



REVISION

Herramientas moleculares para el diagnóstico de enfermedades en *Apis mellifera*

Molecular tools for disease diagnosis in *Apis mellifera*

Anais Rodríguez Luis^{1*}, Carlos Ariel Yadró García¹

¹Centro de Investigaciones Apícola. CIAP. Carretera El Cano a El Chico, km 0, Arroyo Arenas, La Lisa, La Habana. CP 19190. Teléfonos: 7280 7027 y 7280 7890.

*reserva_r@ciapi.minag.cu



Palabras clave

Marcadores moleculares
Apis mellifera
Nosema
virus ARN,
Paenibacillus larvae
Varroa destructor

Molecular markers

Apis mellifera
Nosema
RNA viruses
Paenibacillus larvae
Varroa destructor

Editor: Dailén Guanche,
CIAP, Cuba

Recibido diciembre 4, 2019

Aceptado Diciembre 11, 2019

Copyright:© This work by Rodríguez y Yadró. is licensed under [CC BY-NC-ND 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Como citar este artículo:

Rodríguez, A., Yadró, C. A. (2019). "Herramientas moleculares para el diagnóstico de enfermedades en *Apis mellifera*". Apiciencia. 21 (2).

La salud, el desarrollo y el desempeño de *Apis mellifera* se ha visto afectado por una amplia variedad de patógenos. De los cuales, *Varroa destructor*, *Nosema* spp., *Paenibacillus larvae* y virus ARN son los que mayor impacto han tenido en la apicultura. Diversas técnicas y metodologías han sido desarrolladas e implementadas para la investigación de estos cuatro grupos de patógenos. De ellas, el empleo de marcadores moleculares usando PCR ha ido ganando terreno en este sentido en las últimas décadas. Las abejas cubanas, *Apis mellifera*, no han quedado libres de los efectos negativos de estos patógenos. Teniendo esto en cuenta, esta revisión se centra en los métodos moleculares empleados a nivel mundial y en Cuba para el diagnóstico de estas enfermedades en *Apis mellifera*.

The health, development and performance of *Apis mellifera* has been affected by a wide variety of pathogens. Of which, *Varroa destructor*, *Nosema* spp., *Paenibacillus larvae* and RNA virus have the greatest impact on beekeeping. Various techniques and methodologies have been developed and implemented for the investigation of these four groups of pathogens. Of these, the use of molecular markers using PCR has been gaining ground in this regard in recent decades. Cuban bees, *Apis mellifera*, have not been free from the action of these pathogens. With this in mind, this review focuses on the molecular methods used worldwide and in Cuba for the diagnosis of these diseases in *Apis mellifera*.

Introducción

Durante los últimos años se han reportado alrededor del mundo incluyendo el continente americano, casos de pérdida, debilitamiento y despoblación de colmenas de *Apis mellifera*, (Le Conte, Ellis y col. 2010, Maggi, Antúnez y col. 2016, Requier, Antúnez y col. 2018). Se ha propuesto que estas pérdidas de colmenas resultan de una interacción sinérgica entre diferentes factores de estrés que incluyen la intoxicación con pesticidas, la pérdida de la diversidad genética, la pérdida de los hábitats naturales y la presencia de patógenos. De la diversidad de patógenos y parásitos que afectan a *a. mellifera*, los de mayor impacto en la apicultura son el ácaro *Varroa destructor*, virus ARN, microsporidios del género *Nosema* y la bacteria *Paenibacillus larvae* (Neumann and Carreck 2010, Potts, Biesmeijer y col. 2010, Goulson, Nicholls y col. 2015).

El diagnóstico a nivel de laboratorio de estos patógenos se ha llevado a cabo mediante métodos de cultivo, microscópicos, inmunológicos y mediante métodos basados en ácidos no nucleicos o/y en ácidos nucleicos (Forsgren 2009). De estos, el empleo de métodos moleculares basados en la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha ido ganando terreno en la última década, proporcionado poderosas herramientas para el diagnóstico de enfermedades en *a. mellifera*.

Además, ha sido exitoso para la detección y determinación de sus agentes causales (Higes, Martín y col. 2006, Higes, Martín-Hernández y col. 2008, Ribière, Ball y col. 2008). En Cuba, la presencia de Nosemosis y síntomas de parálisis fue reportada por primera vez en 1956 (Ordetx 1956), y la presencia de Varroasis en 1996 (González 1996, Demedio 2001). Esta última, casi aproximadamente 30 años después de que fueran canceladas las importaciones de abejas a la isla. La situación sanitaria de la población apícola cubana, su influencia en la producción y en las pérdidas de colmenas anuales, ha sido poco estudiada. Sin embargo, se considera que las abejas cubanas son tolerantes a algunos de los patógenos más comunes en esta especie. Si bien en Cuba se encuentran presentes algunas de las enfermedades antes descritas desde hace más de una década, no fue hasta el año 2017 que se profundizó en la patósfera, prevalencia, patogenicidad y distribución de *Nosema* spp., *Varroa destructor* y Virus ARN mediante el empleo de PCR (datos sin publicar).

La detección basada en ADN puede ser dividida en dos grupos. Uno comprende técnicas que no requieren de la amplificación del ADN, mientras que el otro grupo involucra las técnicas de detección basada en la amplificación del ADN mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Forsgren 2009). Sin embargo, teniendo en cuenta lo antes

expuesto, en este documento centraremos la atención en las técnicas comprendidas en el segundo grupo.

Métodos de detección basados en ácidos nucleicos

Todos los protocolos basados en ácidos nucleicos requieren de la extracción del ADN o del ARN. De ahí que la calidad de la extracción es un factor crítico para todas estas técnicas de detección (Albuquerque, Mendes y col. 2009). La amplificación de genes constitutivos de referencia del hospedero (abeja), por ejemplo, RP49 y RPS5, han sido exitosamente empleados para asegurar la calidad de la extracción y su idoneidad para el proceso de amplificación (de Miranda 2008).

El método de PCR utiliza un par de cebadores (secuencia corta de ADN de simple cadena) diseñados para hibridar con una región particular del ADN diana, la cual es exponencialmente duplicada durante reacciones subsecuentes de PCR. El producto final de esta región duplicada es denominado amplicón y usualmente es identificado usando electroforesis. La detección de los productos de PCR también puede llevarse a cabo de forma continua, a medida que avanza la PCR (es decir, en "tiempo real"). La PCR en tiempo real detecta el amplicón a medida que se acumula (en tiempo "real") y determina el número de nuevas moléculas de ADN formadas en

cada reacción. En este caso, se emplea un indicador fluorescente (por ejemplo, SYBR-green) que se une al amplicón e informa su presencia mediante fluorescencia. El número de ciclo en el que los productos de PCR acumulados alcanzan un umbral de detección de fluorescencia, leído después de cada ciclo, puede relacionarse con mucha precisión con la cantidad inicial de ADN en la reacción (Bustin, Benes y col. 2009, Bustin, Beaulieu y col. 2010). Esta es la base para la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). La gran ventaja de la qPCR en tiempo real, además de la cuantificación precisa de la cantidad inicial de ADN objetivo en la reacción, es que el umbral de diagnóstico para la detección cualitativa se puede establecer después de que las reacciones hayan tenido lugar, o en varios niveles diferentes, del mismo conjunto de datos (Mackay 2007, Forsgren 2009).

La detección de más de un patógeno en un solo ensayo también ha sido posible mediante PCR. En este sentido, la PCR dúplex y multiplex utiliza dos o varios pares de cebadores, respectivamente, dirigidos a diferentes loci en una sola reacción de PCR (Chen, Zhao y col. 2004, Martín-Hernández, Meana y col. 2007). Otra variante de PCR es la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR), basada fundamentalmente en la amplificación por PCR del ADN copia (ADNc) obtenido del proceso de transcripción. Varios protocolos publicados para RT-PCR

pueden ser fácilmente adaptados para qPCR usando SYBR-green como marcador fluorescente (Evans, Schwarz y col. 2013).

Detección de enfermedades apícolas empleando PCR

Numerosas aplicaciones del PCR han sido descritas para la detección de patógenos en abejas adultas, crías, miel, polen y cera (Tentcheva, Gauthier y col. 2004, Chen, Higgins y col. 2005, Branchiccela, Aguirre y col. 2014, Mendoza, Antúnez y col. 2014).

El empleo de técnicas moleculares en las investigaciones

sobre el ácaro *Varroa* han sido utilizadas para analizar la variación en y entre las poblaciones del ácaro (Anderson and Fuchs 1998, de Guzman, Rinderer y col. 1999, Goulson, Nicholls y col. 2015). Secuencias de fragmentos cortos de ADN (< 1000 pares de bases) han sido exitosos en proveer evidencias de variación genética a lo largo del genoma completo de *Varroa* para uso en análisis filogenéticos o como marcadores moleculares (Avisé 2012). Las técnicas basadas en la amplificación y secuenciación del fragmento de 458 pb del gen de la Citocromo Oxidasa 1 (*cox1*) presente en el ADN mitocondrial (ADNm) permiten identificar las especies de ácaro que se encuentran infestando la colmena.

Tabla 1. Lista de set de cebadores disponibles para la detección de *Nosema apis*, *Nosema ceranae* y *Varroa destructor* en abejas mediante PCR

Patógenos	Nombre	Fuente	Secuencia de cebadores (5'-3')	Locus	Uso	Talla del fragmento (pb)
N. apis	321APIS	Martín-Hernández et al. 2007	GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA GGGGGGCGTTTAAATGTGAAACAACATATG	SSU rRNA	qPCR	321
	NosA	Webster et al. 2004	CCGACGATGTGATATGAGATG CACTATTATCATCCTCAGATCATA	SSU rRNA	PCR	209
	NaFor	Forsgren and Fries 2010	CTAGTATATTTGAATATTTGTTTACAATGG ^(b)	LSU rRNA	qPCR	278
	UnivRev		GTCGCTATGATCGCTTGCC			
	N. apis	Chen et al. 2008	CCATTGCCGGATAAGAGAGT CACGCATTGCTGCATCATTGAC	SSU rRNA	PCR	401 ^(a)
N. ceranae	218MITOC	Martín-Hernández et al. 2007	CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG	SSU rRNA	qPCR	218-219
	NcFor	Forsgren and Fries 2010	TATTGTAGAGAGGTGGGAGATT	LSU rRNA	qPCR	318
	UnivRev		GTCGCTATGATCGCTTGCC			
	N. ceranae	Chen et al. 2008	CGGATAAAGAGTCCGTTACC TGAGCAGGGTCTAGGGAT	SSU rRNA	PCR	250 ^(a)
Ambos	ITS	Klee et al. 2006	GATATAAGTCGTAACATGGTTGCT CATCGTTATGGTATCCTATTGATC	ITS region	PCR	120
	NOS	Higes et al. 2006	TGCCGACGATGTGATATGAG CACAGCATCCATTGAAAACG	SSU rRNA	PCR	240N.a 252N.c
	SSU-res	Klee et al. 2007	GCCTGACGTAGACGCTATTTC GTATTACCGCGGCTGCTGG	SSU rRNA	PCR	402
	Nosema	Chen et al. 2008	GGCAGTTATGGGAAGTAACA GGTCGTACATTTTCATCTCT	SSU rRNA	PCR	208N.a 212N.c
	Nos-16S	Stevanovic et al. 2011	CGTAGACGCTATTCCCTAAGATT CTCCCAACTATACAGTACACCTCATA	SSU rRNA	PCR	488
Varroa	COXF	Anderson and Fuchs 1998	GG(A/G) GG(A/T) GA(C/T) CC(A/T) AAT (C/T)T(A/T) TAT CAAC	Cox1	PCR	458
	COXRa		CCT GT(A/T) A(A/T)A ATA GCA AAT AC			
	10KbCOIF1	Anderson and Fuchs 1998	CTT GTA ATC ATA AGG ATA TTG GAAC	Cox1	PCR	929
	6,5KbCOIR		AAT ACC AGT GGG AAC CGC			
	16KbATP6F	Navajas et al. 2010	GAC ATA TAT CAG TAA CAA TGAG	Atp6-cox3	PCR	818
	16KbCOIIIIR		GAC TCC AAG TAA TAG TAA AACC			
	10KbCytbF-1	Navajas et al. 2010	GCA GCT TTA GTG GAT TTA CCT AC	cytb	PCR	985
	10KbCytbPRIM		CTA CAG GAC ACG ATC CCA AG			

ITS: internal transcribed spacer region; SSU: Subunidad menor del ARNr (16s rRNA); N.a: *Nosema apis*; N.c: *Nosema ceranae*; (a) Talla del fragmento que no pudo ser verificado. (b) Secuencia modificada al complemento original introducida a GenBank como U97150. Uso: PCR, PCR estándar (para la detección de diferentes especies de *Nosema*.); qPCR, por PCR cuantitativo o PCR en tiempo real (para la cuantificación de diferentes especies de *Nosema*); genérico, cebadores que amplifican todas las especies de *Nosema* conocidos o a todos los microsporidios sin diferenciación entre especies

Secuencias de otros genes concatenados obtenidos del ADNm incluyendo *cox3*, *atp6* y *cytb* han sido empleados para identificar pequeñas poblaciones (denominadas haplotipos) dentro de poblaciones mayores (denominadas haplogrupos) (Navajas, Anderson y col. 2010) (Tabla 1). El análisis de polimorfismo de longitud con fragmentos de restricción mediante PCR (RFLP-PCR) del gen *cox1* ha sido exitoso para determinarlos diferentes haplotipos de *V. destructor*, los cuales se han encontrados asociados a su origen geográfico y su patogenicidad (Anderson and Truman 2000).

Otros marcadores moleculares como los microsatélites también han sido empleados exitosamente para determinar relaciones de paternidad y de parentesco, y en estudios poblacionales en diferentes especies de *Varroa* (Evans 2000, Solignac, Cornuet y col. 2005). En Cuba, recientemente se analizó la población del ácaro existente mediante RFLP-PCR y microsatélites (Rodríguez y col. datos sin publicar).

Varios métodos moleculares empleando PCR, por ejemplo, PCR simple, PCR múltiple, RFLP-PCR y qPCR han sido desa-

rollados para la detección e identificación de las especies de *Nosema* (Higes, Martín y col. 2006, Martín-Hernández, Meana y col. 2007, Chen, Evans y col. 2008, Antúñez, Anido y col. 2015) y la cuantificación de los niveles de esporas en muestras de abejas individuales y combinadas (Bourgeois, Rinderer y col. 2010).

Los resultados obtenidos a partir de este tipo de estudios han sido muy útiles para aumentar la información sobre estos microsporidios. Adicionalmente un amplio rango de cebadores específicos han sido desarrollados con esta finalidad (Chen, Evans y col. 2008, Martín-Hernández, Bartolomé et al. 2018) (Tabla 1). En este sentido, la secuencia de la subunidad menor del ARN ribosomal (16S rRNA) ha sido ampliamente usada como marcador molecular debido a que está altamente conservada (Bourgeois, Rinderer et al. 2010). Actualmente se encuentra disponible un método de PCR dúplex que permite a amplificación simultánea y diferencial de *N. apis* y *N. ceranae*. Como resultado de la aplicación de ese método se ha podido determinar e identificar que *N. ceranae* aparentemente circula de manera exclusiva en Cuba (Rodríguez y col. datos sin publicar).

Tabla 2. Lista de set de cebadores disponibles para la detección múltiple de infecciones virales

Patógenos	Nombre	Fuente	Secuencia de cebadores (5'-3')	Posición en el genoma	Talla del fragmento (pb)
Virus ARN	BQCV	Benjeddou et al. (2001)	TGGTCAGCTCCCACTACCTTAAAC GCAACAAGAAGAAACGTAAACCAC	7850-8550 (poliproteína estructural)	700
	DWV	Chen et al. (2004)	CTTACTCTGCCGTCGCCCA CCGTTAGGAACCTATTATCGCG	1171-1365 (poliproteína estructural)	194
	KBV	Stoltz et al. (1995)	GATGAACGTCGACCTATTGA TGTGGGTTGGCTATGAGTCA	5405-5820 (poliproteína no estructural)	415
	SBV	Chen et al. (2004)	GCTGAGGTAGGATCTTTGCGT TCATCATCTTCACCATCCGA	4957-5781 (poliproteína estructural)	824
Paenibacillus larvae	AFB-F AFB-R	Dobbelaere et al. (2001)	CTTGTGTTTCTTTCGGGAGACGCCA TCTTAGAGTGCCCACTCTGCG		1106
	Primer 1 Primer 2	Govan et al. (1999)	AAGTCGAGCGGACCTTGTGTTTC TCTATCTCAAACCGGTCAGAGG		973
	ERIC1R ERIC2	Versalovic et al. (1994)	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG		Varios amplicones
	BOXA1R	Versalovic et al. (1994)	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG		Varios amplicones
	MBO-REP1	Versalovic et al. (1994)	CCGCCGTTGCCGCCGTTGCCGCCG		Varios amplicones
	REP1R-I REP2-I	Versalovic et al. (1994)	IIICGICGICATCIGGC ICGIITATCIGGCCTAC		Varios amplicones

En el caso de las infecciones virales el RT-PCR ha devenido un método estándar para la detección e identificación de forma rápida, sensible y específica y para la semi-cuantificación de virus ARN de las abejas (Chen, Higgins y

col. 2005, Blanchard, Olivier y col. 2008, de Miranda 2008). Los productos de PCR pueden ser detectados después de que el PCR finalizó mediante análisis cualitativos (presencia / ausencia del producto) tanto por geles de

electroforesis o por el análisis de la curva de desnaturalización después de cada ciclo, en tiempo real, o sea mediante RT-qPCR. Numerosos protocolos de para PCR multiplex han sido diseñados para los virus ARN de las abejas (Grabensteiner, Ritter y col. 2001, Topley, Davison y col. 2005, Teixeira, Chen y col. 2008) (Tabla 2). Esta misma metodología fue la empleada en Cuba, para analizar la presencia de cuatro virus ARN (Rodríguez y col. Datos sin publicar).

Para el diagnóstico de la enfermedad conocida como Loque Americana, han sido desarrollados algunos protocolos de identificación no moleculares. Sin embargo, para propósitos de investigación se recomienda la identificación de su agente causal, *Paenibacillus larvae*, mediante PCR. Numerosos métodos de PCR han sido descritos por De Graaf, Alippi y col. (2006) para el diagnóstico de la enfermedad. Adicionalmente, la metodología basada en el gen 16S rRNA resultó ser un método robusto en la pasada década (Tabla 2).

La disponibilidad de estas técnicas estandarizadas permitió la discriminación de las diferentes cepas de *P. larvae* y el reconocimiento de las cepas más virulentas, resultados que han sido esenciales para el estudio epidemiológico de la Loque americana. En este sentido, se han utilizado diferentes estrategias para evaluar la diversidad genética de *P. larvae* (de Graaf, De Vos y col. 2006, Genersch, Forsgren y col. 2006, Antunez, Piccini y col. 2007), de las cuales la más utilizada es la amplificación de elementos repetitivos (rep-PCR) (Peters, Kilwinski y col. 2006, Antunez, Piccini y col. 2007, Loncaric, Derakhshifar y col. 2009). Los pares de primer ERIC1R-ERIC2, han permitido la diferenciación de manera exitosa de 4 diferentes genotipos de *P. larvae* (ERIC I, ERIC II, ERIC III y ERIC IV) (Genersch, Forsgren y col. 2006). Los genotipos ERIC I y II correspondientes a la subespecie *P. l. larvaemientras* que los genotipos ERIC III y IV correspondientes a la subespecie *P. l. pulvificiens* (Genersch 2010).

Conclusiones

La revolución de la biología molecular del último cuarto de siglo ha madurado a través de la fase experimental, inicialmente impulsada por la mano de obra, hasta sistemas automatizados de alto volumen que brindan información confiable y de alta calidad. Los criterios principales para un sistema de diagnóstico ideal son sensibilidad, precisión, confiabilidad, universalidad, simplicidad, velocidad y costo. La mayoría de las tecnologías de detección modernas ahora son lo suficientemente sensibles como para detectar una sola molécula objetivo. Se dispone de herramientas moleculares precisas y robustas para asegurar el diagnóstico de las patologías de las abejas con alta precisión y repe-

tibilidad.

Agradecimientos

Agradecer a todas las personas que me facilitaron los artículos que no se encontraban gratis en Google Scholar

Contribución de los autores

Todos los autores contribuyeron en igual medida a la realización de este trabajo

Conflictos de interés

Los autores declaran que no existen conflictos de interés

Referencias Bibliográficas

1. Albuquerque, P., M. V. Mendes, C. L. Santos, P. Moradas-Ferreira and F. Tavares (2009). "DNA signature-based approaches for bacterial detection and identification." *Science of the Total Environment* **407**(12): 3641-3651.
2. Anderson, D. and J. Trueman (2000). "*Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species." *Experimental & applied acarology* **24**(3): 165-189.
3. Anderson, D. L. and S. Fuchs (1998). "Two genetically distinct populations of *Varroa jacobsoni* with contrasting reproductive abilities on *Apis mellifera*." *Journal of Apicultural Research* **37**(2): 69-78.
4. Antúnez, K., M. Anido, B. Branchiccela, J. Harriet, J. Campa, C. Invernizzi, E. Santos, M. Higes, R. Martín-Hernández and P. Zunino (2015). "Seasonal Variation of Honeybee Pathogens and its Association with Pollen Diversity in Uruguay."
5. Antunez, K., C. Piccini, S. Castro-Sowinski, A. Rosado, L. Seldin and P. Zunino (2007). "Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus larvae* isolates." *Veterinary microbiology* **124**(1-2): 178-183.
6. Avise, J. C. (2012). *Molecular markers, natural history and evolution*, Springer Science & Business Media.
7. Blanchard, P., V. Olivier, A.-L. Iscache, O. Celle, F. Schurr, P. Lallemand and M. Ribière (2008). "Improvement of RT-PCR detection of chronic bee paralysis virus (CBPV) required by the description of genomic variability in French CBPV isolates." *Journal of invertebrate pathology* **97**(2): 182-185.
8. Bourgeois, A. L., T. E. Rinderer, L. D. Beaman and R. G. Danka (2010). "Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee." *Journal of Invertebrate Pathology* **103**(1): 53-58.
9. Branchiccela, B., C. Aguirre, G. Parra, P. Estay, P. Zunino and K. Antúnez (2014). "Genetic changes in *Apis mellifera* after 40 years of Africanization." *Apidologie* **45**(6): 752-756.
10. Bustin, S. A., J.-F. Beaulieu, J. Huggett, R. Jaggi, F. S. Kibenge, P. A. Olsvik, L. C. Penning and S. Toegel (2010). *MIQE precis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments*,

BioMed Central.

11. Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl and G. L. Shipley (2009). "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments." *Clinical chemistry* **55**(4): 611-622.
12. Chen, Y., J. D. Evans, I. B. Smith and J. S. Pettis (2008). "Nosema ceranae is a longpresent and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States." *Journal of invertebrate pathology* **97**(2): 186-188.
13. Chen, Y., J. Higgins and M. Feldlaufer (2005). "Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.)." *Applied and Environmental Microbiology* **71**(1): 436-441.
14. Chen, Y., Y. Zhao, J. Hammond, H.-t. Hsu, J. Evans and M. Feldlaufer (2004). "Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses." *Journal of invertebrate pathology* **87**(2): 84-93.
15. De Graaf, D., A. Alippi, M. Brown, J. Evans, M. Feldlaufer, A. Gregorc, M. Hornitzky, S. Pernal, D. Schuch and D. Titěra (2006). "Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols." *Letters in applied microbiology* **43**(6): 583-590.
16. de Graaf, D. C., P. De Vos, M. Heyndrickx, S. Van Trappen, N. Peiren and F. J. Jacobs (2006). "Identification of *Paenibacillus* larvae to the subspecies level: an obstacle for AFB diagnosis." *Journal of invertebrate pathology* **91**(2): 115-123.
17. de Guzman, L. I., T. E. Rinderer and J. A. Stelzer (1999). "Occurrence of two genotypes of *Varroa jacobsoni* Oud. in North America." *Apidologie* **30**(1): 31-36.
18. de Miranda, J. R. (2008). Diagnostic techniques for virus detection in honey bees. *Virology and the Honey Bee*. M. Aubert, B. Ball, I. Fries et al. European Communities, Luxembourg: 121-232.
19. Demedio, J. (2001). La varroasis de las abejas en una zona de la provincia de La Habana. Agente etiológico, índices de infestación y control biotécnico y químico, Tesis en opción al grado Doctor en Ciencias Veterinarias.
20. Evans, J. D. (2000). "Microsatellite loci in the honey bee parasitic mite *Varroa jacobsoni*." *Molecular Ecology* **9**(9): 1436-1438.
21. Evans, J. D., R. S. Schwarz, Y. P. Chen, G. Budge, R. S. Cornman, P. de la Rua, J. R. de Miranda, S. Foret, L. Foster and L. Gauthier (2013). "Standard methods for molecular research in *Apis mellifera*." *Journal of apicultural Research* **52**(4): 1-54.
22. Forsgren, E. (2009). "Molecular diagnosis and characterization of honey bee pathogens." *Acta universitatis Agriculturae* **2009**(79).
23. Genersch, E. (2010). "American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*." *Journal of invertebrate pathology* **103**: S10-S19.
24. Genersch, E., E. Forsgren, J. Pentikäinen, A. Ashiralieva, S. Rauch, J. Kilwinski and I. Fries (2006). "Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvificiens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**(3): 501-511.
25. González, A. (1996). Reporte preliminar del ácaro *Varroa jacobsoni* Oud. en tres apiarios de la provincia de Matanzas., Instituto de Medicina Veterinaria.
26. Goulson, D., E. Nicholls, C. Botías and E. L. Rotheray (2015). "Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers." *Science* **347**(6229): 1255957.
27. Grabensteiner, E., W. Ritter, M. J. Carter, S. Davison, H. Pechhacker, J. Kolodziejek, O. Boecking, I. Derakhshifar, R. Moosbeckhofer and E. Licek (2001). "Sacbrood virus of the honeybee (*Apis mellifera*): rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription-PCR." *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**(1): 93-104.
28. Higes, M., R. Martín-Hernández, C. Botías, E. G. Bailón, A. V. González-Porto, L. Barrios, M. J. Del Nozal, J. L. Bernal, J. J. Jiménez and P. G. Palencia (2008). "How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse." *Environmental microbiology* **10**(10): 2659-2669.
29. Higes, M., R. Martín and A. Meana (2006). "Nosema ceranae, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe." *Journal of invertebrate pathology* **92**(2): 93-95.
30. Le Conte, Y., M. Ellis and W. Ritter (2010). "Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses?" *Apidologie* **41**(3): 353-363.
31. Lončarić, I., I. Derakhshifar, J. T. Oberlerchner, H. Köglberger and R. Moosbeckhofer (2009). "Genetic diversity among isolates of *Paenibacillus larvae* from Austria." *Journal of invertebrate pathology* **100**(1): 44-46.
32. Mackay, I. M. (2007). Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization, Horizon Scientific Press.
33. Maggi, M., K. Antúnez, C. Invernizzi, P. Aldea, M. Vargas, P. Negri, C. Brasesco, D. De Jong, E. W. Teixeira and J. Principal (2016). "Honeybee health in South America." *Apidologie* **47**(6): 835-854.
34. Martín-Hernández, R., A. Meana, L. Prieto, A. M. Salvador, E. Garrido-Bailón and M. Higes (2007). "Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*." *Applied and Environmental Microbiology* **73**(20): 6331-6338.
35. Martín-Hernández, R., C. Bartolomé, N. Chejanovsky, Y. Le Conte, A. Dalmon, C. Dussaubat, P. García-Palencia, A. Meana, M. A. Pinto and V. Soroker (2018). "Nosema ceranae in *Apis mellifera*: a 12 years post-detection perspective." *Environmental microbiology*.

36. Mendoza, Y., K. Antúnez, B. Branchiccela, M. Anido, E. Santos and C. Invernizzi (2014). "Nosema ceranae and RNA viruses in European and Africanized honeybee colonies (*Apis mellifera*) in Uruguay." *Apidologie* **45**(2): 224-234.
37. Navajas, M., D. L. Anderson, L. I. De Guzman, Z. Y. Huang, J. Clement, T. Zhou and Y. Le Conte (2010). "New Asian types of *Varroa destructor*: a potential new threat for world apiculture." *Apidologie* **41**(2): 181-193.
38. Neumann, P. and N. L. Carreck (2010). *Honey bee colony losses*, Taylor & Francis.
39. Ordetx, G. (1956). "Beekeeping in Cuba." *Amer. Bee J.* **96**(1): 27-28.
40. Peters, M., J. Kilwinski, A. Beringhoff, D. Reckling and E. Gensch (2006). "American foulbrood of the honey bee: occurrence and distribution of different genotypes of *Paenibacillus larvae* in the administrative district of Arnsberg (North Rhine-Westphalia)." *Journal of Veterinary Medicine, Series B* **53**(2): 100-104.
41. Potts, S. G., J. C. Biesmeijer, C. Kremen, P. Neumann, O. Schweiger and W. E. Kunin (2010). "Global pollinator declines: trends, impacts and drivers." *Trends in ecology & evolution* **25** (6): 345-353.
42. Requier, F., K. Antúnez, C. L. Morales, P. Aldea Sánchez, D. Castilhos, P. M. Garrido, A. Giacobino, F. J. Reynaldi, J. M. Rosso Londoño and E. Santos (2018). "Trends in beekeeping and honey bee colony losses in Latin America." *Journal of Apicultural Research*: 1-6.
43. Ribière, M., B. Ball and M. Aubert (2008). "Natural history and geographical distribution of honey bee viruses." *Virology and the honey bee*: 15-84.
44. Solignac, M., J. M. Cornuet, D. Vautrin, Y. Le Conte, D. Anderson, J. Evans, S. Cros-Arteil and M. Navajas (2005). "The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the Western honeybee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones." *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **272**(1561): 411-419.
45. Teixeira, E. W., Y. Chen, D. Message, J. Pettis and J. D. Evans (2008). "Virus infections in Brazilian honey bees." *Journal of invertebrate pathology* **99**(1): 117-119.
46. Tentcheva, D., L. Gauthier, S. Jouve, L. Canabady-Rochelle, B. Dainat, F. Cousserans, M. E. Colin, B. V. Ball and M. Bergoin (2004). "Polymerase Chain Reaction detection of deformed wing virus (DWV) in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*." *Apidologie* **35**: 431-439.
47. Topley, E., S. Davison, N. Leat and M. Benjeddou (2005). "Detection of three honeybee viruses simultaneously by a single multiplex reverse transcriptase PCR." *African Journal of Biotechnology* **4**(8): 763-767.