2015. Death of the bee hive: understanding the failure of an insect society. Current opinion in insect science, 10, 45–50. https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.04.004

Blitzer E. J, Dormann C. F, Holzschuh A, Klein A. M, Rand T. A, Tscharntke T. 2012. Spillover of functionally important organisms between managed and natural habitats. Agriculture, Ecosystems & Environment, 146(1), 34-43. https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.09.005

Bowen-Walker P. L, Martin S. J, 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

Brasesco C, Quintana S, Di Gerónimo V, Genchi García M. L, Sguazza G, Bravi M. E, Fargnoli L, Reynaldi F. J, Eguaras M, Maggi M 2021. Deformed wing virus type a and b in managed honeybee colonies of Argentina. Bulletin of entomological research, 111(1), 100–110. https://doi.org/10.1017/ S000748532000036X

Brettell L. E, Mordecai G. J, Schroeder D. C, Jones I. M, da Silva J. R, Vicente-Rubiano M, Martin S. J. 2017. A Comparison of Deformed Wing Virus in Deformed and Asymptomatic Honey Bees. Insects, 8(1), 28. https://doi.org/10.3390/insects8010028

Bromenshenk J. J, Henderson C. B, Wick C. H, Stanford M. F, Zulich A. W, Jabbour R. E, Deshpande S. V, McCubbin P. E, Seccomb R. A, Welch P. M, Williams T, Firth D. R, Skowronski E, Lehmann M. M, Bilimoria S. L, Gress, J, Wanner K. W, Cramer R. A. 2010. Iridovirus and microsporidian linked to honey bee colony decline. PloS one, 5(10), e13181. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013181

Brutscher L. M, McMenamin A. J, Flenniken M. L. 2016. The Buzz about Honey Bee Viruses. PLoS pathogens, 12(8), e1005757. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005757

Casadevall A, Pirofski L. A. 1999. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. Infection and immunity, 67(8), 3703–3713. https://doi.org/10.1128/ IAI.67.8.3703-3713.1999

Chen Y, Evans J, Feldlaufer M. 2006. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, Apis mellifera. Journal of invertebrate pathology, 92(3), 152–159. https://doi.org/10.1016/ j.jip.2006.03.010

Chen Y. P, Siede R. 2007. Honey bee viruses. Advances in virus research, 70, 33–80. https://doi.org/ 10.1016/S0065-3527(07)70002-7

Clarke D, Morley E, Robert D. 2017. The bee, the flower, and the electric field: electric ecology and aerial electroreception. Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology, 203(9), 737–748. https://doi.org/10.1007/s00359-017-1176-6

Clayton D. H, Tompkins D. M. 1994. Ectoparasite virulence is linked to mode of transmission. Proceedings. Biological sciences, 256(1347), 211–217. https://doi.org/10.1098/rspb.1994.0072

Conlon B. H, Aurori A, Giurgiu A. I, Kefuss J, Dezmirean D. S, Moritz R. F. A, Routtu J. 2019. A gene for resistance to the Varroa mite (Acari) in honey bee (Apis mellifera) pupae. Molecular ecology, 28(12), 2958–2966. https://doi.org/10.1111/mec.15080

Cory J. S, Franklin M. T. 2012. Evolution and the microbial control of insects. Evolutionary applications, 5(5), 455–469. https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2012.00269.x

Cornman R. S, Tarpy D. R, Chen Jeffreys L, Lopez D, Pettis J. S., vanEngelsdorp D, Evans J. D. 2012. Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. PloS one, 7(8), e43562. https://doi.org/10.1371/ journal.pone.0043562

Cressler C. E, McLeod D. V, Rozins C, Van Den Hoogen J, Day T. 2016. The adaptive evolution of virulence: a review of theoretical predictions and empirical tests. Parasitology, 143(7), 915–930. https:// doi.org/10.1017/S003118201500092X

Daszak P, Cunningham A. A, Hyatt A. D. 2001. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. Acta tropica, 78(2), 103–116. https://doi.org/10.1016/ s0001-706x(00)00179-0

Daughenbaugh K. F, Martin M, Brutscher L. M, Cavigli I, Garcia E, Lavin M, Flenniken M. L. 2015.
Honey Bee Infecting Lake Sinai Viruses. Viruses, 7(6), 3285–3309. https://doi.org/10.3390/v7062772

de Miranda J. R, Cordoni G, Budge G. 2010. The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. Journal of invertebrate pathology, 103 Suppl 1, S30–S47. https://doi.org/ 10.1016/j.jip.2009.06.014

de Miranda J. R, Brettell L. E, Chejanovsky N, Childers A. K, Dalmon A, Deboutte W, de Graaf D. C, Doublet V, Gebremedhn H, Genersch E, Gisder S, Granberg F, Haddad N. J, Kaden R, Manley

R, Matthijnssens J, Meeus I, Migdadi H, Milbrath M. O, Mondet F, Ball B. V. 2022. Cold case: The disappearance of Egypt bee virus, a fourth distinct master strain of deformed wing virus linked to honeybee mortality in 1970's Egypt. Virology journal, 19(1), 12. https://doi.org/10.1186/ s12985-022-01740-2

Dubois E, Dardouri M, Schurr F. M, Cougoule N, Sircoulomb F, Thiery, R. 2019. Outcomes of honeybee pupae inoculated with deformed wing virus genotypes A and B. Apidologie, 51, 18-34. https://doi.org/ 10.1111/imb.12948

Domingo E, Perales C. 2019. Viral quasispecies. PLoS genetics, 15(10), e1008271. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008271

Engel M. S. 2001. Monophyly and extensive extinction of advanced eusocial bees: insights from an unexpected Eocene diversity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(4), 1661–1664. https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1661

Ewa Fei D, Guo Y, Fan Q, Li M, Sun L, Ma M, Li Y. 2020. Codon optimization, expression

in Escherichia coli, and immunogenicity analysis of deformed wing virus (DWV) structural protein. PeerJ, 8, e8750. https:// doi.org/10.7717/peerj.8750

Fontaine C, Dajoz I, Meriguet J, Loreau M. 2006. Functional diversity of plant-pollinator interaction webs enhances the persistence of plant communities. PLoS biology, 4(1), e1. https:// doi.org/10.1371/ journal.pbio.0040001

Fries I, Camazine S. 2001. Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. Apidologie, 32, 199-214. https://doi.org/10.1051/apido:2001122

Gisder S, Möckel N, Eisenhardt D, Genersch E. 2018. In vivo evolution of viral virulence: switching of deformed wing virus between hosts results in virulence changes and sequence shifts. Environmental microbiology, 20(12), 4612–4628. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14481

Goulson D, Lye G. C, Darvill B. 2008. Decline and conservation of bumble bees. Annual review of entomology, 53, 191–208. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093454

Goulson D, Nicholls E, Botías C, 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

Grassly N. C, Fraser C. 2008. Mathematical models of infectious disease transmission. Nature reviews. Microbiology, 6(6), 477–487. https://doi.org/10.1038/nrmicro1845

Graystock P, Yates K, Evison S.E.F, Darvill B, Goulson D, Hughes W.O.H. 2013. The Trojan hives: pollinator pathogens, imported and distributed in bumblebee colonies. J. Appl. Ecol. 50, 1207e1215. https://doi.org/10.1111/1365-2664.12134

Graystock P, Blane E. J, McFrederick Q. S, Goulson D, Hughes W. O. H. 2015. Do managed bees drive parasite spread and emergence in wild bees?. International journal for parasitology. Parasites and wildlife, 5(1), 64–75. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.10.001

Griffiths D. A, Needham G. R, Page R. E, Delfinado-Baker M, Bowman C. E. 1988. Functional morphology of the mouthparts of Varroa jacobsoni and Tropilaelaps clareae as a basis for the interpretation of their lifestyles. Chichester, UK, Ellis Horwood.

Grozinger C. M, Flenniken M. L. 2019. Bee Viruses: Ecology, Pathogenicity, and Impacts. Annual review of entomology, 64, 205–226. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011118-111942

Hajek A. E, Shapiro-Ilan D. I. 2018. Ecology of invertebrate diseases. 1st edition. Hoboken, New Jersey, USA, John Wiley & Sons.

Hatcher M, Dunn A, 2011. Parasites in Ecological Communities. Cambridge University Press. https:// doi.org/10.1111/sjtg.12018

Häußermann C. K, Ziegelmann B, Rosenkranz P. 2016. Spermatozoa capacitation in female
Varroa destructor and its influence on the timing and success of female reproduction. Experimental & applied acarology, 69(4), 371–387. https://doi.org/10.1007/s10493-016-0051-4

Hung K. J, Kingston J. M, Albrecht M, Holway D. A, Kohn J. R. 2018. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proceedings. Biological sciences*, *285*(1870), 20172140. https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2140

Johnson R. M, Evans J. D, Robinson G. E, Berenbaum M. R. 2009. Changes in transcript abundance relating to colony collapse disorder in honey bees (Apis mellifera). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(35), 14790–14795. https:// doi.org/10.1073/ pnas.0906970106

Kelly D. W, Paterson R. A, Townsend C. R, Poulin R, Tompkins D. M. 2009. Parasite spillback: a neglected concept in invasion ecology?. Ecology, 90(8), 2047–2056. https://doi.org/10.1890/08-1085.1

Kerr J. T, Pindar A, Galpern P, Packer L, Potts S. G, Roberts S. M, Rasmont P, Schweiger O, Colla S. R, Richardson L. L, Wagner D. L, Gall L. F, Sikes D. S, Pantoja

A. 2015. Climate change impacts on bumblebees converge across continents. Science (New York, N.Y.), 349(6244), 177–180. https:// doi.org/10.1126/science.aaa7031

Kevill J. L, de Souza F. S, Sharples C, Oliver R, Schroeder D. C, 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, Tscharntke T. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proceedings. Biological Id P. W. 1994. Evolution of infectious disease. 1° Ed. New York, Oxford University Press sciences, 274(1608), 303–313. https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721

Larsen A.E, Reynaldi F.J, Guzman-Novoa E. 2019. Bases del sistema inmune de la abeja melífera (Apis mellifera). Revisión. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. https://doi.org/0.22319/ rmcp.v10i3.4785

Le Conte Y, Navajas M. 2008. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics), 27(2), 485–510. https://doi.org/10.20506/ rst.27.2.1819

Lederberg J, Shope R. E, Oaks S. C Jr. 1992. Emerging Infections: Microbial Threats to Health in the United States. National Academies Press (US). https://wwwnc.cdc.gov/eid/pdfs/lederburg- report-2008.pdf [Consultado 02/02/2025].

Loope K. J, Baty J. W, Lester P. J, Wilson Rankin E. E. 2019. Pathogen shifts in a honeybee predator following the arrival of the Varroa mite. Proceedings of the Royal Society B, 286(1894), 20182499. https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2499

Mandell G. L, Douglas Jr R. G, Bennett J. E. 1979. Principles and practice of infectious diseases. Volumes 1 and 2. John Wiley & Sons. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70089-X

Martin S. J. 2001. The role of Varroa and viral pathogens in the collapse of honeybee

colonies: a modelling approach. Journal of Applied Ecology, 38(5), 1082-1093. https://doi.org/10.1046/ j.13652664.2001.00662.x

Martin S. J, 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, Botías C, Bailón E. G, Martínez-Salvador A, Prieto, L, Meana A, Higes M. 2012. Microsporidia infecting Apis mellifera: coexistence or competition. Is Nosema ceranae replacing Nosema apis?. Environmental microbiology, 14(8), 2127–2138. https://doi.org/10.1111/ j.1462-2920.2011.02645.x

McArt S. H, Koch H, Irwin R. E, Adler L. S. 2014. Arranging the bouquet of disease: floral traits and the transmission of plant and animal pathogens. Ecology letters, 17(5), 624–636. https:// doi.org/10.1111/ ele.12257

McCallum H, Dobson A. 2002. Disease, habitat fragmentation and conservation. Proceedings.
Biological sciences, 269(1504), 2041–2049. https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2079

McMahon D. P, Wilfert L, Paxton R. J, Brown M. J. F. 2018. Emerging Viruses in Bees: From Molecules to Ecology. *Advances in virus research*, *101*, 251–291. https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.02.008

McMenamin A. J, Genersch E. 2015. Honey bee colony losses and associated viruses. Current opinion in insect science, 8, 121–129. https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.01.015

McMenamin A. J, Brutscher L. M, Glenny W, Flenniken M. L. 2016. Abiotic and biotic factors affecting the replication and pathogenicity of bee viruses. Current opinion in insect science, 16, 14–21. https:// doi.org/10.1016/j.cois.2016.04.009

Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. 2013. Viruses with Single-Stranded, Positive-Sense RNA Genomes. Molecular Virology, 185–349. https://doi.org/10.1007/978-3-642-20718-1_14

Moore J, Jironkin A, Chandler D, Burroughs N, Evans D. J, Ryabov E. V. 2011. Recombinants between Deformed wing virus and Varroa destructor virus-1 may prevail in Varroa destructor-infested https:// doi.org/10.1099/vir.0.025965-0

Mordecai G. J, Wilfert, L, Martin S. J, Jones I. M, Schroeder D. C. 2016a. 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

Mordecai G. J, Brettell L. E, Martin S. J, Dixon D, Jones I. M, Schroeder D. C. 2016b. Superinfection exclusion and the long-term survival of honey bees in Varroa-infested colonies. The ISME journal, 10(5), 1182–1191. https://doi.org/10.1038/ismej.2015.186

Nicholls E, Hempel de Ibarra N. 2017, Assessment of pollen rewards by foraging bees. Funct Ecol, 31: 76-87. https://doi.org/10.1111/1365-2435.12778

Norton A. M, Remnant E. J, Buchmann G, Beekman, M. 2020. Accumulation and Competition Amongst Deformed Wing Virus Genotypes in Naïve Australian Honeybees Provides Insight Into the Increasing Global Prevalence of Genotype B. Frontiers in microbiology, 11, 620. https://doi.org/10.3389/ fmicb.2020.00620

Ollerton J. 2017. Pollinator diversity: distribution, ecological function, and conservation. Annual review of ecology, evolution, and systematics, 48(1), 353-376. https://doi.org/10.1146/annurev- ecolsys-110316-022919

Ongus J. R, Peters D, Bonmatin J. M, Bengsch E, Vlak J. M, 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

Organtini L. J, Shingler K. L, Ashley R. E, Capaldi E. A, Durrani K, Dryden K. A, Makhov A. M, Conway J. F, Pizzorno, M. C, Hafenstein S. 2017. Honey Bee Deformed Wing Virus Structures Reveal that Conformational Changes Accompany Genome Release. Journal of virology, 91(2), e01795-16. https:// doi.org/10.1128/JVI.01795-16

Peck D. T, 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

Perlman S. J, Jaenike J. 2003. Infection success in novel hosts: an experimental and phylogenetic study of Drosophila-parasitic nematodes. Evolution; international journal of organic evolution, 57(3), 544–557. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb01546.x

Plettner E, Eliash N, Singh N.K, Pinnelli G.R, Soroker V, 2017. The chemical ecology of host-parasite interaction as a target of Varroa destructor control agents. *Apidologie*, *48*, pp.78-92.. https://doi.org/ 10.1007/s13592-016-0452-8

Posada-Florez F, Ryabov E. V, Heerman M. C, Chen Y, Evans J. D, Sonenshine D. E, Cook, S. C. 2020. Varroa destructor mites vector and transmit pathogenic honey bee viruses acquired from an artificial diet. PloS one, 15(11), e0242688. https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110316-022919

Potts S. G, Biesmeijer J. C, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin W. E. 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. Trends in ecology & evolution, 25(6), 345–353. https://doi.org/ 10.1016/j.tree.2010.01.007

Power K, Martano M, Altamura G, Piscopo N, Maiolino P. 2021. Histopathological Features of Symptomatic and Asymptomatic Honeybees Naturally Infected by Deformed Wing Virus. Pathogens (Basel, Switzerland), 10(7), 874. https://doi.org/10.3390/pathogens10070874

Quintana S, Brasesco C, Porrini L. P, Di Gerónimo V, Eguaras M. J, Maggi M. 2019. First molecular detection of *Apis mellifera* filamentous virus (AmFV) in honey bees (*Apis mellifera)* in Argentina. *Journal of Apicultural Research*, *60*(1), 111–114. https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1690100

Rader R, Bartomeus I, Garibaldi L. A, Garratt M. P, Howlett B. G, Winfree R, Cunningham S. A, Mayfield M. M, Arthur A. D, Andersson G. K, Bommarco R, Brittain C, Carvalheiro L.G, Chacoff N. P, Entling M. H, Foully B, Freitas B. M, Gemmill-Herren B, Ghazoul J, Griffin S. R, Woyciechowski M. 2016. Non-bee insects are important contributors to

global crop pollination. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 113(1), 146–151. https://doi.org/10.1073/pnas.1517092112

Rahimi E, Jung C. 2024. Global Trends in Climate Suitability of Bees: Ups and Downs in a Warming World. *Insects*, *15*(2), 127. https://doi.org/10.3390/insects15020127

Ramsey S. D, Ochoa R, Bauchan G, Gulbronson C, Mowery J. D, Cohen A, Lim D, Joklik J, Cicero J.M. Ellis J. D, Hawthorne D, vanEngelsdorp D. 2019. Varroa destructor feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 116(5), 1792–1801. https://doi.org/10.1073/pnas.1818371116

Ravoet J, Maharramov J, Meeus I, De Smet L, Wenseleers T, Smagghe G, de Graaf D. C. 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

Reynaldi F. J, Sguazza G. H, Pecoraro M. R, Tizzano M. A, Galosi C. M. 2010. First report of viral infections that affect argentine honeybees. Environmental microbiology reports, 2(6), 749–751. https://doi.org/10.1111/j.17582229.2010.00173

Roth M. A, Wilson J. M, Tignor K. R, Gross A. D. 2020. Biology and management of Varroa destructor (Mesostigmata: Varroidae) in Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Journal of Integrated Pest Management*, *11*(1), 1. https://doi.org/10.1093/jipm/pmz036

Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B. 2010. Biology and control of Varroa destructor. Journal of invertebrate pathology, 103 Suppl 1, S96–S119. https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016

Ruiz V. A, Guillén S. M. 2006. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 1 Edición. Madrid, Médica Panamericana.

Ruiz-González M. X, Bryden J, Moret Y, Reber-Funk C, Schmid-Hempel P, Brown M. J. 2012. Dynamic transmission, host quality, and population structure in a multihost parasite

of bumblebees. Evolution; international journal of organic evolution, 66(10), 3053–3066. https://doi.org/10.1111/ j.1558-5646.2012.01655.x

Ryabov E. V, Wood G. R, Fannon J. M, Moore J. D, Bull J. C, Chandler D, Mead A, Burroughs N, 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

Salina M. D, Garcia M. L. G, Bais B, Bravi M. E, Brasesco C, Maggi M, Pecoraro M, Larsen A, Sguazza H. G, Reynaldi, F. J. 2021. Viruses that affect Argentinian honey bees (Apis mellifera). Archives of virology, 166(6), 1533–1545. https://doi.org/10.1007/s00705-021-05000-6

Salina M. D, Vega M, Bravi M. E, Bais B, Sguazza H. 2023. Fluctuación de la prevalencia viral en relación a Varroa destructor, *EUNK Revista Científica de Abejas y Apicultores*, 1(2), pp. 3–11. https:// doi.org/10.52559/eunk.v1i2.25

Schmid-Hempel P (2021). *Evolutionary Parasitology: The Integrated Study of Infections, Immunology, Ecology, and Genetics*. 2nd edition.. Oxford, Oxford University Press.

Secretaría de Política Económica - Subsecretaría de Programación Microeconómica. Ministerio de Hacienda - Presidencia de la Nación. 2018. Informes de cadenas de valor. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/sspmicro_cadenas_de_valor_apicola.pdf [Consultado 03/07/2024].

Sguazza G. H, Reynaldi F. J, Galosi C. M, Pecoraro M. R. 2013. Simultaneous detection of bee viruses by multiplex PCR. Journal of virological methods, 194(1-2), 102–106.https://doi.org/10.1016/ j.jviromet.2013.08.003

Sánchez-Bayo F, Wyckhuys K. A. 2019. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. Biological conservation, 232, 8-27. https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020

Škubník K, Nováček J, Füzik T, Přidal A, Paxton R. J, Plevka P. 2017. Structure of

deformed wing virus, a major honey bee pathogen. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 114(12), 3210–3215. https://doi.org/10.1073/pnas.1615695114

Tarpy D. R. 2003. Genetic diversity within honeybee colonies prevents severe infections and promotes colony growth. Proceedings. Biological sciences, 270(1510), 99–103. https://doi.org/10.1098/ rspb.2002.2199

Tehel A, Vu Q, Bigot D, Gogol-Döring A, Koch P, Jenkins C, Doublet V, Theodorou P, Paxton R. 2019. The Two Prevalent Genotypes of an Emerging Infectious Disease, Deformed Wing Virus, Cause Equally Low Pupal Mortality and Equally High Wing Deformities in Host Honey Bees. Viruses, 11(2), 114. https://doi.org/10.3390/v11020114

Tittensor D. P, Walpole M, Hill S. L, Boyce D. G, Britten G. L, Burgess N. D, Butchart S. H, Leadley P. W, Regan E. C, Alkemade R, Baumung R, Bellard C, Bouwman L, Bowles-Newark N. J, Chenery A. M, Cheung W. W, Christensen V, Cooper H. D, Crowther A. R, Dixon M. J, Ye Y. 2014. A mid-term analysis of progress toward international biodiversity targets. Science (New York, N.Y.), 346(6206), 241–244. https://doi.org/10.1126/science.1257484

Traniello I. M, Bukhari S. A, Kevill J, Ahmed A. C, Hamilton A. R, Naeger N. L, Schroeder D. C, Robinson G. E. 2020. Meta-analysis of honey bee neurogenomic response links Deformed wing virus type A to precocious behavioral maturation. Scientific reports, 10(1), 3101. https://doi.org/10.1038/ s41598-020-59808-4

Traynor K. S, Mondet F, de Miranda J. R, Techer M, Kowallik V, Oddie M. A. Y, Chantawannakul P, 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

Valles S. M, Chen Y, Firth A. E, Guérin D. M. A, Hashimoto Y, Herrero S, de Miranda J. R, Ryabov E, Ictv Report Consortium. 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Dicistroviridae. The Journal of general virology, 98(3), 355–356. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000756

Vance J. T, Williams J. B, Elekonich M. M, Roberts S. P. 2009. The effects of age and behavioral development on honey bee (Apis mellifera) flight performance. The Journal of experimental biology, 212(Pt 16), 2604–2611. https://doi.org/10.1242/jeb.028100

Van Oers M. M, Asgari S,Johnson K. 2010. Insect virology. Genomics and biology of Iflaviruses. 231-250. Norfolk, Caister Academic Press.

Wagner D. L. 2020. Insect Declines in the Anthropocene. Annual review of entomology, 65, 457–480. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-025151

Whitehorn P. R, Tinsley M. C, Brown M. J, Darvill B, Goulson D. 2011. Genetic diversity, parasite prevalence and immunity in wild bumblebees. Proceedings. Biological sciences, 278(1709), 1195–1202. https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1550

Wilfert L, Long G, Leggett, H. C, Schmid-Hempel P, Butlin R, Martin S. J, Boots M. 2016. Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by Varroa mites. Science (New York, N.Y.), 351(6273), 594–597. https://doi.org/10.1126/science.aac9976

Xie X, Huang Z. Y, Zeng Z. 2016. Why do Varroa mites prefer nurse bees?. Scientific reports, 6, 28228. https://doi.org/10.1038/srep28228

Xu X, Zhou S, Huang J, Geng F, Zhu X, Abou-Shaara H. F. 2025. Influence of Hyperthermia Treatment on Varroa Infestation, Viral Infections, and Honey Bee Health in Beehives. *Insects*, *16*(2), 168. https:// doi.org/10.3390/insects16020168

Yañez O, Piot N, Dalmon A, de Miranda J. R, Chantawannakul P, Panziera D, Amiri E, Smagghe G, Schroeder D, Chejanovsky N. 2020. Bee Viruses: Routes of Infection in Hymenoptera. Frontiers in microbiology, 11, 943. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00943

Zhao Y, Heerman M, Peng W, Evans J. D, Rose R, DeGrandi-Hoffman G, Simone-Finstrom M,

Li J, Li Z, Cook S. C, Su S, Rodríguez-García C, Banmeke O, Hamilton M, Chen Y.

2019. The Dynamics of Deformed Wing Virus Concentration and Host Defensive Gene Expression after Varroa Mite Parasitism in Honey Bees, Apis mellifera. Insects, 10(1), 16. https:// doi.org/10.3390/insects10010016

Zioni N, Soroker V, Chejanovsky N. 2011. Replication of Varroa destructor virus 1 (VDV-1) and a Varroa destructor virus 1-deformed wing virus recombinant (VDV-1-DWV) in the head of the honey bee. Virology, 417(1), 106–112. https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.05.009