



“Virus de *Apis mellifera* en Chile: Detección y análisis de los 7 virus de abeja más relevantes en Sudamérica en colmenas con presencia de vector *Varroa destructor*”

Memoria para optar al título profesional de Bioquímica

Loreto Pamela Araos Jerez

Director de Memoria: Dr. Gonzalo Barriga Pinto

Profesor patrocinante: Dr. Carlos A. Santiviago

**Laboratorio de Virus Emergentes
Programa de Virología
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile**

**Laboratorio de Microbiología
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile**

**Santiago, Chile
2022**

Esta Memoria de Título se realizó en el Laboratorio de Virus Emergentes de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y fue financiada por el proyecto FONDECYT 11200228 dirigido por el Dr. Gonzalo Barriga Pinto.

Agradecimientos

Este trabajo no habría sido posible sin la guía de las personas brillantes que tengo la fortuna de conocer y el apoyo incondicional de todos mis seres profundamente amados.

Gracias por iluminar mis noches más oscuras.

Abreviaturas

ARN: Ácido ribonucleico.

ABPV: Del inglés *Acute Bee Paralysis Virus*, que traducido al español se nombraría Virus de la Parálisis Aguda de abeja.

BLAST: Del inglés Basic Local Alignment Tool. En este estudio se utilizó específicamente para alinear secuencias de nucleótidos, por lo que se le nombrará blastn.

BQCV: Del inglés *Black Queen Cell Virus*, que traducido al español se nombraría Virus de las Células de Reina Negra.

CBPV: Del inglés *Chronic Bee Paralysis Virus*, se traduce como Virus de la Parálisis Crónica de abeja.

CDD: Del inglés *Colony Collapse Disorder*, se traduce como Desorden de Colapso de Colmenas.

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario.

DWV: Del inglés Deformed Wings Virus, que se traduce como Virus de las Alas Deformes.

Etc: etcétera.

IAPV: Del inglés *Israeli Acute Paralysis Virus*, traducido como Virus de la Parálisis Aguda Israelí.

KBV: Del inglés *Kashmir Bee Virus*, traducido como Virus de Cachemira de abeja.

Km: Kilómetros.

MTV: Medio de transporte viral.

ng: Nanogramos.

NGS: Acrónimo del inglés *New Generation Sequencing*, se traduce como Secuenciación de segunda generación.

ODEPA: Organización de estudios y políticas agrarias.

OIE: Oficina Internacional de Epizootias, también Organización mundial de sanidad animal.

PCR: Del inglés *Polymerase Chain Reaction*, en español Reacción en cadena de la polimerasa.

RT-PCR: Transcripción inversa acoplada a PCR.

SAG: Servicio Agrícola Ganadero.

SBV: Del inglés *Sacbrood Bee Virus*, se traduce como Virus de la cría momificada de abeja.

µL: Microlitros.

°C: Grados Celsius.

Índice general

Agradecimientos	3
Abreviaturas	4
Índice general	5
Índice de tablas	6
Índice de figuras	7
Resumen	8
<i>Summary</i>	9
Introducción	10
Hipótesis y objetivos	22
Materiales y Métodos	23
Resultados	29
Discusión	47
Conclusión	52
Bibliografía	53

Índice de tablas

Tabla 1: Clasificación, sintomatología y vías de transmisión de los 7 virus más prevalentes en Sudamérica	18
Tabla 2: Datos de partidores utilizados para estandarizar la RT-PCR para detectar cada uno de los 7 virus de <i>Apis mellifera</i> buscados en este estudio	26
Tabla 3: Datos de distancia aproximada entre los lugares de toma de muestras de <i>Apis mellifera</i> dentro de la Región Metropolitana	30
Tabla 4: Datos e información de <i>pools</i> de muestras disponibles, así como sus resultados para el <i>screening</i> por PCR de cada virus	33

Índice de figuras

Figura 1: Representación gráfica de los 3 grupos de "One Health"	11
Figura 2: Fotografía de ejemplares de <i>Apis mellifera</i> adulta en sus variedades europea (izquierda) y africanizada (derecha)	13
Figura 3: Ilustración de varroa adulto macho (izquierda) y hembra (derecha)	15
Figura 4: Imagen de abeja melífera adulta parasitada por varroa	16
Figura 5: Diferencias morfológicas y de desarrollo entre abeja parasitada con varroa (derecha) y abeja no parasitada (izquierda)	16
Figura 6: Distribución de las colmenas en el territorio nacional	19
Figura 7: Puntos de toma de muestras en la Región Metropolitana	30
Figura 8: Perfil electroforético de la estandarización del RT-PCR para los virus buscados	32
Figura 9: Resultados del análisis utilizando blastn de las secuencias obtenidas para <i>Deformed Wings Virus</i>	35
Figura 10: Resultados del análisis utilizando blastn de las secuencias obtenidas para <i>Black Queen Cell Virus</i>	36
Figura 11: Resultados del análisis utilizando blastn de las secuencias obtenidas para <i>Acute Bee Paralysis Virus</i>	37
Figura 12: Resultados del análisis utilizando blastn de las secuencias obtenidas para <i>Israeli Acute Paralysis Virus</i>	38
Figura 13: Resultados del análisis utilizando blastn de las secuencias obtenidas para <i>Chronic Bee Paralysis Virus</i>	39
Figura 14: Resultados del análisis utilizando blastn de las secuencias obtenidas para <i>Kashmir Bee Virus</i>	39
Figura 15: Árbol filogenético de la secuencia obtenida para <i>Deformed Wings Virus</i> en nuestra investigación	42
Figura 16: Árbol filogenético de las secuencias obtenidas para <i>Kashmir Bee Virus</i> en nuestra investigación	44
Figura 17: Árbol filogenético de las secuencias obtenidas para <i>Black Queen Cell Virus</i> en nuestra investigación	46

Resumen

La industria apícola en Chile produce 11,6 mil toneladas anuales de miel, siendo un importante bien de consumo y exportación. Sin embargo, la salud apícola no es un tópico al que se le dé una relevancia equivalente. Esperamos que este estudio sea un reporte actualizado y detallado sobre la salud apícola en la Región Metropolitana mediante un *screening* de diagnóstico de 7 virus con alta incidencia en Sudamérica (DWV, BQCV, IAPV, CBPV, ABPV, SBV y KBV) para luego secuenciar y analizar filogenéticamente en busca de sus posibles vías de transmisión e ingreso al país. La presencia de DWV, BQCV y KBV, circulantes en las colmenas de la Región Metropolitana, fue confirmada utilizando secuenciación de Sanger (Sanger & Goulson, 1975), y el análisis filogenético realizado reveló que los patógenos detectados tienen un fuerte parentesco con aquellos reportados en Asia, Europa y Norteamérica principalmente. Cabe destacar que hasta la fecha KBV no había sido reportado en el país por el SAG, de modo que esta investigación supone un nuevo aporte a la vigilancia de patógenos emergentes en Chile para la industria apícola.

Summary

***Apis mellifera* viruses in Chile: Detection and analysis of the 7 most prevalent bee viruses in South America in hives with the presence of vector *Varroa destructor* located in the Metropolitan Region.**

The beekeeping industry in Chile produces 11.6 thousand tons of honey per year, this being an important consumer and export good. However, beekeeping health is not a topic that is given equivalent relevance. This study aims to generate an updated and detailed report on beekeeping health in the metropolitan region. This study aims to generate an updated and detailed report on beekeeping health in the metropolitan region through a diagnostic screening of 7 viruses with high incidence in South America (DWV, BQCV, IAPV, CBPV, ABPV, SBV and KBV) and posterior sequencing and phylogenetical analysis in search of their possible routes of transmission and entry into the country. The presence of circulating DWV, BQCV and KBV in the hives of the Metropolitan Region was confirmed using Sanger sequencing (Sanger & Goulson, 1975), and the phylogenetic analysis carried out revealed that these pathogens have a strong kinship with those reported in Asia, Europe and North America mainly. It should be noted that KBV was not reported in the country by SAG (from spanish Servicio Agrícola y Ganadero) to date, so this research represents a new contribution to the surveillance of emerging pathogens in Chile for the beekeeping industry.

Introducción

1. Una Salud (“One Health”) y patógenos emergentes

Todo desarrollo humano y animal depende directamente del medioambiente, y así como él nos influye, toda consecuencia que nuestras acciones puedan tener también influyen en su estado (Zinsstag et al., 2011).

Para caracterizar este fenómeno de interconexión entre los principales grupos de organismos del planeta (donde no sólo se considera a los humanos y al medioambiente), nace el concepto de “**One Health**”, acuñado por Calvin Shwabe a mediados del siglo 20 (Zinsstag et al., 2011).

Una Salud o “*One Health*” en inglés, establece que la salud mundial es una red interconectada de 3 grupos principales y sus respectivos estados de salud o bienestar, los cuales se influyen mutuamente: la salud humana, la salud animal y el ecosistema (**Figura 1**). Estos 3 grupos siempre han estado y estarán interconectados, por lo que la salud de uno siempre estará relacionada de alguna manera con la salud de los otros dos (Zinsstag et al., 2011).

De esta forma, se establece que la salud global depende del estado de estos 3 grupos y sus respectivas influencias entre ellos desde una perspectiva integrada y simétrica. Es de suma importancia observar aquellos riesgos que desestabilizan este equilibrio, como por ejemplo patologías emergentes que afecten al grupo animal, humano o medioambiental. El daño en uno de estos tiene el potencial de repercutir significativamente la salud global (Suárez & Corcho, 2000).

Se identifica como patógeno emergente todo aquél causante de una enfermedad que se haya identificado recientemente y cuya incidencia ha aumentado en las pasadas dos décadas o que pudiera tener un potencial impacto significativo en alguna de los 3 grupos de la *One Health* y/o en la salud mundial (Suárez & Corcho, 2000). De todos los patógenos conocidos sin duda los virus son un peligro constante e inminente tanto en el área productiva como en el área sanitaria (Su & Corcho, 2000. Taj H, 2006).

El potencial impacto de los patógenos emergentes se puede caracterizar como la capacidad de repercutir inevitablemente en los otros dos, ya sea directamente por zoonosis o indirectamente por impacto ecológico, económico, de abastecimiento de recursos, etc.(OIE, 2021).

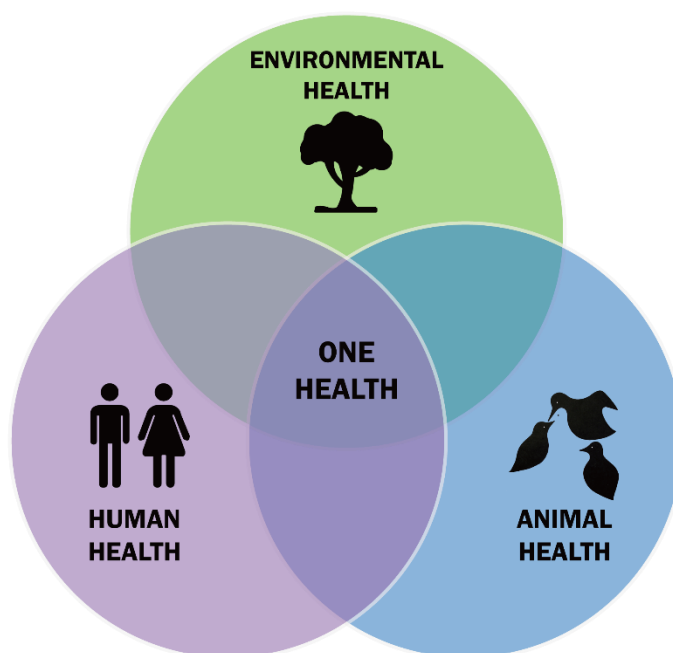


Figura 1: Representación gráfica de los 3 grupos de “*One Health*”: Salud humana (en morado), salud animal (en azul) y ecosistema (en verde). Imagen rescatada de prevention-medical.org.

En la actualidad, debido al sostenido avance del cambio climático, la salud ecosistémica se ha ido deteriorando paulatinamente, lo que por supuesto repercute directamente en el estado de la salud humana y animal (Zinsstag et al., 2018).

De esta última, podemos destacar que los organismos más afectados son las aves y mamíferos nectarívoros y los insectos polinizadores, puesto que éstos son los principales animales ligados al ecosistema, su estado y sus ciclos (Rosado Gordón, 2012).

Entre ellos podemos destacar a los murciélagos, mosquitos y por sobre todos ellos, las abejas melíferas (Maggi et al., 2016).

***Apis mellifera* en el cono sur: principal polinizador de cultivo**

Apis mellifera, comúnmente conocida como abeja melífera o abeja europea, es el organismo fertilizador de cultivos más importante (Buchmann, 1996; Kremen et al., 2002; Klein et al., 2012), llegando a polinizar cerca del 77% de las plantas productoras del alimento necesario para sostener a la población global (Maggi et al., 2016).

De esta especie, podemos encontrar 2 linajes principales usados por los apicultores en Sudamérica: abejas melíferas “africanizadas”, utilizadas principalmente en Venezuela y Brasil (Thimann, 2001) y abejas melíferas “europeas”, presentes mayoritariamente en Argentina y Chile (Delaplane, 2014). Estas últimas son más propensas a sufrir infestaciones de parásitos e infecciones en comparación a las africanizadas, puesto que tienen hábitos de

acicalamiento y protección contra patógenos y parásitos externos menos rigurosos y efectivos (Maggi et al., 2016). Sin embargo, en la mayoría de los países sudamericanos se continúa utilizando la variedad europea de *Apis mellifera* debido a su mayor rendimiento en la producción de recursos industriales en comparación a los individuos africanizados (miel, cera, etc.)(Guzmán-Novoa et al., 2011). (**Figura 2**)



Figura 2: Fotografía de ejemplares de *Apis mellifera* adulta en sus variedades europea (izquierda) y africanizada (derecha). Se puede observar a simple vista la diferencia de tamaño, siendo la africanizada aproximadamente un 10% más pequeña (Guzmán-Novoa et al., 2011).

Los parásitos y patógenos que afectan a *Apis mellifera* en Sudamérica son de múltiples naturaleza y letalidad, tanto de origen artificial como natural. De estos últimos, podemos destacar el efecto de las enfermedades que merman la salud y el funcionamiento de las colonias apícolas. Es común encontrarse con colmenas que colapsan debido a algún tipo de afección contraída por la colmena que provoca que la salud de la colonia se deteriore drásticamente y luego se disuelva, lo que se conoce como desorden de colapso de colmenas (*CDD*) (Dainat & Neumann, 2012). Este fenómeno es principalmente provocado por agentes biológicos como bacterias, hongos y virus. Estos patógenos son

capaces de transmitirse de colonia a colonia gracias a la acción, reproducción e infestación de los llamados vectores patogénicos (Maggi et al., 2016).

Los vectores patogénicos son variados organismos que pueden albergar y transportar organismos en su interior, sin necesariamente producir la patogenicidad de la enfermedad, y la gran mayoría de ellos sobrevive parasitando a organismos mayores.

En el caso de las abejas mellíferas, el organismo parásito más común directamente relacionado como vector de enfermedades y virus en zonas de clima templado y sudamérica es el *varroa destructor*, llegando a presentar una prevalencia relativa de hasta 55,57% en Chile (SAG, 2021).

2. *Varroa destructor*

El *Varroa destructor*, también llamado comúnmente varroa, es un ácaro ectoparásito principalmente de *Apis mellifera*, infectando tanto organismos adultos como sus larvas y pupas. Este organismo se encuentra ampliamente distribuido en prácticamente todos los continentes del planeta, y presenta 4 especies identificadas hasta el momento, las cuales son *Varroa jacobsoni*, *Varroa underwoodi*, *Varroa rinderi* y *Varroa destructor* (OIE, 2018) (**Figura 3**).

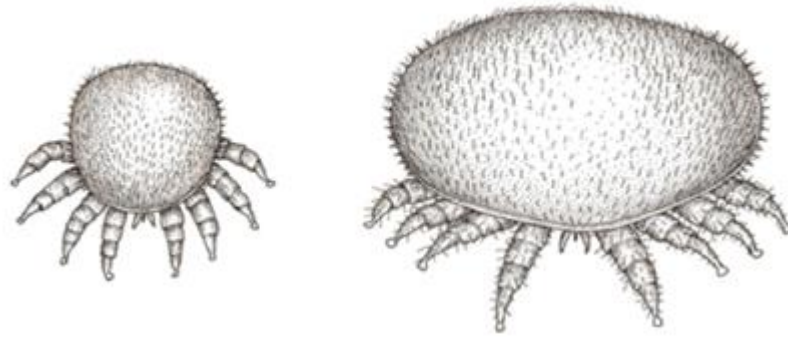


Figura 3: Ilustración de varroa adulto macho (izquierda) y hembra (derecha). Es el único parásito común de las abejas melíferas observable a simple vista (tiene un tamaño promedio aproximado de 1,1 mm x 1,5 mm en hembras) y se define como un ácaro de 8 extremidades que parasita a adultos de *Apis mellifera* y a sus crías. Se suele localizar en la piel intersegmental entre las placas abdominales, la cabeza y el tórax para succionar la hemolinfa de su hospedero. Extraído del manual de terrestres de la OIE, 2018.

De todos ellos, el que tiene mayor distribución y se presenta mayoritariamente en las colonias de *Apis mellifera* alrededor del mundo es *Varroa destructor*, siendo incluso prácticamente imposible encontrar una colonia sin algún grado de infestación, exceptuando solamente el continente de Oceanía (Australia).

Sudamérica es una de las zonas donde se repite este patrón de encontrar este parásito en abundancia (Rosenkranz et al., 2010).

2.1 Varroasis como principal vector para transmisión de enfermedades.

El varroa parasita a las abejas adultas ciñéndose en su tórax, cabeza y/o placas abdominales, asemejando a una garrapata (**Figura 4**). Para reproducirse, la hembra entra a las celdillas del panal antes de que se cierren, depositando sus huevos junto con las pupas en desarrollo dentro de ellas y permitiendo que puedan nutrirse correctamente parasitando a las mismas de inmediato.

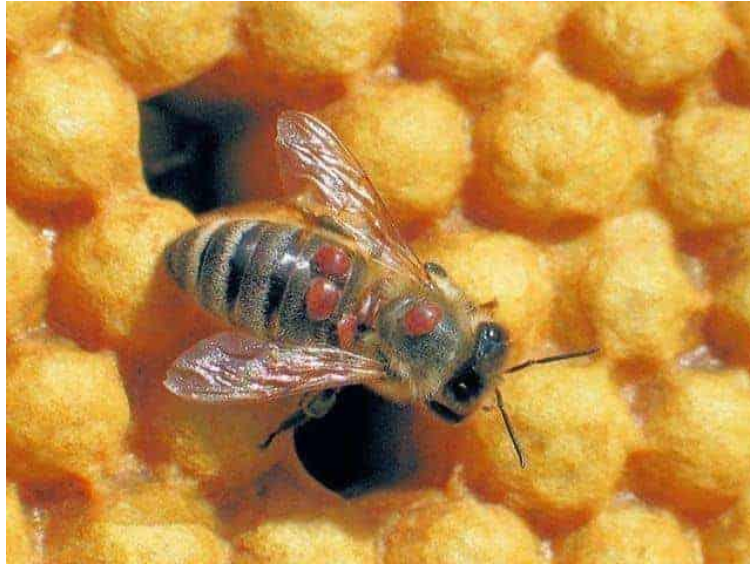


Figura 4: Imagen de abeja melífera adulta parasitada por varroa (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, Gobierno de México, 2021).

La parasitación perjudica la salud y correcto crecimiento de las pupas, así como también el desempeño de abejas adultas, causándoles alteraciones en el comportamiento, acortamiento de vida y debilidad ante enfermedades que pueden incluso alterar morfológicamente a la abeja (**Figura 5**) (OIE, 2018).

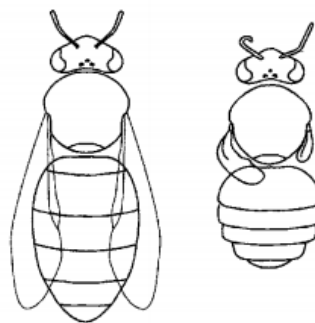


Figura 5: Diferencias morfológicas y de desarrollo entre abeja parasitada con varroa (derecha) y abeja no parasitada (izquierda). Normalmente se asocia la parasitación del varroa a estos efectos, lo que se observa en verdad es la consecuencia de la infección de los patógenos que el varroa transmite. Al comparar ambas, se hace evidente que la abeja parasitada presenta un menor crecimiento y deformidades en alas, abdomen y antenas. Debido a todos efectos perjudiciales, la abeja parasitada alcanza su adultez con movilidad reducida. Extraído del manual de terrestres de la OIE, 2018.

La infestación de colmenas sudamericanas por *Varroa destructor* es uno de los problemas más relevantes y perjudiciales para los apicultores de todo el mundo, puesto que su presencia está altamente ligada a la transmisión de numerosos virus, bacterias y enfermedades en las abejas, así como el posterior colapso de las colonias donde habitan, provocando pérdidas millonarias para los apicultores y la muerte de miles de éstos insectos al año (Maggi et al., 2016; Dainat & Neumann, 2012).

De los patógenos mencionados, podemos destacar principalmente los virus, de los cuales a su vez se rescatan específicamente los 7 que han sido identificados como los más recurrentes en apícolas sudamericanas: *Deformed Wings Virus* (DWV), *Black Queen Cell Virus* (BQCV), *Acute Bee Paralysis Virus* (APBV), *Chronic Bee Paralysis Virus* (CBPV), *Sacbrood Bee Virus* (SBV), *Kashmir Bee Virus* (KBV) e *Israeli Acute Paralysis Virus* (IAPV). Sus características se resumen en la **Tabla 1**.

Nombre del Virus	Familia u orden	Clasificación Baltimore	Efecto en el hospedero	Tipo de Transmisión
<i>Deformed Wings Virus</i> (DWV)	Iflaviridae	IV (ARN hebra simple con polaridad positiva).	Parálisis y deformidad en alas y abdomen.	Vertical (Transovárica) y horizontal (oral-fecal-canibalismo-parasitación)(de Miranda & Genersch, 2010).
<i>Black Queen Cell Virus</i> (BQCV)	Dicistroviridae	IV (ARN hebra simple con polaridad positiva).	Necrosis de la larva de reina en desarrollo y muerte de abejas adultas con alto título viral.	Vertical (Transovárica) y horizontal (oral-parasitación)(Naggar & Paxton, 2020).
<i>Acute Bee Paralysis Virus</i> (ABPV)	Dicistroviridae	IV (ARN hebra simple con polaridad positiva).	Debilidad, temblores y parálisis de extremidades y alas.	Horizontal (oral-parasitación)(Kukielka & Sánchez-vizcaíno, 2009).
<i>Chronic Bee Paralysis Virus</i> (CBPV)	Picornaviridae	IV (ARN hebra simple con polaridad positiva).	Parálisis aguda y muerte rápida en abejas adultas.	Horizontal (oral-fecal-parasitación)(Amiri et al., 2014).
<i>Sacbrood Bee Virus</i> (SBV)	Iflaviridae	IV (ARN hebra simple con polaridad positiva).	Necrosis en larvas de toda clase.	Vertical (Transovárica) y Horizontal (oral-parasitación)(Shen et al., 2005).
<i>Kashmir Bee Virus</i> (KBV)	Dicistroviridae	IV (ARN hebra simple con polaridad positiva).	Muerte poco después de la infección.	Vertical (Transovárica) y Horizontal (oral-fecal-parasitación)(Shen et al., 2005).
<i>Israeli Acute Paralysis Virus</i> (IAPV)	Dicistroviridae	IV (ARN hebra simple con polaridad positiva).	Parálisis aguda en extremidades y abdomen, además de tórax sin pelo y oscurecido.	Vertical (transovárica) y Horizontal (oral-fecal-sexual-parasitación)(Amiri et al., 2019).

Tabla 1: Clasificación, sintomatología y vías de transmisión de los 7 virus más prevalentes en Sudamérica.

3. Impacto del *Varroa destructor* en la economía chilena.

En nuestro país específicamente, se estima que hay un universo de 9.598 apicultores y más de 1 millón de colmenas distribuidas a lo largo del país (**Figura 6**). De ellas, se han registrado desde hace años pérdidas anuales por colapso de colmenas que van desde un 30-35% para apicultores profesionales, hasta un 50% para apicultores no profesionales (SAG, 2019).

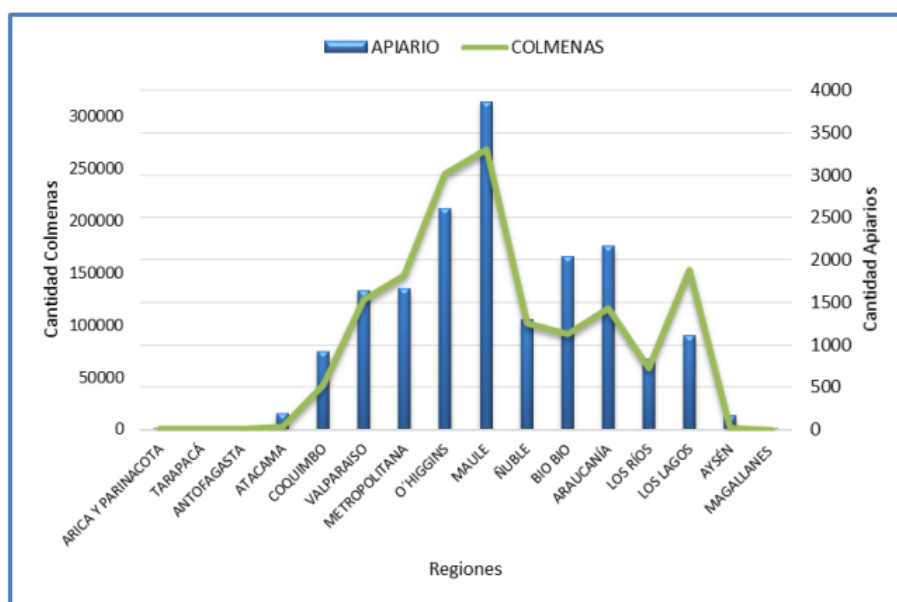


Figura 6: Distribución de las colmenas en el territorio nacional. Adaptado del boletín apícola no.7 2022 del SAG. Se observa que, tomando como punto de partida la Región Metropolitana, las regiones con la mayoría de los apiarios del país (y por lo tanto, número de abejas melíferas) hacia el sur son la del Maule y la de O'Higgins, mientras que hacia el Norte lideran las regiones de Valparaíso y Metropolitana.

En cuando a presencia de *Varroa destructor*, se detectó una prevalencia de 80% en colonias apícolas durante el año 2007 (Neira et al., 2007), y un último estudio en 2013 se detectó un 93% de prevalencia con un nivel de infestación en adultos

que va desde 5% a 9% (Aldea et al., 2013), lo que nos muestra una clara, sostenida y preocupante alza.

A pesar de esto, prácticamente no hay estudios en nuestro país de trazabilidad que aporten algún sistema constante y actualizado de detección de patógenos presentes en las colmenas chilenas ni los vectores que las afectan. Además, la información sobre las especies virales detectadas en *Apis mellifera* en nuestro país es escasa (Vargas et al., 2017).

Hasta el año 2017 se ha descrito que en cuanto a virus, en Chile hay presencia solamente de *Deformed Wings Virus* (DWV), *Black Queen Cell Virus* (BQCV), *Acute Bee Paralysis Virus* (APBV), *Chronic Bee Paralysis Virus* (CBPV) en la Región Metropolitana, O'Higgins, Maule, Bío-Bío y Araucanía, además de *Sacbrood Bee Virus* (SBV) en la región de Maule (Barriga et al., 2012; Rodríguez et al., 2012; Vargas et al., 2017). Adicionalmente, se ha observado la presencia de *Varroa destructor* con un 93% de prevalencia en las colonias, pero no se han hecho investigaciones específicas que puedan caracterizar los patógenos que puede contener este vector en el país (Rodríguez et al., 2014). Cabe destacar que los estudios existentes están orientados mayoritariamente hacia el área sur del país y no existe un estudio específico por región, ni tampoco uno exclusivo de la Región Metropolitana, de modo que no se ha documentado la realidad del estado sanitario de las abejas de dicha zona. Además, la información que se dispone se encuentra desactualizada, puesto que los últimos trabajos fueron publicados durante los años 2017 y 2018 (Iveros et al., 2018; Vargas et al., 2017). Este estudio analizará muestras de *Apis mellifera* no parasitada (entendiendo este concepto como la no presencia de parásitos externos visibles) y *Apis mellifera* parasitada con *Varroa destructor* provenientes de colmenas de distintos

puntos de la Región Metropolitana, esto con el objetivo de actualizar y aportar a la información disponible al respecto y además realizar un tamizaje en búsqueda de los 7 virus más abundantes en Latinoamérica mencionados anteriormente (DWV, BQCV, APBV, CBPV, SBV, KBV e IAPV). Cabe destacar que este último virus no ha sido detectado previamente en Chile.

Sumado a esto, esta investigación busca analizar la filogenia de los virus detectados para caracterizar de manera completa los patógenos que afectan la industria apícola nacional y, con base en estos datos, proponer una posible vía de ingreso a nuestro territorio.

Hipótesis

Deformed Wings Virus, Black Queen Cell Virus, Acute Bee Paralysis Virus, Chronic Bee Paralysis Virus, Sacbrood Bee Virus, Kashmir Bee Virus e Israeli Acute Paralysis Virus están presentes en colmenas de la Región Metropolitana de Chile y están emparentados genéticamente con virus de abeja en el extranjero.

Objetivo general

Detectar y analizar filogenéticamente nuestros virus de interés en muestras provenientes de colmenas de la Región Metropolitana de Chile.

Objetivos específicos

1. Detectar y aislar material genético viral perteneciente a los virus buscados en muestras de *Apis mellifera* recolectadas de distintas colmenas de la Región Metropolitana mediante RT-PCR.
2. Secuenciar y caracterizar bioinformáticamente los fragmentos purificados para construir un árbol filogenético para cada virus detectado en el país y proponer una vía de transmisión e ingreso de patógenos en la industria apícola chilena.

Materiales y Métodos

Para el análisis, las muestras obtenidas se someterán a RT-PCR para amplificación de fragmentos genómicos específicos para cada virus, con el fin de obtener toda la información asociada a la infección se realizará un análisis con NGS de un *pool* común de todas las muestras de la Región Metropolitana. Con esto, podremos identificar y caracterizar los patógenos virales que se encuentran en las colmenas de la región y los vectores presentes hasta la fecha.

Toma de muestras

Para este estudio, las muestras colectadas corresponden a abejas adultas y pupas en colmenas con presencia de *Varroa destructor* (confirmada por los mismos apicultores). Los individuos ideales eran aquellos que tuvieran parásitos externos visibles, malformaciones físicas o movilidad visiblemente reducida en el caso de las abejas adultas. Para las pupas la única preferencia era la observación de varroa.

Este criterio está basada principalmente en los hábitos de higiene de la colmena frente a signos de enfermedad en sus individuos (Hernández & Lorenzo, 2014).

Extracción de ARN

Para la extracción, se homogeneizaron los abdómenes de todos los individuos en 300 μ L de medio de transporte viral BD[®] de Fisher Scientific (MTV BD[®]), organizándose en grupos de 5 abdómenes.

Luego de asegurarse de homogeneizar todo completamente, se procedió a centrifugar cada solución a 7500 g durante 5 minutos para precipitar todo el material particulado presente y poder rescatar solamente el sobrenadante para continuar con el siguiente paso, puesto que el material genético de interés se encontraba en mayor proporción suspendido en el medio de transporte viral. Del sobrenadante se tomaron 250 μ L y se añadieron 750 μ L de TRIzol[®] Reagent más 200 μ L de Fenol UltraPure[™] para luego homogeneizar e incubar en hielo por 15 minutos.

Pasado dicho tiempo, se centrifugó la solución a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C para separar la fase orgánica y la fase acuosa. Se transfirió entonces la fase acuosa a un nuevo tubo (aproximadamente 600 μ L), donde se adicionaron 500 μ L de 2-propanol EMSURE[®] para luego incubarlo en hielo por 10 minutos.

Una vez incubada la muestra, se centrifugó nuevamente a 12.000 g por 10 minutos, manteniendo la temperatura a 4°C. Luego se desechó el sobrenadante sin que el precipitado se desprendiera, para luego lavar y resuspender el mismo en 1 mL de etanol al 70% EMPARTA[®].

La muestra se centrifugó una última vez a 7500 g durante 10 minutos a 4°C, para posteriormente desechar el sobrenadante y dejar secar el precipitado a temperatura ambiente por 10 minutos más.

Finalmente, se resuspendió el material genético en 25 μ L de agua libre de nucleasas y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Detección por RT-PCR

Para la detección de los virus de interés, se usó RT-PCR un paso usando Brilliant III ultrafast Master Mix de Agilent Technologies y de dos pasos con SuperScript® First-Strand de Invitrogen y GoTaq® DNA Polymerase.

El programa de temperaturas y los partidores utilizados para cada *screening* es expuesto en la **Tabla 2**, los cuales fueron seleccionados según referencias investigadas para la detección de cada virus.

Nombre del virus	Secuencia partidor delantero	Secuencia partidor reverso	Gen blanco de la amplificación
<i>Acute Bee Paralysis Virus</i>	AGCCACTATGTGCTATC GTAT	ATGGTGACCTCTGTGTC ATTA	Proteína de la cápside viral(207pb)(Grabensteiner et al., 2007).
<i>Black Queen Cell Virus</i>	AAG GGT GTG GAT TTC GTC AG	GGC GTA CCG ATA AAG ATG GA	Poliproteína estructural (700 pb)(Benieddou et al., 2001)
<i>Chronic Bee Paralysis Virus</i>	GCTATAATACGACTCAC TATAGG	CGGTGTTTAAACTTTT	Región de la polimerasa viral (455 pb)(Ribière et al., 2002).
<i>Deformed Wings Virus</i>	TCCATCAGGTTCTCCAA TAACGGA	CCACCCAAATGCTAACT CTAAGCG	Región de la polimerasa viral (451 pb)(Yue & Genersch, 2005).
<i>Kashmir Bee Virus</i>	GATGAACGTCGACCTAT TGA	TGTGGGTTGGCTATGA GTCA	Proteína viral no estructural (393 pb). (Tentcheva et al., 2004).
<i>Israeli Acute Paralysis Virus</i>	AGACACCAATCACGGA CCTCAC	AGATTTGTCTGTCTCCC AGTGCACAT	Extremo 3'UTR (475 bp) (Miranda et al., 2011).
<i>Sacbrood Bee Virus</i>	ACCAACCGATTCTCAG TAG	CCTTGGA ACTCTGCTGT GTA	Región de proteína de la cápside viral (487 pb)(Grabensteiner et al., 2007).

Tabla 2: Datos de partidores utilizados para estandarizar la RT-PCR para detectar cada uno de los 7 virus de *Apis mellifera* estudiados. La referencia usada para encontrar cada uno se cita en cada caso.

La primera RT-PCR de cada *screening* se realizó solamente con un control negativo, puesto que los controles positivos se obtenían al momento de observar una banda a la altura aproximada a la correspondiente para el tamaño del fragmento objetivo, y una vez obtenidos se incorporaban como controles positivos en todos los RT-PCR.

Todos los productos se sometieron a electroforesis en gel de Agarosa LE SeaKem®, cuyo porcentaje de concentración del gel varió entre 1% a 2% dependiendo del número de pares de bases del fragmento buscado. Todas las electroforesis se corrieron a 70 Voltios durante 30 minutos, cargando 5 µL de

muestra con buffer de carga y 2 µL de estándar de ADN de 100 bp Invitrogen™ en cada caso.

Los productos de las reacciones RT-PCR se almacenaron a -20°C para posterior purificación y secuenciación.

Purificación de productos de RT-PCR

Para purificar los productos de las reacciones RT-PCR se utilizó el *kit* NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up de Macherey-Nagel, siguiendo sus protocolos para purificar los fragmentos amplificados directamente desde la solución de la reacción RT-PCR y desde geles de agarosa de electroforesis.

El cDNA obtenido para cada producto de las reacciones RT-PCR se almacenó resuspendido en agua libre de nucleasas organizado según lugar de muestreo y virus detectado.

Secuenciación por Sanger o de terminación de cadena

Los fragmentos amplificados y purificados de las reacciones RT-PCR se secuenciaron con el método de Sanger (Sanger & Goulson, 1975), puesto que todos se trataban de fragmentos de menos de 1000 pares de bases.

Análisis filogenético

Las secuencias de cada virus identificado y fueron comparadas con secuencias reportadas para el mismo virus en distintos países del mundo en NCBI mediante el análisis de BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) y luego las secuencias con mayor similitud fueron organizadas con la herramienta de alineamiento de secuencias del programa MEGA-X (Kumar et al., 2018). Este análisis nos

permitió ordenar todas las secuencias desde la mayor a la menor similitud con nuestra muestra en un archivo FASTA, el cual posteriormente fue ingresado y analizado con un *bootstrap* de 1000 iteraciones con la herramienta en línea IqTree (Nguyen et al., 2014), la cual permite transformar los datos de similitud entre secuencias en el archivo FASTA a un árbol filogenético para cada virus analizado. El archivo obtenido de dicho análisis fue visualizado y reorganizado con el programa MEGA-X (Kumar et al., 2018) en su función de construcción y visualización de árboles filogenéticos, lo cual nos permitió obtener una representación visual de la filogenia de las muestras estudiadas.

Resultados

Toma de muestras

Para nuestro estudio, las muestras seleccionadas fueron pupas y abejas adultas recolectadas en distintos puntos de la Región Metropolitana, los cuales debían tener una distancia entre ellos mayor a la distancia promedio que puede alcanzar una abeja al volar fuera de la colmena: 13,5 km (Michener, 1974). Esto con el objetivo de asegurar que los virus que se detectaran en cada colmena muestreada eran propios de ese lugar geográfico y no producto de transmisión directa por contacto con otra de las colmenas muestreadas para este estudio. Las zonas geográficas seleccionadas para la toma de muestras fueron las comunas de San Pedro (Loica), San José de Maipo (Cajón del Maipo), Ñuñoa y Talagante. El tipo de muestras (abejas adultas o pupas) que se tomó de cada lugar sólo dependió de la disponibilidad en cada caso, puesto que no era necesario discriminar entre adultas y crías debido a que los virus analizados en este estudio infectan a ambas sin distinción. Los detalles del muestreo se encuentran en la **Figura 7** y la **Tabla 3**.

Nuestro criterio para extraer los individuos para muestreo fue capturar aquellos que estuvieran con movilidad reducida o totalmente inmóviles alrededor del panal, puesto que esto es un indicador de enfermedad y de rechazo social según el sistema de limpieza de la misma colmena (Hernández & Lorenzo, 2014) y además, aquellos que estuvieran visiblemente infestados por varroa. Los insectos capturados fueron almacenados en medio de transporte viral (MTV) a -80°C hasta la extracción de ARN.

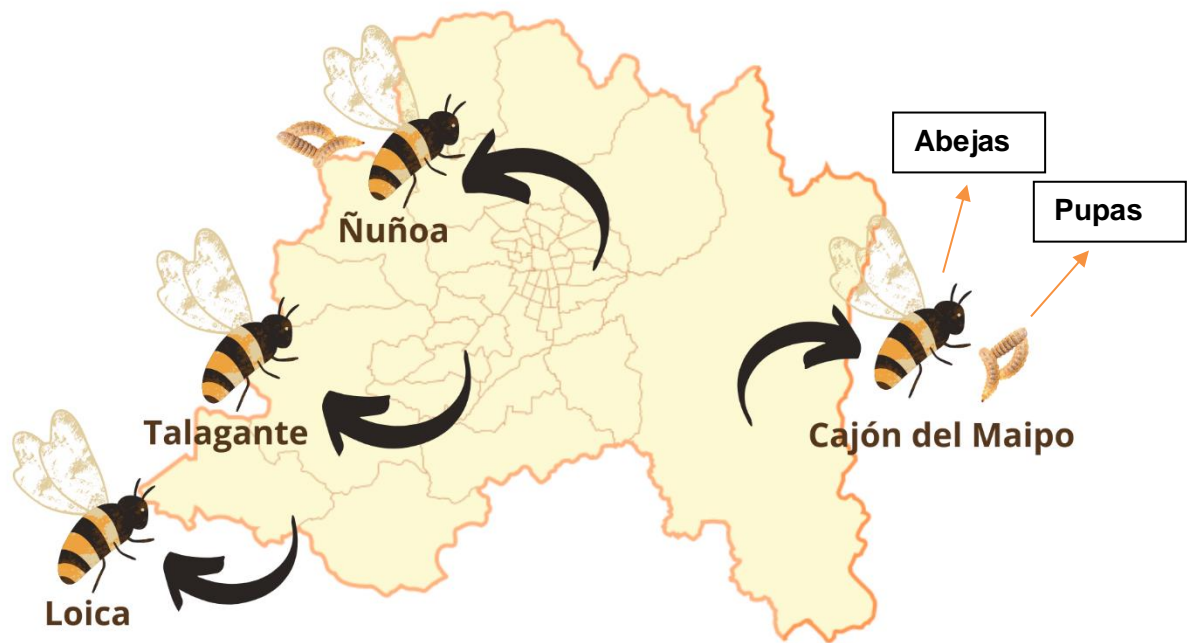


Figura 7: Puntos de toma de muestras en la Región Metropolitana. En la figura se especifica qué tipo de muestra se tomó en cada lugar (abejas y pupas o sólo abejas).

Lugar de toma de muestras	Cajón del Maipo	Ñuñoa	Talagante	Loica
Cajón del Maipo		36,7 km de distancia	50,7 km de distancia	104,7 km de distancia
Ñuñoa	36,7 km de distancia		38,7 km de distancia	98,8 km de distancia
Talagante	50,7 km de distancia	38,7 km de distancia		60,1 km de distancia
Loica	104,7 km de distancia	98,8 km de distancia	60,1 km de distancia	

Tabla 3: Datos de distancia aproximada entre los lugares de toma de muestras de *Apis mellifera* dentro de la Región Metropolitana. Todos los puntos de toma de muestras están a una distancia mayor al vuelo máximo de un individuo promedio de la especie, por lo que así se asegura que cada virus detectado es propio del lugar y la colmena muestreada y no producto de contagio entre las otras colmenas muestreadas.

Detección de virus mediante RT-PCR

Posterior al muestreo, las muestras almacenadas se descongelaron y se extrajeron los abdómenes de cada individuo, los cuales se ordenaron en grupos de 5 y se homogeneizaron en solución con MTV para extraer el ARN presente. Luego se realizaron las RT-PCR correspondientes y los productos de la reacción para cada *pool* de muestra se sometieron a electroforesis en gel de agarosa para la visualización de los fragmentos amplificados en cada ocasión (**Figura 8**), y al confirmar o descartar la presencia de la banda de interés para la detección de cada virus en todos nuestros grupos de muestras, los resultados fueron organizados en la **Tabla 4**.

Se observa una gran positividad para DWV, BQCV e IAPV independiente del lugar geográfico de toma de muestras, y es especialmente en las muestras provenientes de Ñuñoa donde se detectó la mayor variedad de virus (DWV, BQCV, IAPV, ABPV, CBPV y KBV).

Posteriormente, los productos de RT-PCR positivos para uno o más virus fueron almacenados y clasificados según zona de muestreo para luego ser purificados y secuenciados.

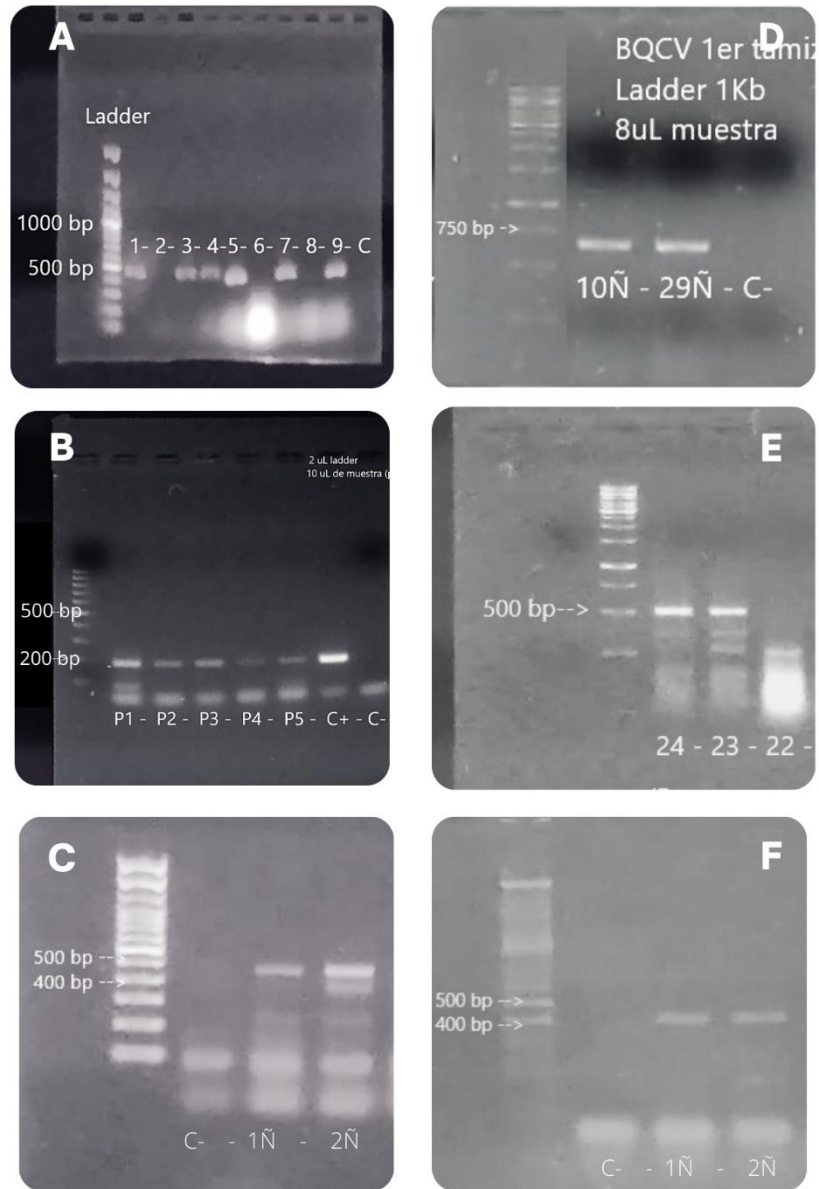


Figura 8: Perfil electroforético de la estandarización del RT-PCR para los virus estudiados. Los perfiles fueron obtenidos mediante electroforesis en geles de agarosa de distinta concentración, dependiendo del tamaño del fragmento que se buscaba amplificar en cada caso. **A:** Gel correspondiente a detección de DWV en *pools* de muestras provenientes de Ñuñoa identificadas numéricamente junto al control negativo (letra C). **B:** Gel correspondiente a detección de ABPV en *pools* de Ñuñoa con nomenclatura numérica (P1, P2, P3, etc.) Además se visualizan los controles positivo y negativo identificados como C+ y C- respectivamente. **C:** Gel correspondiente a detección de CBPV en *pools* de Ñuñoa designados con números consecutivos más la primera letra de su lugar de procedencia (1Ñ, 2Ñ, etc.). Se visualiza también el control negativo (C-). **D:** Gel correspondiente a detección de BQCV en *pools* de Ñuñoa designados como 10Ñ y 29Ñ, además del control negativo (C-). **E:** Gel correspondiente a detección de IAPV en *pools* de Ñuñoa con nomenclatura numérica. En esta oportunidad, el *pool* 22 figura como resultado negativo para comparar con los positivos (23 y 24). **F:** Gel correspondiente a detección de KBV en *pools* de Ñuñoa con nomenclatura numérica consecutiva. También se visualiza el control negativo (C-). En cada fotografía se indica la altura aproximada a la que aparecen las bandas, acorde al estándar de peso molecular utilizado en cada caso.

N° Pool	Procedencia	N muestral	Contenido Muestral	Tipo de muestras	ABPV	BQCV	CBPV	DWV	KBV	IAPV	SBV
1	Ñuñoa	5	M104 - M108	Abejas	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
2	Ñuñoa	5	M109 - M113	Abejas	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
3	Ñuñoa	5	M114 - M118	Abejas/Pupas	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
4	Ñuñoa	5	M119 - M123	Pupas	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
5	Ñuñoa	5	M124 - M128	Pupas	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
6	Ñuñoa	5	M129 - M133	Pupas	(-)* Deg	(-)* Deg	(-)* Deg	(-)* Deg	(-)* Deg	(-)* Deg	(-)* Deg
7	Ñuñoa	5	M134 - M138	Pupas	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
8	Ñuñoa	5	M139 - M143	Pupas	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
9	Ñuñoa	5	M144 - M148	Pupas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
10	Ñuñoa	5	M149 - M153	Pupas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
11	Ñuñoa	5	M154 - M158	Pupas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
12	Ñuñoa	5	M159 - M163	Pupas	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
13	Ñuñoa	5	M164 - M168	Pupas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
14	Ñuñoa	5	M169 - M173	Pupas	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
15	Ñuñoa	5	M174 - M178	Pupas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
16	Ñuñoa	5	M179 - M183	Pupas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
17	Ñuñoa	5	M184 - M188	Pupas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
18	Ñuñoa	5	M189 - M193	Pupas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
19	Ñuñoa	5	M194 - M198	Pupas	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
20	Ñuñoa	5	M199 - M203	Pupas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
21	Ñuñoa	5	M204 - M208	Pupas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
22	Ñuñoa	5	M209 - M213	Pupas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
23	Ñuñoa	5	M214 - M218	Pupas	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
24	Ñuñoa	5	M219 - M223	Pupas	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
25	Ñuñoa	5	M224 - M228	Pupas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
26	Ñuñoa	5	M229 - M233	Pupas	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
27	Ñuñoa	5	M234 - M238	Pupas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
28	Ñuñoa	5	M239 - M243	Pupas	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
29	Ñuñoa	5	M244 - M245	Pupas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
1	Cajón del Maipo	5	M01 - M05	Abejas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
2	Cajón del Maipo	5	M06 - M10	Abejas	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
3	Cajón del Maipo	5	M11 - M15	Abejas	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
4	Cajón del Maipo	5	M16 - M20	Abejas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
5	Cajón del Maipo	5	M21 - M25	Abejas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
6	Cajón del Maipo	5	M26 - M30	Abejas	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
7	Cajón del Maipo	5	M31 - M35	Abejas	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
8	Cajón del Maipo	5	M36 - M40	Abejas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
9	Cajón del Maipo	5	M41 - M45	Abejas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
10	Cajón del Maipo	5	M46 - M50	Abejas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
11	Cajón del Maipo	5	M51 - M55	Abejas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
12	Cajón del Maipo	5	M56 - M60	Abejas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
13	Cajón del Maipo	5	M61 - M65	Abejas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
14	Cajón del Maipo	5	M66 - M70	Abejas	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
15	Cajón del Maipo	5	M71 - M75	Abejas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
16	Cajón del Maipo	6	M76 - M81	Abejas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
1	Loica	5	M01 - M05	Abejas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
2	Loica	4	M06 - M09	Abejas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
1	Talagante	5	M 01 - M05	Abejas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
2	Talagante	5	M05 - M10	Abejas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
3	Talagante	5	M10 - M15	Abejas	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
4	Talagante	5	M15 - M20	Abejas	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
5	Talagante	5	M20 - M25	Abejas	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
6	Talagante	5	M25 - M30	Abejas	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
7	Talagante	5	M30 - M35	Abejas	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Tabla 4: Datos e información de *pools* de muestras disponibles, así como sus resultados para la detección de cada virus con RT-PCR. Se destaca en amarillo el *pool* 6 proveniente de Ñuñoa, puesto que se clasifica como degradado debido a que se observa gran cantidad de material genético de muy poco tamaño y sin aparición de bandas en todas las RT-PCR y electroforesis realizadas.

Secuenciación de cDNA de muestras positivas

Los productos de RT-PCR clasificados como positivos para un determinado virus y almacenados fueron purificados según el protocolo de NucleoSpin® Gel and PCR *Clean-up* de Macherey-Nagel, procesándolos directamente de la solución en caso de obtener un producto PCR único (visualización de una banda única en la electroforesis) y purificándolos desde gel en caso de tener en solución fragmentos de amplificaciones inespecíficas (aparición de múltiples bandas en la electroforesis).

Los fragmentos purificados fueron secuenciados por Sanger para comprobar que se tratara efectivamente del virus que esperábamos detectar y no productos de una amplificación inespecífica.

Al analizar con blastn las secuencias de nuestros fragmentos se trabajó con aquellas obtenidas en sentido 5' – 3', y se obtuvieron múltiples relaciones de similitud de secuencias nucleotídicas que se ordenan de mayor a menor porcentaje de identidad, el cual es un índice que señala qué tanta semejanza existe entre las secuencias analizadas.

Para DWV, se purificaron y secuenciaron con éxito muestras de Ñuñoa y de Talagante, las cuales tienen alta similitud con varios aislados virales de DWV (lo que nos confirma la presencia de este virus en ambas zonas muestreadas) que provienen de zonas como Siria e Israel, además de aislados asociados a colmenas infestadas con varroa en el caso de las muestras de Talagante. Todos los detalles se exponen en la **Figura 9**.

A)

Sequences producing significant alignments										
Download ▼ Select columns ▼ Show 100 ▼ ?										
select all 100 sequences selected										
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer										
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession		
<input checked="" type="checkbox"/> Deformed wing virus isolate DWV-Syria, complete genome	Deformed wing virus	666	666	98%	0.0	<u>96.38%</u>	10165	MW265929.1		
<input checked="" type="checkbox"/> Deformed wing virus isolate Varroa-infested-colony-DJE202, complete genome	Deformed wing virus	666	666	98%	0.0	96.38%	10167	KJ437447.1		
<input checked="" type="checkbox"/> Deformed wing virus isolate GEO-1-A-Clone 1 RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) gene, partial cds	Deformed wing virus	662	662	98%	0.0	96.14%	452	KX911819.1		
<input checked="" type="checkbox"/> Deformed wing virus isolate DWV_Israel-2018 ORF1 gene, complete cds	Deformed wing virus	662	662	98%	0.0	96.14%	10163	MW397639.1		
<input checked="" type="checkbox"/> VDV-1/DWV recombinant 4 strain Zriifin polyprotein gene, complete cds	VDV-1/DWV recombina...	662	662	98%	0.0	96.14%	9473	JF440526.1		

B)

Sequences producing significant alignments										
Download ▼ Select columns ▼ Show 100 ▼ ?										
select all 100 sequences selected										
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer										
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession		
<input checked="" type="checkbox"/> Deformed wing virus isolate Varroa-infested-colony-DJE202, complete genome	Deformed wing virus	657	657	97%	0.0	<u>95.89%</u>	10167	KJ437447.1		
<input checked="" type="checkbox"/> Deformed wing virus isolate GEO-1-A-Clone 1 RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) gene, partial cds	Deformed wing virus	653	653	97%	0.0	95.65%	452	KX911819.1		
<input checked="" type="checkbox"/> Deformed wing virus isolate DWV_Israel-2018 ORF1 gene, complete cds	Deformed wing virus	653	653	97%	0.0	95.65%	10163	MW397639.1		
<input checked="" type="checkbox"/> VDV-1/DWV recombinant 4 strain Zriifin polyprotein gene, complete cds	VDV-1/DWV recombina...	653	653	97%	0.0	95.65%	9473	JF440526.1		
<input checked="" type="checkbox"/> Deformed wing virus isolate GEO-1-B-Clone 4 RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) gene, partial cds	Deformed wing virus	648	648	97%	0.0	95.41%	452	KX911832.1		

Figura 9: Resultados del análisis utilizando blastn de las secuencias obtenidas para *Deformed Wings Virus*. Los puntos de toma de muestras purificados y secuenciados con éxito corresponden a **Ñuñoa (A)** y **Talagante (B)**. Se destaca subrayado en rojo el porcentaje de identidad del primer resultado más cercano en cada alineamiento, los que van desde 95% hacia arriba.

Para BQCV, las muestras purificadas y secuenciadas provienen de Ñuñoa, Talagante y Cajón del Maipo.

La secuencia obtenida para las muestras de Ñuñoa no tuvo ninguna similitud significativa al analizarla con blastn, por lo que no se continuó con su análisis filogenético puesto que no se pudo comprobar que se tratara de BQCV y no de una amplificación inespecífica.

Para las secuencias correspondientes a las muestras de Talagante y Cajón del Maipo se obtuvieron nuevamente altas similitudes con secuencias reportadas para BQCV, por lo que también se comprueba con esto la presencia del virus en las colmenas muestreadas.

Además, las similitudes más cercanas encontradas son secuencias provenientes de Estados Unidos. Los detalles se exponen en la **figura 10**.

A)

Description	BQCV Nunoa Forward
Molecule type	dna
Query Length	181
Other reports	?

! No significant similarity found. For reasons why, [click here](#)

B)

Sequences producing significant alignments

Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Black queen cell virus isolate 15 capsid protein gene, partial cds	Black queen cell...	779	779	75%	0.0	94.31%	700	KP730016.1
<input checked="" type="checkbox"/> Black queen cell virus isolate BQCV_No16_Am056-SH2019, complete genome	Black queen cell...	779	779	75%	0.0	94.31%	8458	MZ821815.1
<input checked="" type="checkbox"/> Black queen cell virus isolate 04 capsid protein gene, partial cds	Black queen cell...	775	775	75%	0.0	94.29%	700	KP730005.1
<input checked="" type="checkbox"/> Black queen cell virus strain Apis mellifera-HB21-PA-USA-2007 capsid protein gene, partial cds	Black queen cell...	775	775	75%	0.0	94.29%	687	HQ655490.1
<input checked="" type="checkbox"/> Black queen cell virus strain Pollen-P30-PA-USA-2007 capsid protein gene, partial cds	Black queen cell...	775	775	75%	0.0	94.29%	687	HQ655482.1

C)

Sequences producing significant alignments

Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Black queen cell virus isolate LJU/2017 capsid protein gene, partial cds	Black queen cell...	748	748	99%	0.0	92.99%	653	MH900004.1
<input checked="" type="checkbox"/> Black queen cell virus isolate 279/2017 capsid protein gene, partial cds	Black queen cell...	748	748	99%	0.0	92.99%	653	MH899977.1
<input checked="" type="checkbox"/> Black queen cell virus isolate 274/2017 capsid protein gene, partial cds	Black queen cell...	748	748	99%	0.0	92.99%	653	MH899973.1
<input checked="" type="checkbox"/> Black queen cell virus isolate Bombus-Gos/2018 capsid protein gene, partial cds	Black queen cell...	748	748	99%	0.0	92.99%	653	MW488258.1
<input checked="" type="checkbox"/> Black queen cell virus isolate 115/2009 capsid protein gene, partial cds	Black queen cell...	745	745	96%	0.0	93.55%	653	MH899952.1

Figura 10: Resultados del análisis utilizando blastn de las secuencias obtenidas para *Black Queen Cell Virus*. Los puntos de toma de muestras purificados y secuenciados con éxito corresponden a **Nuñoa (A)**, **Talagante (B)** y **Cajón del Maipo (C)**. Los valores van desde 92% hacia arriba.

En el caso de ABPV, las muestras secuenciadas con éxito provenían de Cajón del Maipo, pero al analizar la secuencia en busca de similitudes, no se encontraron relaciones significativas, por lo que no se pudo confirmar la presencia de ABPV en nuestras muestras y se descartó de este estudio (**figura 11**).

Description	ABPV CDM
Molecule type	dna
Query Length	94
Other reports	?


 No significant similarity found. For reasons why [click here](#)

Figura 11: Resultados del análisis utilizando blastn de las secuencias obtenidas para *Acute Bee Paralysis Virus*. El punto de toma de muestras purificado y secuenciado con éxito corresponde a **Cajón del Maipo**. No se encontraron similitudes significativas en la base de datos, así que se descartó la secuencia y la presencia de ABPV en este estudio.

Para IAPV, las secuencias obtenidas correspondieron a muestras provenientes de Ñuñoa y Cajón del Maipo. Si bien también obtuvieron secuencias con similitudes significativas, dichas secuencias similares no correspondían a especies virales, si no a subunidades ribosomales de *Apis mellifera*, de modo que no se puede confirmar la presencia de IAPV en las colmenas muestradas y se puede especular que la amplificación obtenida corresponde en verdad a una unión inespecífica de los partidores al genoma de abeja melífera presente en las muestras (**figura 12**).

A) Sequences producing significant alignments Download ▾ Select columns ▾ Show 100 ▾ ?

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Diprion similis small subunit ribosomal RNA (LOC124415196). rRNA	Diprion similis	120	120	29%	2e-22	79.08%	1914	XR_006930178.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rectilamina sp. UCR ENT 00084928 voucher UCR_ENT 00084928 small subunit ribosomal RNA gene, p...	Rectilamina sp...	120	120	29%	2e-22	78.95%	1350	MT793258.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Ninomimus flavipes 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ninomimus flavi...	120	120	29%	2e-22	78.95%	741	AY264352.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Porocephalus sp. JG2020 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Porocephalus s...	117	117	29%	2e-21	78.85%	1810	MT387144.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Neodiprion virginiana small subunit ribosomal RNA (LOC124310002). rRNA	Neodiprion virgi...	117	117	29%	2e-21	78.57%	1914	XR_006909564.1

B) Sequences producing significant alignments Download ▾ Select columns ▾ Show 100 ▾ ?

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Apis florea small subunit ribosomal RNA (LOC100866091). ncRNA	Apis florea	316	316	62%	1e-81	82.30%	1919	XR_001112972.2
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Apis mellifera uncharacterized LOC113219380 (LOC113219380). partial mRNA	Apis mellifera	316	316	62%	1e-81	82.30%	982	XM_026446000.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Apis mellifera small subunit ribosomal RNA (LOC113219341). rRNA	Apis mellifera	316	316	62%	1e-81	82.30%	1923	XR_003306369.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence, isolate: Apm_Ok01	Apis mellifera	316	316	62%	1e-81	82.30%	1720	AB917944.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apis mellifera isolate MSS3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Apis mellifera	316	316	62%	1e-81	82.30%	778	HM778169.1

Figura 12: Resultados del análisis utilizando blastn de las secuencias obtenidas para *Israeli Acute Paralysis Virus*. Los puntos de toma de muestras purificados y secuenciados con éxito corresponden a **Ñuñoa (A)** y **Cajón del Maipo (B)**. Para ambos, la mayor similitud corresponde a secuencias ribosomales de distintas especies de *Apis*.

En el caso de CBPV, se purificaron y secuenciaron muestras provenientes de Ñuñoa, las cuales al analizarse con la herramienta blastn se clasifican como similares a secuencias cromosómicas de diferentes especies y organismos diferentes a nuestros virus de interés o incluso diferentes a *Apis mellifera*, por lo que los resultados son inconsistentes para confirmar la presencia de CBPV. Los detalles se encuentran en la **figura 13**.

Sequences producing significant alignments											
Download Manage Columns Show 100											
select all 0 sequences selected											
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer											
Description	Scientific Name	Common Name	Taxid	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
<input type="checkbox"/> Quercus robur genome assembly chromosome: 8	Quercu...	NA	38942	52.7	52.7	69%	0.010	78.46%	68065914	QW028771.1	
<input type="checkbox"/> Accipiter gentilis genome assembly chromosome: 7	Accipite...	Norther...	8957	52.7	52.7	58%	0.010	85.19%	44895232	QV839367.1	
<input type="checkbox"/> Acomys russatus genome assembly chromosome: 10	Acomys...	golden s...	60746	52.7	52.7	89%	0.010	73.81%	78787447	LR877221.1	
<input type="checkbox"/> Lutra lutra genome assembly chromosome: 15	Lutra lutra	Eurasia...	9657	51.8	51.8	41%	0.010	90.00%	69992071	LR738417.1	
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Mus pahari insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 3 (Igf2bp3), transc...	Mus pa...	shrew m...	10093	50.9	50.9	61%	0.036	79.31%	3838	XM_029534714.1	

Figura 13: Resultados del análisis utilizando blastn de las secuencias obtenidas para *Chronic Bee Paralysis Virus*. El punto de toma de muestras purificado y secuenciado con éxito corresponde a **Ñuñoa**.

Finalmente, para KBV se obtuvo una secuencia proveniente de muestras de colmenas de Ñuñoa y obtuvo altas similitudes para secuencias reportadas para KBV en otras zonas, de modo que con estos resultados se confirma la presencia de este virus en colmenas de Ñuñoa en la Región Metropolitana. Más detalles se encuentran en la **figura 14**.

Sequences producing significant alignments											
Download Select columns Show 100											
select all 100 sequences selected											
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer											
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession			
<input checked="" type="checkbox"/> Kashmir bee virus isolate FTA1-2, complete genome	Kashmir bee virus	505	505	99%	3e-138	92.59%	9496	MT096516.1			
<input checked="" type="checkbox"/> Kashmir bee virus, complete genome	Kashmir bee virus	505	505	99%	3e-138	92.59%	9524	NC_004807.1			
<input checked="" type="checkbox"/> Kashmir bee virus isolate 990927C-11 RNA polymerase gene, partial cds	Kashmir bee virus	505	505	99%	3e-138	92.59%	414	AF200331.1			
<input checked="" type="checkbox"/> Kashmir bee virus isolate mib5 RNA polymerase gene, partial cds	Kashmir bee virus	505	505	99%	3e-138	92.59%	414	AF135854.1			
<input checked="" type="checkbox"/> Kashmir bee virus isolate 941227B-1 RNA polymerase (pol) gene, partial cds	Kashmir bee virus	505	505	99%	3e-138	92.59%	414	AF085478.2			

Figura 14: Resultados del análisis con blastn de las secuencias obtenidas para *Kashmir Bee Virus*. El punto de toma de muestras purificado y secuenciado con éxito fue **Ñuñoa**.

En resumen, con los datos obtenidos mediante el análisis de blastn fue posible comprobar la presencia e identidad de 3 virus de *Apis mellifera*: *Deformed Wings Virus*, *Black Queen Cell Virus* y *Kashmir Bee Virus*. A partir de esta información y de los alineamientos con las secuencias obtenidas para nuestras muestras

también nos fue posible construir árboles filogenéticos para cada uno de ellos. Las secuencias de IAPV, CBPV y ABPV no arrojaron similitud con secuencias correspondientes a los patógenos buscados, ya sea por una degradación del material genético de los productos de RT-PCR purificados o porque los mismos fueron producto de una unión inespecífica de los partidores al material genético presente en la muestra.

Filogenia

Filogenia de *Deformed Wing Virus*

Para DWV se purificaron los productos de RT-PCR de 2 lugares de muestreo: Talagante y Ñuñoa.

Con el árbol filogenético obtenido para ellos, podemos observar que ambas secuencias obtenidas de nuestras muestras provenientes de la Región Metropolitana tienen un índice de *bootstrap* de 73 entre sí, lo que indica que están emparentadas de una manera significativa. El parámetro *bootstrap* es una medida de soporte de los árboles filogenéticos, cuyo fundamento detallado se encuentra descrito en el trabajo de Hesterberg y que indica que a valores mayores a 50, los resultados pueden interpretarse como fiable (Hesterberg, 2011). Los valores bajo 50 indican que la asociación filogenética entre los dos elementos del nodo no está tan respaldada por los datos disponibles, lo que para nosotros se interpreta como una baja probabilidad de que los dos elementos del nodo estén realmente emparentados.

Continuando con el análisis del árbol obtenido, nuestras secuencias de DWV tienden a asociarse mayoritariamente con otras de origen asiático y europeo.

El árbol filogenético obtenido en este análisis se expone en la **figura 15**.

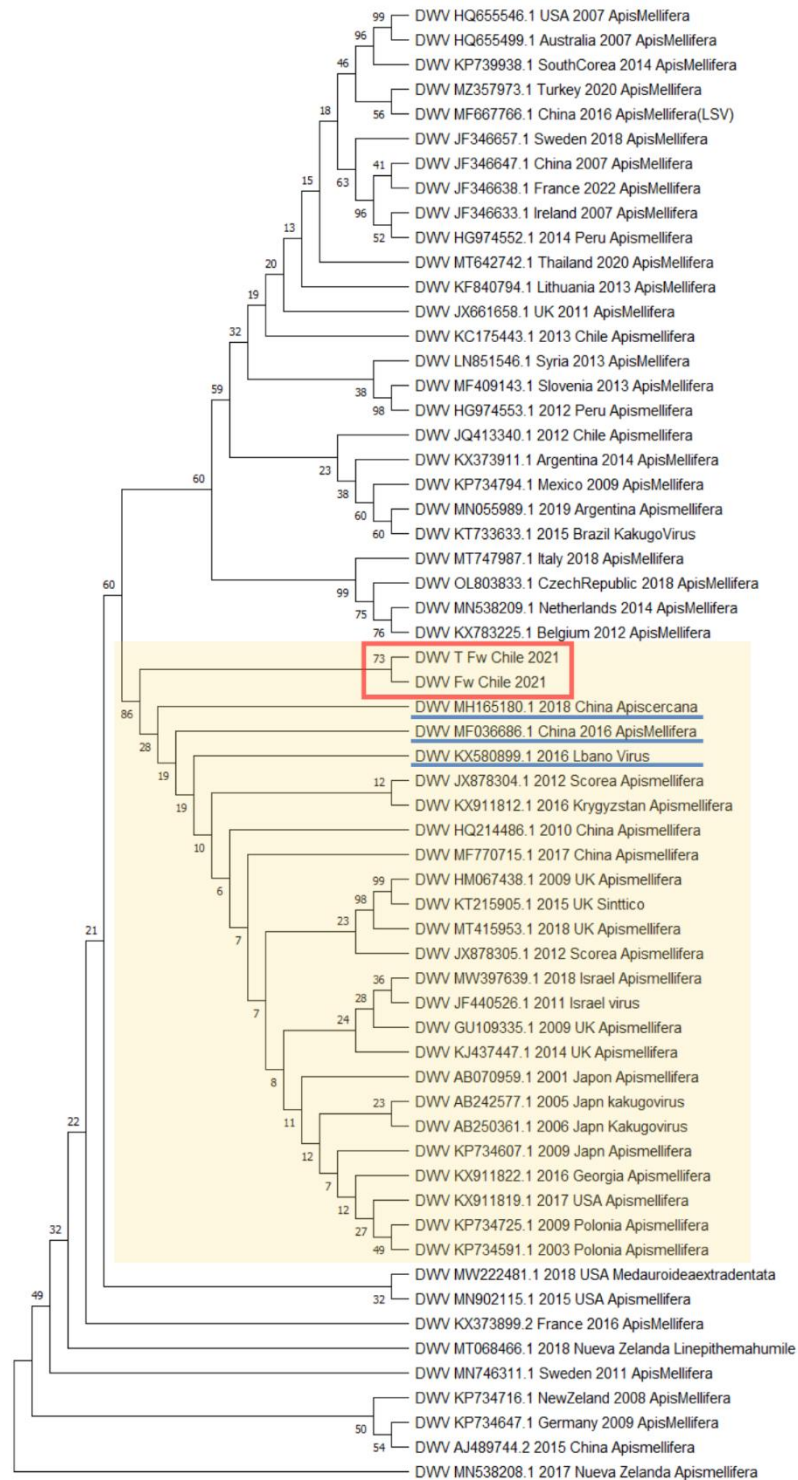


Figura 15: Árbol filogenético de las secuencias obtenidas para *Deformed Wings Virus* en nuestra investigación (destacadas con un rectángulo rojo en la imagen). La rama de similitud más cercana se encuentra destacada con naranja suave, y dentro de ella se subrayan en azul las 3 secuencias más cercanas a las obtenidas en este estudio, definidas por el valor de *bootstrap*.

Filogenia de *Kashmir Bee Virus*

Para *Kashmir Bee Virus* se purificó la secuencia correspondiente al muestreo de Ñuñoa, la cual presentó una similitud significativa con la rama destacada con un índice de *bootstrap* 69.

Al analizar las otras secuencias similares en la misma rama filogenética, podemos notar la presencia de secuencias provenientes de países asiáticos, europeos, norteamericanos y de Oceanía.

Los países sudamericanos presentes en la rama filogenética más cercana son Argentina y Chile.

Más detalles se exponen en la **figura 16**.

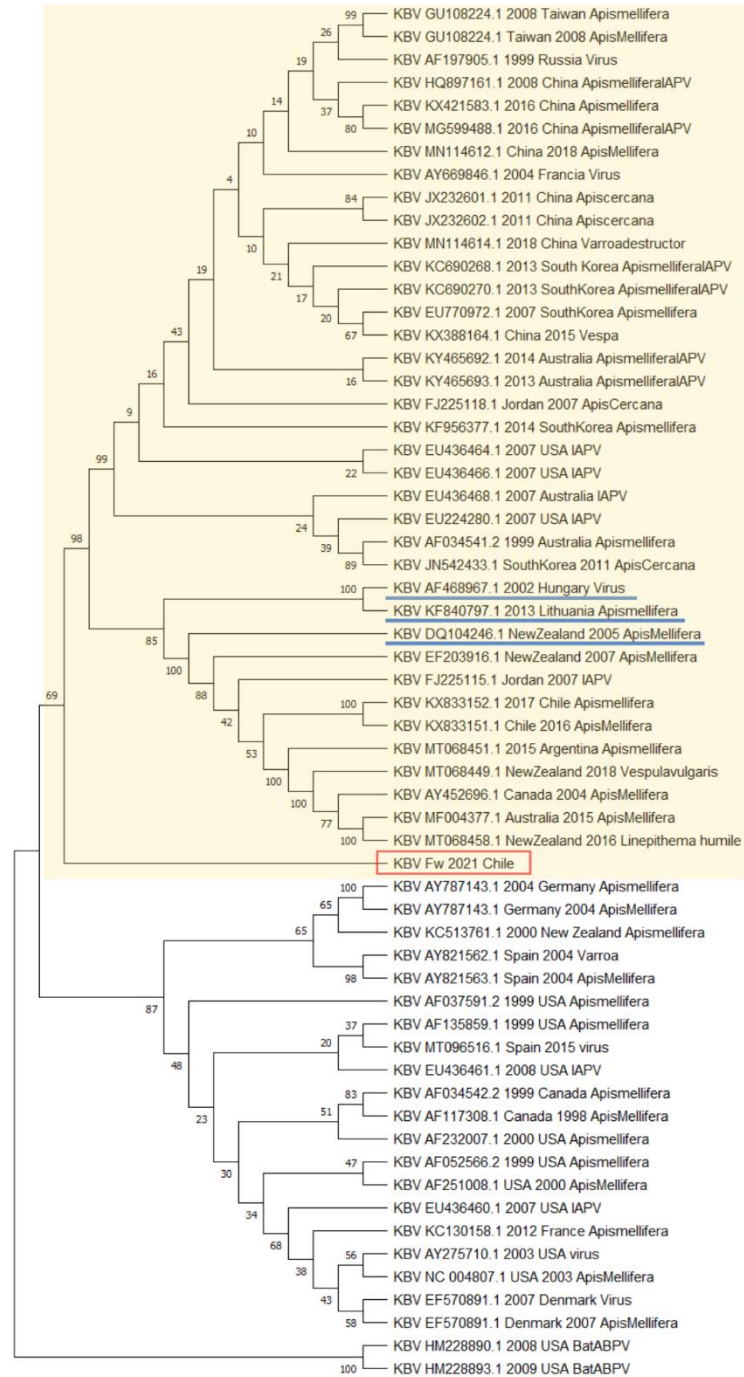


Figura 16: Árbol filogenético para *Kashmir Bee Virus* en nuestra investigación (destacada con un rectángulo rojo en la imagen). La rama de parentesco más cercano se encuentra destacada con naranja suave, y dentro de ella se subrayan en azul las 3 secuencias más cercanas a las obtenidas en este estudio, definidas por el valor de *bootstrap*.

Filogenia de *Black Queen Cell Virus*

Para *Black Queen Cell Virus* se obtuvieron secuencias provenientes de las muestras de Cajón del Maipo y Talagante, las cuales tienen un índice de *bootstrap* 99 entre sí, indicando que son muy cercanas filogenéticamente.

Sin embargo, la rama destacada como más cercana genéticamente tiene índice de *bootstrap* de sólo 40, por lo que los parentescos establecidos a partir de estos datos no tiene tanta fiabilidad como pueden tener otros con índice *bootstrap* más alto y es menos probablemente que estén realmente relacionados (Hesterberg, 2011).

De cualquier forma, se destaca la cercanía filogenética con secuencias provenientes de países sudamericanos, siendo secuencias de Brasil las más cercanas a nuestras secuencias.

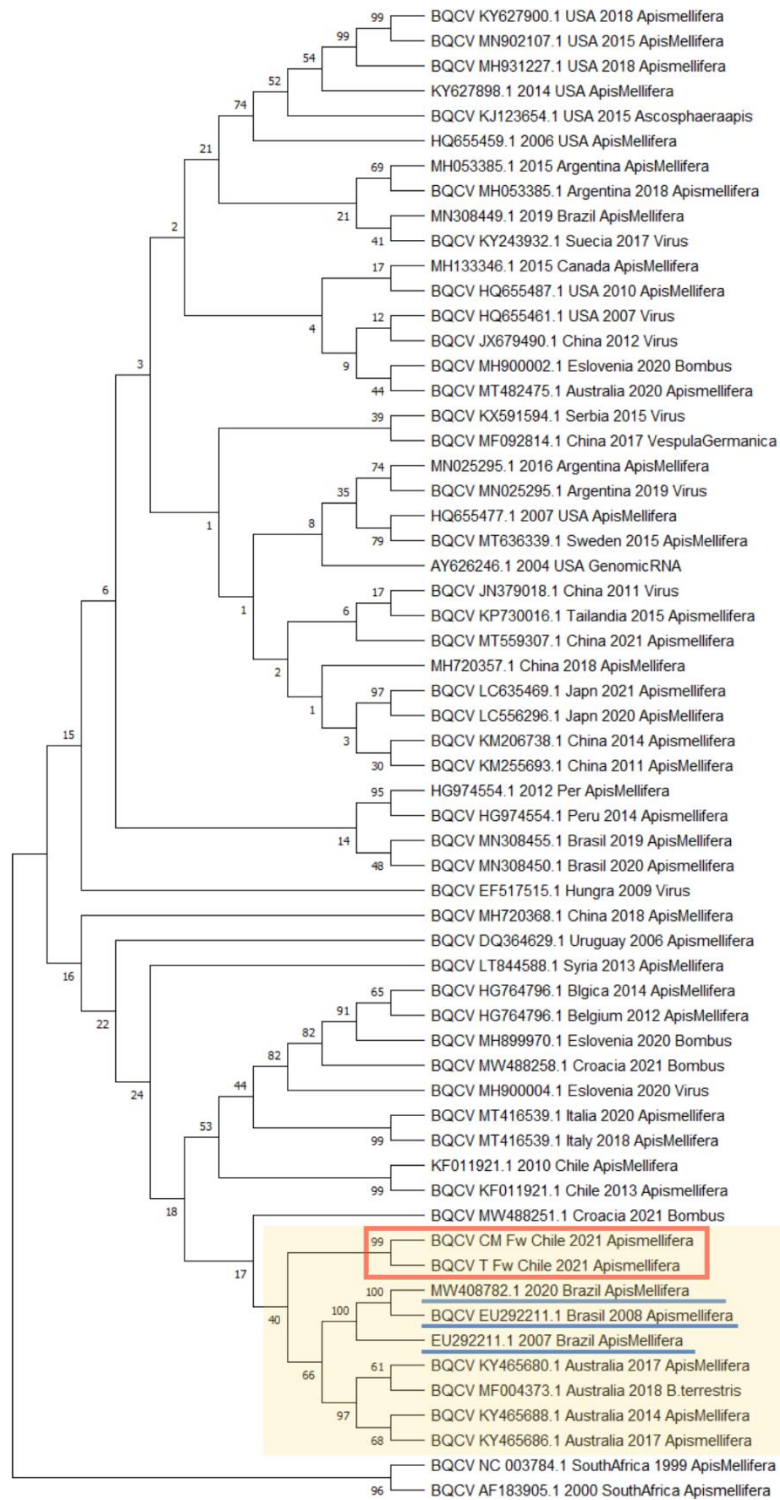


Figura 17: Árbol filogenético de las secuencias obtenidas para *Black Queen Cell Virus* en nuestra investigación (destacadas con un rectángulo rojo en la imagen). La rama de similitud más cercana se encuentra destacada con naranja suave, y dentro de ella se subrayan en azul las 3 secuencias más cercanas a las obtenidas en este estudio, definidas por el índice de *bootstrap*.

Discusión

El *screening* realizado para detectar los 7 virus más prevalentes de sudamérica en la Región Metropolitana de nuestro país hecho mediante la estandarización y ejecución de RT-PCR fue una herramienta de gran ayuda a la hora de detectar en primera instancia los patógenos buscados y obtener un reporte parcial de los virus circulantes en la región.

Los resultados obtenidos de dichos experimentos deberían ser interpretados con mucho cuidado y siempre con posterior confirmación mediante la secuenciación del segmento obtenido para verificar que correspondiera al fragmento de material genético que se deseaba amplificar en efecto y no un producto de amplificación inespecífica de la reacción RT-PCR.

En cuanto al análisis filogenético, se puede estipular que los datos obtenidos con dicho análisis nos son de gran ayuda para actualizar la información sobre los patógenos virales circulando actualmente y sobre el estado sanitario en las colmenas de la Región Metropolitana, así como también trazar una posible vía de ingreso al país o de distribución viral en territorio nacional.

Al estudiar las secuencias de *Deformed Wing Virus* nacionales se observa que si bien están significativamente emparentadas entre sí, las pequeñas diferencias que presentan pueden deberse a que son variantes que pudieron desarrollarse independientemente debido a su lejanía geográfica o a una alta variabilidad del virus al ser transmitido de hospedero a hospedero en el territorio nacional.

Al comparar las secuencias obtenidas para nuestras muestras y secuencias del resto del mundo, se observa que nuestras secuencias tienen mayor similitud con otras de origen asiático y europeo, donde podemos destacar a China y el Líbano. Con estos datos, es posible establecer teorías de transmisión de patógenos basada en redes de importación de núcleos apícolas y productos como miel, cera y polen, puesto que China destaca notablemente en la lista de países dedicados al oficio del cual Chile recibe importaciones (ODEPA, 2018).

Podemos también destacar entre las secuencias de Asia presentes en la rama más cercana a las secuencias obtenidas la significativa aparición de múltiples secuencias de un virus japonés de *Apis mellifera* (Kakugo virus), el cual está identificado como una variante de DWV, específicamente del subtipo DWV-A (Fei et al., 2019).

Estos datos nos pueden señalar que la variante del patógeno circulando en colmenas de la Región Metropolitana es cercana genéticamente a dicha variante del virus.

En cuanto a su cercanía filogenética con secuencias provenientes de China, se puede establecer la hipótesis de que la especie circulante actualmente en la Región metropolitana pudo haber sido introducida mediante importaciones provenientes de dicho país tanto de núcleos como de productos de consumo, puesto que los patógenos pueden viajar en ambos (OIE, 2021) y como ya se mencionó anteriormente, China es un fuerte exportador a nivel mundial de ellos (ODEPA, 2018).

Además se puede establecer que al tener en su árbol tantas secuencias de *Kakugo virus* presentes, el DWV actualmente presente en nuestra Región se asemeja en mayor medida al subtipo A, siendo así más cercano a la rama

genética original del virus (Fei et al., 2019). Esto nos señala que muy probablemente el DWV detectado en Chile se haya mantenido cercano al de una antigua introducción en el país.

Para la secuencia obtenida de *Kashmir Bee Virus* en Ñuñoa se obtuvo un grupo de parentesco variado que abarca variados países de zonas asiáticas y europeas, de donde destacamos secuencias provenientes de Hungría, Lituania y Nueva Zelanda. Esto podría explicarse nuevamente mediante trazabilidad de importaciones de productos apícolas, y específicamente Nueva Zelanda destaca también entre los países exportadores de productos apícolas a nivel mundial y específicamente a Chile sólo después de China (ODEPA, 2018).

Además, al haber reportes previos de este virus en Chile que se encuentran dentro de una misma rama filogenética, también puede postularse una transmisión a nivel nacional del patógeno.

Cabe destacar que los países sudamericanos presentes en la rama filogenética más cercana son Argentina y Chile, pudiendo proponerse además una transmisión a través de la cordillera o nacional avanzando desde regiones en el sur del país (específicamente la Región del Bío-Bío) hasta la Región Metropolitana, que es donde lo detectamos en esta investigación (Iveros et al., 2018).

También se puede observar que de la misma forma que el DWV, KBV presenta numerosas secuencias emparentadas cercanamente que pertenecen a otro virus: IAPV.

Si bien se reconocen como dos virus distintos, no es sorprendente que su cercanía filogenética se evidencie a tal punto, puesto que ambos son parte de un trío viral

muy similar genéticamente de la familia *Dicistroviridae*: ABPV, KBV e IAPV. Los dos últimos tienen una relación aún más estrecha, la cual incluso llevó a identificar las primeras caracterizaciones de IAPV como una variante del KBV (Miranda et al., 2011).

Un detalle muy importante del reporte de KBV es que su presencia en Chile no está aún reconocida por el Servicio Agrícola y Ganadero, de modo que se sigue reportando como ausente (SAG, 2021). Con este estudio, refutamos esta información y llamamos a actualizar el reporte de estado sanitario nacional, puesto que además de nuestro laboratorio ya existen reportes de KBV en Chile desde el año 2018 (Iveros et al., 2018).

Finalmente, para *Black Queen Cell Virus* se observa que las secuencias obtenidas son muy cercanas entre sí a pesar de la distancia geográfica entre ellas (50,7 km), presentando un 99 de índice *bootstrap*. Esto podría deberse a una baja variabilidad del virus al transmitirse o porque la infección de ambos puntos de toma de muestra fue de un mismo origen, lo que se podría respaldar al observar que la mayor tríada cercana filogenéticamente de las secuencias corresponde a secuencias reportadas en Brasil, el cual es el mayor exportador de productos apícolas dentro de sudamérica (ODEPA, 2018).

Contando con toda esta información, podemos proponer el desarrollo de una política regulatoria de importaciones más rigurosa, así como un sistema de vigilancia con muestreos y reportes sanitarios más frecuentes. Todo esto en un esfuerzo conjunto para evitar la expansión, el rápido contagio y origen de

variantes endémicas entre los apiarios chilenos, así como mitigar la preocupante alza del riesgo de desorden del colapso de colonias.

Esperamos que este estudio sea un aporte no sólo como un antecedente para continuar con futuras investigaciones sobre el estado sanitario de las colmenas de nuestro país tanto en la región Metropolitana como en todo Chile, sino que también para la industria apícola como un buen aporte a la reducida información existente sobre la salud de las colmenas chilenas, y que ayude a tomar consciencia de la importancia del cuidado de las abejas melíferas en nuestro país.

Conclusiones

- I. Se detecta la presencia de *Deformed wings virus*, *Black Queen bee virus* y *Kashmir bee virus* en colmenas de la Región Metropolitana de Chile.
- II. El análisis filogenético indica que los patógenos virales encontrados tienen un fuerte parentesco con otros reportados en Asia y Europa en el caso de DWV y BQCV, y también de Oceanía para KBV.
- III. Se comprueba la primera detección de KBV en la Región Metropolitana de Chile, el cual no había sido reportado anteriormente por el SAG.

Bibliografía

- Aldea, Patricia, Rodríguez, Rafael, Olivares, Alejandra, Farffin, Macarena, Riveros, Daniel., Nfifiez, Fanny, Trivelli, & Luz. (2013). Effect of Ambient Temperature and Humidity Conditions on the Efficacy of Organic Treatments against *Varroa destructor* in Different Climatic Zones of Chile. *Journal of Agricultural Science and Technology*, *A(3)*, 474–483. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11262-012-0791-0>
- Amiri, E., Meixner, M., Büchler, R., & Kryger, and P. (2014). Chronic Bee Paralysis Virus in Honeybee Queens: Evaluating Susceptibility and Infection Routes. *Viruses*, *6*, 1188–1201. <https://doi.org/10.3390/v6031188>
- Amiri, E., Seddon, G., Smith, W. Z., Strand, M. K., Tarpy, D. R., & Id, O. R. (2019). Israeli Acute Paralysis Virus : Honey Bee Virus Transmission Pathways. *Insects*, *10(5)*, 123. <https://doi.org/10.3390/insects10010009>
- Barriga, G. P., Cifuentes-Muñoz, N., Rivera, P. A., Gutierrez, M., Shmaryahu, A., Valenzuela, P. D. T., & Engel, E. A. (2012). First detection and complete genome sequence of Deformed wing virus in Chilean honeybees. *Virus Genes*, *45(3)*, 606–609. <https://doi.org/10.1007/s11262-012-0791-0>
- Benieddou, M., Leat, N., Allsopp, M., & Davison, S. (2001). Detection of Acute Bee Paralysis Virus and Black Queen Cell Virus from Honeybees by Reverse Transcriptase PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, *67(5)*, 2384–2387. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2384-2387.2001>

- Buchmann, S. L. (1996). *The forgotten pollinators*. Island Press/Shearwater Books.
- Dainat, B., & Neumann, P. (2012). Colony collapse disorder in Europe. *Environmental Microbiology Reports*, 4, 123–125.
<https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00312.x>
- de Miranda, J. R., & Genersch, E. (2010). Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(SUPPL. 1), S48–S61.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.012>
- Delaplane, K. S. (2017). History of Africanized Honey Bees. *University of Georgia Cooperative Extension Bulletin*, 1–4.
- Fei, D., Guo, Y., Fan, Q., Wang, H., & Wu, J. (2019). Phylogenetic and recombination analyses of two deformed wing virus strains from different honeybee species in China. *PeerJ*, 7(e7214), 1–17.
<https://doi.org/10.7717/peerj.7214>
- Grabensteiner, E., Bakonyi, T., Ritter, W., Pechhacker, H., & Nowotny, N. (2007). Development of a multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of three viruses of the honeybee (*Apis mellifera* L.): Acute bee paralysis virus, Black queen cell virus and Sacbrood virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(3), 222–225. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.11.006>
- Guzmán-novoa, E., Montaña, L. G. E., & Benítez, A. C. (2011). Colonización, impacto y control de las abejas melíferas africanizadas en México. Colonization, impact and control of Africanized honey bees in Mexico. *Revista Veterinaria de México*, 42(2), 55–56.
- Hernández, A. P., & Lorenzo, J. D. (2014). Evaluación de la conducta higiénica en colmenas de abejas *Apis mellifera* L. por el método del pinchado con

- dos instrumentos. *Revista de Salud Animal*, 36(3), 170–177.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/200906.016>
- Hesterberg, T. (2011). Bootstrap. *WIREs Computational Statistics*, 3(6).
<https://doi.org/10.1002/wics.182>
- Iveros, G. R., Rismendi, N. A., Apata, N. Z., Magghe, G. S., Odríguez, M. R., & Erding, M. G. (2018). Scientific note A scientific note on first detection of Kashmir bee virus in *Apis mellifera* (Hymenoptera : Apidae) in South America. *Apidologie*, 49, 220–223. <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0545-z>
- Klein, A.-M., Brittain, C., Hendrix, S. D., Thorp, R., Williams, N., & Kremen, C. (2012). Wild pollination services to California almond rely on semi-natural habitat. *Journal of Applied Ecology*, 49(3), 723–732.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2012.02144.x>
- Kremen, C., Williams, N. M., & Thorp, R. W. (2002). Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), 16812–16816. <https://doi.org/10.1073/pnas.262413599>
- Kukielka, D., & Sánchez-vizcaíno, J. M. (2009). One-step real-time quantitative PCR assays for the detection and field study of Sacbrood honeybee and Acute bee paralysis viruses. *Journal of Virological Methods*, 161(2), 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.06.014>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X : Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

- Maggi, M., Antúnez, K., Invernizzi, C., Aldea, P., Vargas, M., Negri, P., Brasesco, C., De Jong, D., Message, D., Teixeira, E. W., Principal, J., Barrios, C., Ruffinengo, S., Da Silva, R. R., & Eguaras, M. (2016). Honeybee health in South America. In *Apidologie* (Vol. 47, Issue 6). <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0445-7>
- Miranda, J. R. De, Cordoni, G., & Budge, G. (2011). The Acute bee paralysis virus – Kashmir bee virus – Israeli acute paralysis virus complex. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(2010), S30–S47. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.014>
- Naggar, Y. Al, & Paxton, R. (2020). Mode of Transmission Determines the Virulence of Black Queen Cell Virus in Adult Honey Bees, Posing a Future Threat to Bees and Apiculture. *Viruses*, 12(535), 1–12. <https://doi.org/10.3390/v12050535>
- Neira, M., Dussaubat, C., Manquián, N., Bahamonde, P., & Vera, M. (2007). SANIDAD APÍCOLA EN CHILE, SITUACIÓN DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES. *Agro Sur*, 35(1), 47–48. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2007.v35n1-17>
- Nguyen, L., Schmidt, H. A., Haeseler, A. Von, & Minh, B. Q. (2014). IQ-TREE : A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- ODEPA. (2018). *Comisión Nacional de Apicultura*.
- OIE. (2018). *Manual de terrestres. figura 1*, 634.
- OIE. (2021). *Boletín oficial 2021-1*. <https://bulletin.woah.org/wp-content/uploads/2021/11/lofficiel-2021-1-en.pdf>

- Ribière, M., Triboulot, C., Mathieu, L., Auri res, C., Faucon, J. P., & P pin, M. (2002). Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. *Apidologie*, 33(3), 339–351. <https://doi.org/10.1051/apido:2002020>
- Rodríguez, M., Vargas, M., Ant nez, K., Gerding, M., Castro, F. O., & Zapata, N. (2014). Prevalence and phylogenetic analysis of honey bee viruses in the Biob o Region of Chile and their association with other honey bee pathogens. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 74(2), 170–177. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392014000200007>
- Rodríguez, M., Vargas, M., Gerding, M., Navarro, H., & Antúnez, K. (2012). Viral infection and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) in Chile. *Journal of Apicultural Research*, 51(3), 285–287. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.3.12>
- Rosado Gordón, M.  . (2012). Polinizadores y biodiversidad. In *Asociación española de Entomología , Jard n Botánico Atlántico y Centro Iberoamericano de la Biodiversidad*. <http://apolo.entomologica.es/>
- 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>
- SAG. (2019). *Boletín apícola N 4*. 1–6.
- SAG. (2021). *Boletín apícola*. 1–9.
- Sanger, F., & Goulson, A. R. (1975). A Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3), 441–448. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)
- Shen, M., Cui, L., Ostiguy, N., & Cox-foster, D. (2005). *Intricate transmission*

- routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite.* 2281–2289. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80824-0>
- Suárez, C. L., & Corcho, D. B. (2000). ENFERMEDADES EMERGENTES Y REEMERGENTES : FACTORES CAUSALES Y VIGILANCIA. *Revista Cubana de Medicina General*, 16(6), 593–597.
- Taj, H. (2006). *Factores macroeconómicos, políticos y sanitarios y la mortalidad en menores de 5 años.* 19(1), 54–55.
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Colin, M. E., & Bergoin, M. (2004). Prevalence and Seasonal Variations of Six Bee Viruses in *Apis mellifera* L . and *Varroa destructor* Mite Populations in France. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7185–7191.
<https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7185>
- Thimann, R. (2001). 25 Years of the Africanized Honey Bee in Venezuela. *Revista de Salud Animal*, 25(November), 123.
- Vargas, M., Arismendi, N., Riveros, G., & Zapata, N. (2017). *Viral and intestinal diseases detected in Apis mellifera in Central and Southern Chile. October.* <https://doi.org/10.4067/S0718-58392017000300243>
- Vargas, M., Arismendi, N., Riveros, G., Zapata, N., Bruna, A., Vidal, M., Rodríguez, M., & Gerding, M. (2017). Viral and intestinal diseases detected in *Apis mellifera* in Central and Southern Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 77(3), 98–117. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392017000300243>
- Yue, C., & Genersch, E. (2005). RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *Apidologie*,

67(3), 3419–3424. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81401-0>

Zinsstag, J, Schelling, E., & Tanner, M. (2011). From “ one medicine ” to “ one health ” and systemic approaches to health and well-being &. *Applied and Environmental Microbiology*, 101(August 2009), 148–156.

<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.07.003>

Zinsstag, Jakob, Crump, L., Schelling, E., Hattendorf, J., Maidane, Y. O., Ali, K. O., Muhummed, A., Umer, A. A., Aliyi, F., Nooh, F., Abdikadir, M. I., Ali, S. M., Hartinger, S., Daniel, M., Berger, M., White, G. De, Cordon-rosales, C., Castillo, D. A., Mccracken, J., ... Recherches, I. De. (2018). Climate change and One Health Ciss e. *Applied and Environmental Microbiology*, January, 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny085>