


Prevalencia e intensidad de virosis de abejas melíferas (*Apis mellifera*) en seis regiones del estado de Jalisco, México



Ana Karen Ramos-Cuellar ^a

Álvaro De la Mora ^b

Francisca Contreras-Escareño ^c

Nuria Morfin ^d

José María Tapia-González ^e

José Octavio Macías-Macías ^e

Tatiana Petukhova ^{f*}

Adriana Correa-Benítez ^a

Ernesto Guzman-Novoa ^b

^a Universidad Nacional Autónoma de México. FMVZ, Departamento de Medicina y Zootecnia de Abejas. Ciudad de México, México.

^b University of Guelph. School of Environmental Sciences, 50 Stone Road East, Guelph, ON, N1G 2W1, Canadá.

^c Universidad de Guadalajara. CUCSur, Depto. Prod. Agríc., Autlán, Jal., México.

^d University of British Columbia. Dept. Biochem. Mol. Biol., Vancouver, BC, Canadá.

^e Universidad de Guadalajara. CUSur, Depto. Cienc. Natur., Cd. Guzmán, Jal., México.

^f University of Guelph. Department of Population Medicine, Guelph, ON, Canadá.

*Autor de correspondencia: tpetukho@uoguelph.ca

Resumen:

El estado de Jalisco es un importante productor de miel de abejas en México. Sin embargo, no existe información sobre las virosis que afectan a las abejas melíferas (*Apis mellifera*) en las diferentes regiones apícolas de la entidad. El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia e intensidad de cuatro enfermedades virales de *Apis mellifera* durante la primavera, en seis regiones de Jalisco. Se analizaron abejas de 79 colonias, de las cuales, el 66 y 38 % fueron positivas al virus de la celda real negra (VCRN) y al virus de las alas deformes (VAD), respectivamente. Dos virosis no fueron detectadas, las causadas por el virus de la parálisis aguda Israelí (VPAI) y la causada por el virus de la parálisis crónica (VPC). Los niveles de infección fueron relativamente bajos para el VCRN, pero elevados para el VAD, cuyas infecciones fueron 8,000 veces más altas que las del VCRN. La prevalencia del VAD fue significativamente más alta en las regiones de los Altos, Centro y Sur, mientras que para el VCRN no hubo diferencias entre regiones. Para la intensidad de infecciones, no hubo diferencias entre regiones para el VAD, pero sí para el VCRN. Las regiones con niveles de infección más altos fueron la Sur y Centro. Se recomienda realizar muestreos en otras épocas del año para detectar posibles efectos estacionales de las virosis de las abejas y diseñar estrategias para su control.

Palabras clave: *Apis mellifera*, Virus de las alas deformes, Virus de la celda real negra.

Recibido: 15/10/2023

Aceptado: 23/02/2024

Las enfermedades virales de las abejas melíferas (*Apis mellifera*) cada vez se asocian más con pérdidas de colonias⁽¹⁾, por lo que es importante conocer su prevalencia y distribución para poder controlarlas. Se conocen más de 20 virus que infectan a las abejas melíferas, pero pocos parecen tener un impacto serio en su salud. Entre ellos, se puede mencionar al virus de las alas deformes (VAD), virus de la celda real negra (VCRN), virus de la parálisis aguda israelí (VPAI) y virus de la parálisis crónica de las abejas (VPCA)^(2,3). En México se ha reportado la presencia del VAD, VPAI y VCRN^(4,5) en la región del altiplano. Además, se identificó al VAD y VPAI en ácaros *Varroa destructor*, siendo el VAD el de mayor prevalencia tanto en muestras de abejas como de ácaros⁽⁴⁾. Poco se sabe de las enfermedades virales de las abejas en México y el conocimiento de ellas se limita a pocas regiones en pocos estados. Para el caso de Jalisco, aun no existen reportes oficiales de su distribución y niveles de infección en las diferentes regiones apícolas del estado. Conocer esta información sería importante porque Jalisco es uno de los principales estados productores de miel en México, ocupando el tercer lugar en 2021 con 6,073 t⁽⁶⁾.

Para fines de la apicultura, el estado de Jalisco ha sido dividido en seis diferentes regiones que varían en topografía y clima, e incluyen las regiones de los Altos, Centro, Norte, Sierra amula, Sur y Sureste. Más de la mitad de los productores y de las colmenas del estado se encuentran en las regiones Sur y Sureste⁽⁷⁾. Debido a que no existe información sobre la presencia e intensidad de enfermedades virales que afectan a las abejas melíferas en diferentes regiones del estado de Jalisco, se consideró relevante hacer un muestreo para determinar su presencia, y si existe alguna relación entre las virosis y las distintas regiones del estado. Por ello, el objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia y nivel de infección de las principales virosis que afectan a las abejas melíferas adultas: VAD, VCRN, VPAI y VPC, en muestras de abejas provenientes de colonias de seis regiones del estado de Jalisco, México.

Se colectaron muestras de abejas adultas de entre 12 y 16 colonias en cada una de las seis regiones apícolas de Jalisco al inicio de la primavera, durante los meses de marzo, abril y mayo de 2018. En cada apiario visitado se seleccionaron y muestrearon tres colonias al azar. En total se muestrearon 81 colonias de 27 apiarios, aunque sólo se pudieron obtener datos de 79. De cada colonia se colectaron dos muestras de tres abejas tomadas de la piquera de cada colmena. Las abejas se introdujeron en tubos de microcentrífuga de 2.0 ml con RNAlater® (Thermo Scientific; Mississauga, ON, Canadá) para la preservación del ARN viral. Las muestras se transportaron en hieleras con refrigerantes y se congelaron a -70° C hasta que se realizó el diagnóstico y cuantificación de las enfermedades virales.

Los análisis moleculares para el diagnóstico y cuantificación de las virosis se realizaron en el Laboratorio de Investigaciones de Abejas Melíferas de la Escuela de Ciencias Ambientales de la Universidad de Guelph, en Guelph, Ontario, Canadá.

Se determinó la presencia del VAD, VCRN, VPAI y VPCA mediante PCR con transcripción en reversa (RT-PCR). Para ello, se realizó la extracción de ARN de tres abejas por muestra con TRIzol (Fisher Scientific; Mississauga, ON, Canadá), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN complementario se obtuvo con un kit de síntesis de ADNc de RevertAid™ H Minus First Strand (Fermentas; Burlington, ON, Canadá), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las reacciones de PCR se hicieron en un termociclador Mastercycler (Eppendorf; Mississauga, ON, Canadá). Cada reacción contenía 1.5 µl de 10x amortiguador de pH para PCR (New England BioLabs; Pickering, ON, Canadá), 1 µl de oligonucleótidos directos y de reversa (10 mM), 0.2 µl 5U/µl de Taq polimerasa (New England BioLabs; Pickering, ON, Canadá), 2 µl DNAc y 8.8 µl de DEPC-dH₂O. Las secuencias de cebadores y los ciclos de amplificación fueron los descritos en trabajos previos para el VAD^(4,8), VCRN⁽⁹⁾, VPAI⁽¹⁰⁾ y VPCA⁽¹¹⁾. Los productos de la PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa y las bandas amplificadas fueron capturadas con una cámara digital bajo luz UV. Además, se

determinó el número de copias de VAD y VCRN con PCR en tiempo real (qRT-PCR). Los demás virus no fueron cuantificados por no haber sido detectados en las muestras procesadas mediante RT-PCR. La curva estándar de calibración tanto para el VAD como para el VCRN se creó utilizando un fragmento de gen sintético gBlock® (Integrated DNA technologies; Coralville, IO, EUA) de 300 pb para cada uno. Los liofilizados de los genes sintéticos (500 ng) se diluyeron con 50 µl de dH₂O libre de nucleasas para obtener una concentración inicial de 10 ng/µl que se utilizó para hacer diluciones en serie de 10⁹ a 10² número de copias de VAD y de VCRN.

Las reacciones de qRT-PCR se realizaron en un Termociclador BioRad CFX96™ (Bio-Rad Laboratories; Mississauga, ON, Canadá), con PowerUp™ SYBRgreen™ (Supermix 2X) (Applied Biosystems; Foster City, CA, EUA), en placas para PCR de 96 pozos Hard-Shell® (BioRad Laboratories; Mississauga, ON, Canadá). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µl que contenían las siguientes mezclas. Para el VAD, 10 µl de Supermix 2X (Applied Biosystems; Foster City, CA, EUA), 0.4 µl de oligonucleótidos directo y de reversa (200nM), 7.2 µl de dH₂O libre de nucleasas (Invitrogen; Burlington, ON, Canadá) y 2 µl de ADNc o las diluciones del gen sintético. Para el VCRN, 10 µl de Supermix 2X (Applied Biosystems; Foster City, CA, EUA), 0.8 µl de oligonucleótidos directo y de reversa (400nM), 6.4 µl de dH₂O libre de nucleasas (Invitrogen; Burlington, ON, Canadá) y 2 µl de ADNc o las diluciones del gen sintético. Las secuencias de oligonucleótidos y ciclos de amplificación fueron los descritos en trabajos previos para el VAD⁽¹²⁾ y para el VCRN⁽¹³⁾.

El software del termociclador proporcionó el cálculo de la eficiencia, el coeficiente de determinación (R²) y la pendiente de la curva estándar del ARN viral. Para determinar la cantidad de ARN viral en las diluciones seriadas se utilizó la siguiente fórmula:

Números copias de ARN viral = (ng del fragmento de gen sintético) (6.022x10²³) / (longitud del fragmento de gen sintético) (1x10⁹) (650 D). Donde: 650 D es el peso promedio de un par de bases y 6.022x10²³ es el número de Avogadro⁽¹⁴⁾. Posteriormente, se construyó un gráfico con los valores de Ct frente al número de copias de ARN viral inicial y con una ecuación de regresión lineal se calculó el número de copias virales de VAD y VCRN en las muestras.

Para determinar si hubo diferencias en las prevalencias de las virosis entre regiones, los datos se analizaron con pruebas de comparación de equidad de proporciones usando la corrección de Benjamini-Hochberg. También, antes de analizar y comparar la intensidad de las infecciones, los datos se sometieron a pruebas de Shapiro-Wilk y de Bartlett, para analizar los supuestos de normalidad y homocedasticidad, respectivamente. Los datos no tuvieron una distribución normal o fueron homocedásticos, por lo que, para comparar la carga de las virosis, los datos se transformaron a logaritmo natural y después se sometieron a análisis de varianza. Cuando se detectaron diferencias significativas, se hicieron comparaciones por

pares de regiones con pruebas t de Student y la corrección de Benjamini-Hochberg. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa R 3.3.1 (Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria).

Se detectaron dos virosis en colonias de abejas del estado de Jalisco, las causadas por el VCRN (Figura 1) y el VAD (Figura 2). Dos virosis no fueron detectadas, las causadas por el VPAI y el VPC. De los virus detectados, la prevalencia a nivel estatal del VCRN fue de 66 % y la del VAD de 38 %. La prevalencia e intensidad de las infecciones causadas por los virus diagnosticados se presentan en el Cuadro 1.

Figura 1: Fotografía de un gel de agarosa que muestra bandas de 698 pares de bases del virus de la celda real negra (VCRN) en las columnas 1, 2, 5, 6, 7 y 8. En la reacción de RT-PCR se usa un gen de la abeja como control (RpS5)

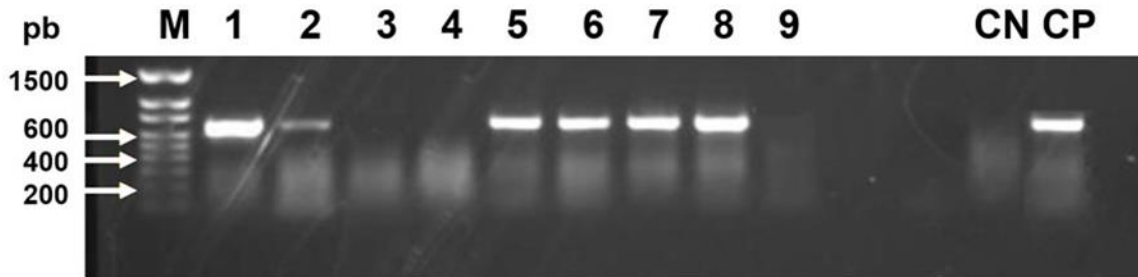
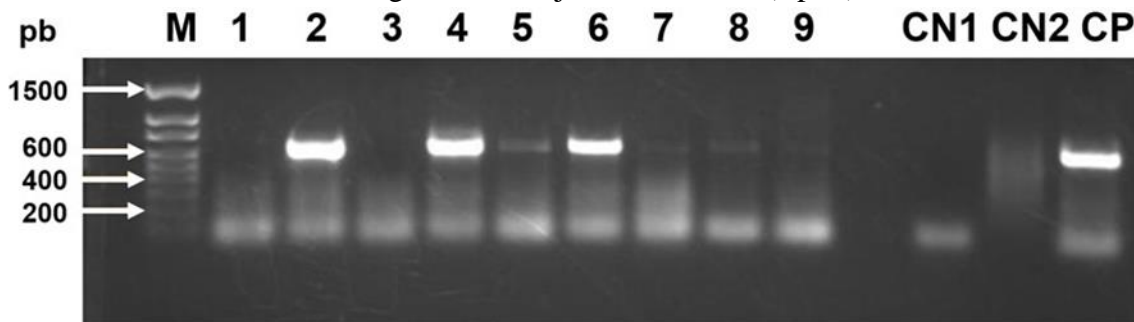


Figura 2: Fotografía de un gel de agarosa que muestra bandas de 642 pares de bases del virus de las alas deformes (VAD) en las columnas 2, 4 y 6. En la reacción de RT-PCR se usa un gen de la abeja como control (RpS5)



Cuadro 1: Prevalencia e intensidad media de infecciones virales que afectan a colonias de abejas melíferas en el estado de Jalisco, México

Patógeno	N	Prevalencia (%)	Intensidad ± E.E. ¹
Virus alas deformes	79	38.0	4,083.40 ± 2,676.05 ¹
Virus celda real negra	79	65.8	0.49 ± 0.23 ³

¹Número de copias virales por µg de ARN x 10⁶

A nivel regional, el VAD tuvo una prevalencia significativamente más baja en las colonias de las regiones Sureste y Norte, con solo 8 %, en comparación con la de las colonias de las regiones Sur, Sierra Amula y Centro ($P < 0.05$, Cuadro 2). Para la intensidad de infecciones causadas por el VAD, no hubo diferencias significativas entre colonias de las diferentes regiones ($F_{5,73} = 0.64$, $P = 0.67$).

Cuadro 2: Prevalencia e intensidad media de infección del virus de las alas deformes (VAD) en obreras adultas de colonias de abejas melíferas en diferentes regiones del estado de Jalisco, México

Región	N	Prevalencia (%)	Intensidad \pm E.E. ¹
Altos	12	33.3 ^{a,b}	368.81 \pm 239.91
Centro	12	66.7 ^a	955.33 \pm 611.20
Sierra Amula	15	60.0 ^a	14,652.31 \pm 13,740.36
Norte	12	8.3 ^b	176.67 \pm 85.12
Sur	16	50.0 ^a	955.19 \pm 476.21
Sureste	12	8.3 ^b	5,778.83 \pm 3,860.24

¹ Número de copias virales por μ g de ARN $\times 10^6$.

^{ab} Literales diferentes indican diferencias significativas basadas en pruebas de comparación de equidad de proporciones con corrección de Benjamini-Hochberg ($P < 0.05$).

El VCRN se detectó en el 42 al 81 % de las colonias de las regiones estudiadas, pero no hubo diferencias significativas en la prevalencia de este virus entre regiones ($P > 0.05$, Cuadro 3). Para la intensidad de las infecciones causadas por el VCRN si se encontraron diferencias significativas entre colonias de distintas regiones ($F_{5,73} = 7.14$, $P < 0.01$). Por ejemplo, la región Sur tuvo colonias con niveles de infección significativamente más altos que los de colonias de las demás regiones, excepto la región Centro, que fue la segunda región con los valores más elevados, mientras que la región Norte fue la de menores niveles de infección. En México existe poca información sobre la presencia de enfermedades virales de las abejas melíferas, ya que hace apenas una década se reportó por primera vez la detección molecular del VCE, VAD, VPAI y VCRN^(4,5) en el altiplano mexicano, pero nada se sabe sobre la prevalencia o intensidad de infección de estas virosis en casi todos los estados del país. En la región norte de México, se reportó la presencia del VAD, VCRN, Virus de Kachemira (VK), VPAI y virus filamentoso (VF) en colonias del estado de Chihuahua, pero no se determinó su prevalencia e intensidad^(15,16). Por lo anterior, los resultados de este estudio son un punto de referencia para futuras investigaciones en las diferentes regiones de importancia apícola de México.

Cuadro 3: Prevalencia e intensidad media de infección del virus de la celda real negra (VCRN) en obreras adultas de colonias de abejas melíferas en diferentes regiones del estado de Jalisco, México

Región	N	Prevalencia (%)	Intensidad \pm E.E. ¹
Altos	12	41.7	0.12 \pm 0.07 ^{b,c}
Centro	12	66.7	0.37 \pm 0.21 ^{a,b}
Sierra Amula	15	66.7	0.06 \pm 0.05 ^{c,d}
Norte	12	58.3	0.02 \pm 0.01 ^d
Sur	16	81.2	1.94 \pm 1.08 ^a
Sureste	12	75.0	0.03 \pm 0.01 ^d

¹ Número de copias virales por μ g de ARN \times 10⁶.

^{abcd} Literales diferentes indican diferencias significativas basadas en análisis de varianza y pruebas t con corrección de Benjamini-Hochberg ($P < 0.05$) de datos transformados a logaritmo natural

En otros países del continente americano se han reportado varios virus con prevalencias variables. Sin embargo, la mayoría tienen en común al VAD y al VCRN como los virus más prevalentes. Por ejemplo, en Uruguay, el 100 % de las colonias analizadas presentaron VAD y VCRN^(17,18). En Argentina y Chile, el virus más prevalente fue el VAD, el cual se detectó en el 35 y 37 % de las colonias muestreadas, respectivamente^(19,20). En Cuba, el VAD fue el virus más prevalente, detectado en 91 % de las colonias analizadas, pero no se detectó el VCRN⁽²¹⁾. En Colombia se detectaron el VAD y el VCRN con prevalencias de 19.9 y 10.6 %, respectivamente⁽²²⁾. En cuanto a Norteamérica, en los EUA se comparó la prevalencia de ocho virus durante seis años y en todos los años el VAD se mantuvo como el virus más prevalente dentro de un rango de 65 a 92 %, seguido de cerca por el VCRN, con un rango de 60 a 92 %⁽²³⁾.

En cuanto a intensidad de las infecciones virales, a excepción de algunos trabajos realizados en EUA y Canadá, ningún estudio realizado en países de Centroamérica, el Caribe, o México, ha reportado niveles de infección virales en las abejas a nivel regional de un estado, a diferencia de este estudio, que hasta donde se sabe, es el primero en reportar intensidades de infecciones causadas por virus en las abejas melíferas a nivel regional en México.

Entre las regiones hubo diferencias significativas en las prevalencias de las infecciones virales de colonias de abejas. El VAD fue detectado con una prevalencia significativamente baja de 8 % en colonias de las regiones Sureste y Norte. En contraposición a esta baja prevalencia, en las regiones Sur, Sierra Amula y Centro, la prevalencia del VAD fue mayor al 50 %. En cuanto a la intensidad de la infección causada por el VAD, no hubo diferencias significativas entre las regiones; en todas fue alto en las muestras positivas. Para la virosis causada por el VCRN no se encontraron diferencias significativas en prevalencia entre regiones. Sin embargo, para la intensidad de la infección sí hubo diferencias significativas, con las colonias de la región Sur, presentando niveles de infección más altos de la virosis que

las colonias de las demás regiones, excepto la región Centro. En cuanto a intensidad de infección, los niveles de infección encontrados en este estudio fueron altos para el VAD, con 4083.4×10^6 copias virales por μg de ARN y relativamente bajos para el VCRN con 0.49×10^6 copias virales por μg de ARN. Es decir, la intensidad de las infecciones del VAD en abejas de Jalisco, fue aproximadamente 8,000 veces más alta que la de las infecciones del VCRN.

Algunos de los factores que pudieron haber influido en las diferencias en prevalencia e intensidad viral en las colonias de abejas melíferas entre regiones de Jalisco, se incluyen efectos del entorno, el genotipo de las abejas, y posiblemente cepas diferentes de los virus. En cuanto a efectos climáticos entre regiones de México, se sabe que las infecciones del VAD son más prevalentes y elevadas en colonias ubicadas en zonas de clima templado que en colonias establecidas en clima tropical⁽²⁴⁾. Los autores del estudio citado plantearon que esto ocurre debido a que los climas más fríos favorecen la transmisión y replicación del VAD y pudieran reducir la respuesta inmune de las abejas, lo que las hace más susceptibles al virus. Los autores también plantearon el efecto de la interacción entre el clima y el parasitismo por *V. destructor*, ácaro que está fuertemente relacionado con la prevalencia e intensidad del VAD, ya que no solo sirve de vector del virus, sino que este se multiplica en sus tejidos^(25,26). Por ello, colonias con mayor infestación por *V. destructor* suelen tener prevalencias e intensidades de infección del VAD más altas que colonias con baja infestación del ácaro⁽²⁷⁾. Además, el genotipo de las abejas varía con su grado de africanización. Se ha demostrado que la intensidad de infección causada por el VAD y por el VCRN es más alta en colonias con mitotipo o morfotipo europeo que en colonias con mitotipo o morfotipo africano⁽²⁸⁾. Es posible que las colonias menos infectadas con virosis en este estudio hayan tenido mayor grado de africanización que las más infectadas. Sin embargo, esta hipótesis tendría que ser investigada.

Los elevados niveles de infección del VAD son preocupantes, ya que si los apicultores descuidan las medidas de control de *V. destructor*, la prevalencia e intensidad de las infecciones del VAD podrían aumentar. Se sabe que junto con el parasitismo por *Varroa*, este virus puede debilitar a las colonias hasta ocasionar su colapso⁽¹⁾. Por ello es fundamental hacer hincapié en la importancia de implementar una adecuada estrategia de control de las infestaciones de *V. destructor*, para mantener las infecciones del VAD lo más bajas posible en las colonias de abejas. En cuanto al VCRN, aunque tuvo una alta prevalencia, sus niveles de infección fueron bajos. Sin embargo, este estudio fue estacional, por lo que habría que llevar a cabo estudios a lo largo de todo un año y por varios años para confirmar si este es un virus que pudiera representar daños potenciales a la apicultura de Jalisco.

En conclusión, la virosis de las abejas melíferas más prevalente en el estado de Jalisco fue la del VCRN que se detectó en el 66 % de las muestras, mientras que la virosis del VAD, fue detectada en el 38 % de las colonias. Los niveles de infección para el VAD fueron elevados

(8,000 veces más altos que los del VCRN). Las regiones con mayor prevalencia del VAD fueron la Centro, Sur, Altos y Sierra amula. En cuanto a la intensidad de infecciones del VAD, no hubo diferencias significativas entre regiones. Para la prevalencia del VCRN tampoco hubo diferencias significativas entre regiones, pero si las hubo para la intensidad de infección. Las regiones con niveles de infección más altos fueron la Sur y Centro. Se recomienda llevar a cabo estudios adicionales con muestreos en varias estaciones del año y por varios años, para conocer bajo que condiciones y épocas, las virosis pudieran ser más dañinas a la apicultura y para diseñar estrategias de control.

Agradecimientos y conflictos de interés

Los autores agradecen a los 42 apicultores que amablemente facilitaron la colecta de las muestras de sus colonias. A Sara Dino, Ulises Nuño, Shaira Alvarado y Miriam Rángel, que ayudaron en la colecta de las muestras. Este estudio fue parcialmente financiado por fondos para la investigación del CUSur otorgados a J.T. y por el fondo Pinchin de la Universidad de Guelph a E.G. Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Literatura citada:

1. Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P. Dead or alive: deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. *Appl Environ Microbiol* 2012;78(4):981-987. <https://doi.org/10.1128/AEM.06537-11>.
2. Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, *et al.* A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 2007;318(5848):283-287. <https://doi.org/10.1126/science.1146498>.
3. Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, *et al.* Colony collapse disorder: a descriptive study. *PloS ONE* 2009;4(8):e6481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>.
4. Guzman-Novoa E, Hamiduzzaman MM, Espinosa-Montaña LG, Correa-Benítez A, Anguiano-Báez R, Ponce-Vázquez R. First detection of four viruses in honey bee (*Apis mellifera*) workers with and without deformed wings and *Varroa destructor* in México. *J Apic Res* 2012;51(4):342-346. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.4.08>.
5. Guzman-Novoa E, Hamiduzzaman MM, Correa-Benítez A, Espinosa-Montaña LG, Uribe-Rubio JL. A scientific note on the first detection of black queen cell virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Mexico. *Apidologie* 2013;44(4):382-384. <https://doi.org/10.1007/s13592-012-0191-4>.

6. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Panorama Agroalimentario, edición 2022. México. 2022: Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural; 2022. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/panorama-agroalimentario-258035>.
7. Contreras-Escareño F, Pérez-Armendáriz B, Echazarreta CM, Cavazos-Arroyo J, Macías-Macías JO, Tapia-González JM. Características y situación actual de la apicultura en las regiones Sur y Sureste de Jalisco, México. *Rev Mex Cienc Pecu* 2013;4(3):387-398.
8. Chen YP, Higgins JA, Feldlaufer MF. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Appl Environ Microbiol* 2005;71(1):436-441. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.436-441.2005>.
9. Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, *et al*. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(12):7185-7191. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7185-7191.2004>.
10. Maori E, Paldi N, Shafir S, Kalev H, Tsur E, Glick E, *et al*. IAPV, a bee-affecting virus associated with Colony Collapse Disorder can be silenced by dsRNA ingestion. *Insect Mol Biol* 2009;18(1):55-60. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00847.x>.
11. Li B, Deng S, Yang D, Hou C, Diao Q. Complete sequences of the RNA 1 and RNA 2 segments of chronic bee paralysis virus strain CBPV-BJ detected in China. *Arch Virol* 2017;162(8):2451-2456. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3373-6>.
12. Di Prisco G, Cavaliere V, Annoscia D, Varricchio P, Caprio E, Nazzi F, *et al*. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *PNAS* 2013;110(46):18466-18471. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314923110>.
13. Chantawannakul P, Ward L, Boonham N, Brown M. A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in varroa mites collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary. *J Invertebr Pathol* 2006;91(1):69-73. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.11.001>.
14. Morfin N, Macías-Macías JO, Guzman-Novoa E. Viral quantification in bee samples using synthetic DNA sequences with Real-Time PCR (qPCR). In: Aquino de Muro M editor. *Virus-Host Interactions: Methods and Protocols*, Meth Mol Biol 2610. New York, NY, USA: Springer Nature;2023:57-66, https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2895-9_5.

15. García-Anaya MC, Romo-Chacón A, Zamudio-Flores PB, Ríos-Velasco C, Acosta-Muñiz CH. Detection of viruses in colonies of honey bees (*Apis mellifera* L.) in the state of Chihuahua, Mexico. *J Apic Res* 2016;55(3):240–242. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1226605>.
16. García-Anaya MC, Romo-Chacón A, Sáenz-Mendoza AI, Pérez-Ordoñez G, Acosta-Muñiz CH. Detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) and *Apis mellifera* filamentous virus (AmFV) in honey bees in Mexico. *J Apic Sci* 2018;62(1):141. <https://doi.org/10.2478/jas-2018-0009>.
17. Antúnez K, D'Alessandro B, Corbella E, Ramallo G, Zunino P. Honeybee viruses in Uruguay. *J Invertebr Pathol* 2006;93(1):67-70. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.05.009>.
18. Mendoza Y, Antúnez K, Branchiccela B, Anido M, Santos E, Invernizzi C. *Nosema ceranae* and RNA viruses in European and Africanized honeybee colonies (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Apidologie* 2014;45(2):224-234. <https://doi.org/10.1007/s13592-013-0241-6>.
19. Molineri AI, Pacini A, Giacobino A, Bulacio-Cagnolo N, Aignasse A, Zago L, *et al.* Prevalence of honey bee (*Apis mellifera*) viruses in temperate and subtropical regions from Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2017;49(2):166-173. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.12.004>.
20. Vargas M, Arismendi N, Riveros G, Zapata N, Bruna A, Vidal M, *et al.* Viral and intestinal diseases detected in *Apis mellifera* in Central and Southern Chile. *Chil J Agric Res* 2017;77(3):243-249. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392017000300243>.
21. Luis AR, García CAY, Invernizzi C, Branchiccela B, Piñeiro AMP, Morfi AP, *et al.* *Nosema ceranae* and RNA viruses in honey bee populations of Cuba. *J Apic Res* 2020;59(4):468-471. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1749451>.
22. Tibatá VM, Sánchez A, Palmer-Young E, Junca H, Solarte VM, Madella S, *et al.* Africanized honey bees in Colombia exhibit high prevalence but low level of infestation of *Varroa* mites and low prevalence of pathogenic viruses. *PLoS ONE* 2021;16(5):e0244906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244906>.
23. Traynor KS, Rennich K, Forsgren E, Rose R, Pettis J, Kunkel G, *et al.* Multiyear survey targeting disease incidence in US honey bees. *Apidologie* 2016;47(3):325-347. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0431-0>.

24. Anguiano-Báez R, Guzman-Novoa E, Hamiduzzaman MM, Espinosa-Montaña LG, Correa-Benítez A. *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) parasitism and climate differentially influence the prevalence, levels, and overt infections of deformed wing virus in honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J Insect Sci* 2016;16(1):44. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iew029>.
25. Gisder S, Aumeier P, Genersch E. Deformed wing virus: replication and viral load in mites (*Varroa destructor*). *J Gen Virol* 2009;90(2):463-467. <https://doi.org/10.1099/vir.0.005579-0>.
26. Sabahi Q, Morfin N, Nehzati-Paghaleh G, Guzman-Novoa E. Detection and replication of deformed wing virus and black queen cell virus in parasitic mites, *Varroa destructor*, from Iranian honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *J Apic Res* 2020;59(2):211-217. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1686576>.
27. Emsen B, Hamiduzzaman MM, Goodwin PH, Guzman-Novoa E. Lower virus infections in *Varroa destructor*-infested and uninfested brood and adult honey bees (*Apis mellifera*) of a low mite population growth colony compared to a high mite population growth colony. *Plos ONE* 2015;10(2):e0118885. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118885>.
28. Ramos-Cuellar AK, De la Mora A, Contreras-Escareño F, Morfin N, Tapia-González JM, Macías-Macías JO, *et al*. Genotype, but not climate, affects the resistance of honey bees (*Apis mellifera*) to viral infections and to the mite *Varroa destructor*. *Vet Sci* 2022;9(7):358. <https://doi.org/10.3390/vetsci9070358>.