

FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA PRESENCIA, DIFUSIÓN E INTERACCIÓN DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES QUE AFECTAN LA APICULTURA EN AMBIENTES SUBTROPICALES Y TEMPLADOS

RISK FACTORS ASSOCIATED WITH THE PRESENCE, DISTRIBUTION AND INTERACTION OF THE MAIN DISEASES AFFECTING BEEKEEPING IN SUB-TROPICAL AND TEMPERATE ENVIRONMENTS

Natalia Bulacio-Cagnolo (Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Provincia de Santa Fe - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), **Marcelo L. Signorini** (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Provincia de Santa Fe - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), **César E. Salto** (Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Provincia de Santa Fe - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), **Julieta Merke** (Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Provincia de Santa Fe - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), **Graciela Rodríguez** (Estación Experimental Agropecuaria H. Ascasubi, Provincia de Buenos Aires - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), **Emanuel Orellano** (Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Provincia de Santa Fe - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), **Agostina Giacobino** (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Provincia de Santa Fe - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), **Adriana C. Pacini** (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Provincia de Santa Fe - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), **Ana I. Molineri** (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Provincia de Santa Fe - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), **Ezequiel Bertozzi** (Agencia de Extensión Rural Casilda, Provincia de Santa Fe - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), **Germán Masciangelo** (Agencia de Extensión Rural Gálvez, Provincia de Santa Fe - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), **Hernán Pietronave** (Estación Experimental Agropecuaria Reconquista, Provincia de Santa Fe - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), **Horacio Castignani** (Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Provincia de Santa Fe - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), **Javier Caporgno** (Agencia de Extensión Rural Ceres, Provincia de Santa Fe - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), **Norberto Fondevila** (Instituto de Virología - Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), **Juan Claus** (Cátedra de Virología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral), **Gabriela Micheloud** (Cátedra de Virología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral), **Andrea Aignasse** (Programa para el Desarrollo Apícola - Ministerio de la producción de la Provincia de Formosa), **Alfredo Caballero** (Programa para el Desarrollo Apícola - Ministerio de la producción de la Provincia de Formosa), **Patricia Tiñuk** (Programa para el Desarrollo Apícola - Ministerio de la producción de la Provincia de Formosa), **Luis Zago** (Estación Experimental Agropecuaria Resistencia, Provincia de Chaco - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) y **Andrés Prieto** (Área I+D Apícola - Ministerio de Producción de la Provincia de Chaco) - Argentina

Resumen

El desarrollo de la apicultura en la Argentina se ve amenazado tanto por problemas sanitarios como por el avance de la frontera agrícola que reduce la biodiversidad. Entre los problemas sanitarios aún no resueltos, se destacan: infección por *Nosema* sp., infestación con *Varroa destructor* y las virosis. Si bien es posible identificar factores que, *a priori*, favorecen la presencia de estas enfermedades, es necesario contar con información que permita estudiar la interacción entre las tres patologías e identificar factores de riesgo que incrementen la probabilidad de ocurrencia y diseminación de estas, incorporando al análisis las asociaciones debidas a factores agroecológicos. Solo a

Abstract

The development of beekeeping in Argentina is threatened by both diseases and advancing agricultural frontiers reducing biodiversity. Within the unresolved health problems, infestation by *Varroa destructor* and *Nosema* sp. and viruses infection, are the most relevant. While it is possible to identify factors that, *a priori*, increase the prevalence of these diseases, it is necessary to study the diseases complex association in order to identify the risk factors that increase the probability of occurrence and spread of them as a whole phenomena, incorporating interactions with agroecological factors. It is possible to design effective control strategies based on this epidemiological information, considering the

partir de esta información epidemiológica será posible diseñar estrategias para el control efectivo de estas enfermedades considerando la realidad nacional. El objetivo general del proyecto es identificar los factores de riesgo asociados a la presencia y difusión conjunta de la varroosis, nosemosis y virosis en diferentes regiones agroecológicas del país, cuyo control integrado permita optimizar la producción de miel. Se realizarán tres muestreos en un año (pre- y postratamiento acaricida y antes del comienzo de la temporada en primavera). Se seleccionarán aleatoriamente apiarios distribuidos en las provincias de Santa Fe, Chaco y Formosa. En cada colmena, se registrarán los datos de fortaleza de la colmena y prevalencia de *V. destructor*, recuento de esporos de *Nosema* sp. y la presencia de virus (inicialmente se comenzará con el virus de las alas deformes, DWV). Simultáneamente, se encuestará a apicultores para conocer aspectos de manejo. El análisis de datos incluirá Chi-cuadrado, t-Student, ANOVA, correlación de Spearman, regresión logística y pruebas de análisis espacial para identificar agrupamientos geográficos. Se espera que el presente proyecto aporte información epidemiológica que sirva como base para el diseño y aplicación de estrategias de manejo en materia de sanidad apícola.

Palabras clave: factores de riesgo, nosemosis, varroosis, virosis.

local status of all diseases. The aim of this project is to identify risk factors associated with the presence and spread of varroosis, nosemosis and viruses in different agro-ecological regions of Argentina, whose integrated control can optimize the honey production. Three samplings will be carried out during a year (prior and after acaricide treatment and before the beginning of the harvest season). Apiaries will be randomly selected in Santa Fe, Chaco and Formosa provinces. For each sampled colony, additional information concerning colony strength measures, prevalence of *V. destructor*, *Nosema* sp. spores count and the presence of virus (initially it will be searched Deformed Wing Virus) will be collected. Simultaneously, a survey will be applied to the beekeepers to identify management practices. Data analysis will include Chi-square test, t-Student test, ANOVA, Spearman correlation test, logistic regression test, and spatial analysis to identify geographic clusters. It is expected that this project provides basic epidemiological information in order to design and implement effective management strategies on bee health.

Keywords: risk factors, nosemosis, varroosis, virosis.

Introducción y justificación del proyecto

El presente trabajo fue presentado en la convocatoria a los Premios Senasa 2014-2015 a la Investigación y Transferencia en Sanidad Animal en la categoría Equipos en Formación, y obtuvo el segundo lugar.

La Argentina es el segundo exportador mundial de miel y el tercer productor, comercializa en el exterior el 95 % de la miel producida (Alimentos Argentinos, 2012). En general, la apicultura es una actividad económica complementaria, que contribuye significativamente a las economías regionales (ACDICAR, 2010). El aumento de la producción se ve amenazado tanto por problemas sanitarios como por el avance de la frontera agrícola que reduce la biodiversidad. Dentro de los problemas sanitarios aún no resueltos, se destacan: infección por *Nosema* sp., infestación con *Varroa destructor*, las virosis y sus interacciones (Martin et ál., 2012).

Internacionalmente, en los últimos años, se ha reportado una significativa mortandad de colmenas, fenómeno conocido como Síndrome de Desaparición de Colmenas (CCD, sigla del inglés *Colony Collapse Disorder*). Se ha atribuido el CCD a una combinación de factores, entre los que es muy citada la asociación entre *V. destructor* con ciertos virus y *Nosema* sp. (Martin et ál., 2012).

V. destructor es un ectoparásito obligado de *Apis mellifera* L. y agente causal de varroosis. Es considerado el agente etiológico más importante debido a su amplia difusión a nivel nacional, ya que ocasiona importantes daños productivos y económicos (Senasa, 2007).

La infestación con varroa frecuentemente va acompañada con infecciones virales. Los estudios virológicos realizados en la Argentina son incipientes, aunque se detectó la presencia de seis de los principales virus que afectan a las abejas: virus de la parálisis aguda y crónica, virus de la cría ensacada, virus israelí de la parálisis aguda, virus de la celda negra de la reina y virus de las alas deformes (Fondevila et ál., 2011; Reynaldi et ál., 2010 y 2011).

Nosemosis es una enfermedad causada por dos especies de microsporidios, *Nosema apis* y *N. ceranae*, comúnmente presentes en *A. mellifera* alrededor del mundo (Williams et ál., 2008). El estrés energético que generan en las

abejas hospedadoras puede comprometer la eficacia de la respuesta inmune y permitir que otros patógenos invadan el hospedador generando así un efecto en cascada (Mayack y Naug, 2009).

Si bien es posible identificar factores que, *a priori*, favorecen la presencia de estas enfermedades, es necesario contar con información que permita estudiar la interacción entre las tres patologías e identificar factores de riesgo que incrementen la probabilidad de ocurrencia y diseminación de estas, incorporando al análisis las asociaciones debidas a factores agroecológicos.

Por lo expuesto, es necesario realizar un estudio epidemiológico para evaluar la interacción entre las tres enfermedades e identificar factores de riesgo que incrementen la probabilidad de su presencia y difusión. Solo a partir de esta información será posible diseñar estrategias para el control efectivo de estas enfermedades considerando la realidad nacional.

Objetivos del proyecto

El objetivo general del proyecto es identificar los factores de riesgo asociados a la presencia y difusión conjunta de la varroosis, nosemosis y virosis en diferentes regiones agroecológicas del país cuyo control integrado permita optimizar la producción de miel.

Objetivos específicos

- 1) Estimar la prevalencia conjunta de *V. destructor*, *Nosema* sp. y DWV en apiarios localizados en ambientes subtropicales y templados de la Argentina.
- 2) Identificar los factores de riesgos ambientales y de manejo asociados a la presencia de estas enfermedades en apiarios localizados en regiones subtropicales y templadas.
- 3) Estudiar el comportamiento estacional y espacial de los agentes causales de las tres enfermedades.

Actividades principales y resultados esperados

Estimación de la prevalencia de *V. destructor*, *Nosema* sp. y virus en apiarios de Santa Fe, Chaco y Formosa

a) Muestreos

Para estimar la prevalencia de *V. destructor*, *Nosema* sp. y virus en apiarios de las tres provincias e identificar aquellos factores de riesgo que estén asociados con un incremento en la presentación de las enfermedades, se realizarán tres muestreos en un año: previo y posterior al tratamiento con acaricidas y antes del inicio de la temporada primaveral. Se seleccionarán aleatoriamente apiarios distribuidos en las provincias de Santa Fe, Chaco y Formosa (estratificados de acuerdo a las regiones agroecológicas). En el cálculo del número de apiarios para muestrear, se considerará una prevalencia estimada de Varroa (*a priori*, el principal problema sanitario de los apiarios en la Argentina) del 74 % (Senasa, 2007), un total de 5.300 apiarios, una confianza del 90 % y un error en la estimación del 10 %. El número de apiarios dentro de cada región agroecológica será determinado en función de la participación proporcional de cada estrato en el número total de apiarios en el área de interés.

b) Toma de muestras

En cada apiario, se muestreará el 10 % de las colmenas o un mínimo de seis en aquellos con menos de sesenta colmenas. En cada colmena, se registrará: población de abejas, área con cría, con polen y con miel. Estas determinaciones se realizarán de la siguiente manera:

- Población de abejas por colmena: se contabilizará el número de cuadros cubiertos por abejas. Este número dividido por 2 será multiplicado por 1.100 para obtener el total de abejas adultas presentes en la colonia (Delaplane et ál., 2013).
- Área de cría: se estima que hay 7.000 celdas de obreras en cada cuadro, se realiza una división imaginaria de este en 10 subáreas y se utiliza una escala de 0 a 1 para estimar la superficie del panal cubierta con cría (Murilhas, 2002).
- Área cubierta con miel operculada (Murilhas, 2002) y polen: se determinará utilizando el mismo criterio que en el punto anterior.

Simultáneamente con el muestreo, se aplicará a los productores apícolas una encuesta estructurada para conocer aspectos de manejo del apiario. Esta encuesta ahondará, entre otros, en los siguientes aspectos: número de colmenas, actividad económica primaria o complementaria, existencia de asesoramiento profesional, movimientos de colmenas (transhumancia), origen de reinas, suplementos alimenticios aplicados, tratamientos para varroa, nosemosis y otras enfermedades y tipo de internada realizada.

Las variables de respuesta serán la prevalencia de *V. destructor* (porcentaje de parasitismo en abejas en fase forética), recuento de esporos de *Nosema* sp. y prevalencia de *Nosema* sp. y la presencia de virus (inicialmente se comenzará con la presencia del virus de las alas deformes –DWV–), utilizando, para ello, las metodologías de diagnóstico que se describen a continuación.

c) Procesamiento de las muestras

Varroa forética: la evaluación de la prevalencia parasitaria sobre las abejas adultas se realizará mediante la técnica conocida como “prueba del frasco” (De Jong et ál., 1982 modificada por Marcangeli, 2000). Luego se registrará el número de varroas y el número de abejas y se calculará el porcentaje de parasitación de varroa, aplicando la fórmula: (número de ácaros/ número de abejas que componen la muestra) *100 (INTA, 2010).

Recuento de esporos *Nosema* sp.: la metodología a seguir para la toma de abejas estará de acuerdo con el protocolo de monitoreo y tratamiento de las muestras reportado por Sarlo (2010). De cada colmena, se tomarán cien abejas (sesenta se destinarán al recuento de esporos y veinte para la estimación de prevalencia) retornantes del vuelo directamente de la piquera, para ello se empleará un aspirador con vacío portátil. Los ejemplares serán colocados en frascos plásticos con 100 ml de agua y 4 ml de formaldehído. La suspensión de esporos se preparará macerando sesenta abdómenes de abejas seleccionadas aleatoriamente. El número de recuentos de esporos de *Nosema* sp./abeja será determinado mediante microscopio óptico y hemocitómetro. De cada muestra, se contará el número de esporos contenido en ochenta cuadros del hemocitómetro (cinco grupos de dieciséis cuadros) siguiendo la metodología reportada por Cantwell (1970) y modificada por Del Hoyo (1997). Esta metodología de muestreo es la empleada tradicionalmente para estimar la intensidad de la infección y permite detectar hasta un mínimo de 5 % de abejas infectadas con un 95 % de confianza (Fries, 1988).

Prevalencia de *Nosema* sp.: se seguirá la metodología reportada por Sarlo (2010). Resumidamente, la prevalencia de cada muestra se obtendrá a partir de una submuestra de veinte abejas. Por separado, a cada abeja se le extraerá el ventrículo, se los macerará en forma individual en 0,5 ml de agua destilada y dos volúmenes de 50 µl del homogeneizado y se observarán por separado con microscopio óptico. Los valores se registrarán como presencia o ausencia de esporos en veinte campos observados.

Prevalencia de virus: si bien se reconoce la existencia de varios virus que pueden afectar a las colmenas, inicialmente se evaluará la presencia de DWV. No

obstante, las muestras colectadas se almacenarán apropiadamente para, en el futuro, analizar además la presencia de otros virus de interés.

- a) Colecta y almacenamiento de muestras para estudios virales: se colocarán diez abejas obreras, colectadas de una misma colmena, en recipientes con 7 m RNAlater® (solución que estabiliza el ARN a temperatura ambiente) como se describe en Teixeira et ál. (2008).
- b) Extracción del ARN viral, RT-PCR para DWV: el *pool* de abejas será homogeneizado en morteros cerámicos estériles con solución buffer fosfato (PBS). El homogeneizado se centrifugará durante treinta minutos a 1.500 x g. Se utilizarán 500 µl del sobrenadante para extracción del ARN viral con el reactivo comercial TRIZOL (Invitrogen). Alternativamente, 140 µl del sobrenadante se podrán utilizar para realizar la extracción del ARN con el kit QIAmp Viral RNA Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany), siguiendo en ambos casos las instrucciones del fabricante. El ARN viral se amplificará mediante transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Se utilizarán los cebadores DWV-F1153 (ATTA AAA ATGG CCTTTAGTTG) y DWV-B1806 (CTTTTCTAATTCAACTTCACC) que amplifican una porción de 694 bases del gen Lp. Los cebadores son altamente conservados y permiten recuperar la mayoría de las secuencias del complejo de especies DWV/VaDV-1 (Forsgren et ál., 2009; Lanzi et ál., 2006; Ongus et ál., 2004). El producto final de la RT-PCR será revelado por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % utilizando SYBR Green. El homogeneizado excedente se conservará a –80 °C de manera de poder realizar en el futuro la detección y el estudio de otros virus de abejas de interés sanitario.

d) Análisis de los datos

Para cuantificar la asociación entre los factores de riesgo y la presencia de *V. destructor*, *Nosema* sp. y DWV, se efectuarán los análisis en dos etapas. En la primera, todas las variables independientes serán comparadas con la presencia de los diferentes agentes por medio de la Prueba de Chi-cuadrado (χ^2), t-Student, ANOVA, correlación de Spearman dependiendo del tipo de variable a analizar (análisis univariante). Antes de realizar el análisis multivariante, se analizará la existencia de colinealidad, calculando la correlación entre pares

de variables usando el coeficiente de correlación de Spearman. Cuando dos potenciales factores de riesgo se encuentren altamente correlacionados (coeficientes de correlación $>0,6$), solamente se ofrecerá al modelo de regresión logística aquella variable con menor valor de p en el modelo univariante. Solo las variables asociadas con la variable dependiente luego del análisis univariante con un $p < 0,20$ serán ofrecidas, en una segunda etapa, a un modelo de regresión logística mixto con la incorporación del efecto “apiario” como variable aleatoria del modelo. El método de estimación será el de las probabilidades máximas (“maximum likelihood”) con un criterio de convergencia de 0,01 para un máximo de 10 iteraciones. Las variables que resulten no significativas a la regresión logística ($p > 0,05$) serán excluidas del modelo saturado. Para estudiar la asociación entre las diferentes enfermedades, estas serán incorporadas a los diferentes modelos como variables independientes.

Además, debido a que las observaciones no son independientes entre sí y las asociaciones aparentes pueden estar sesgadas por el agrupamiento espacial de casos, serán utilizadas pruebas de análisis espacial para identificar potenciales agrupamientos geográficos, tales como el test de Cuzick-Edwards y la Spatial Scan Statistic. En caso de detectarse evidencia de agrupamiento espacial, serán introducidas variables tendientes a controlar por este efecto en el análisis multivariado. La naturaleza de tales variables dependerá del tipo de agrupamiento espacial observado.

Resultados esperados

El estado sanitario de las colmenas viene determinado por la interacción entre la propia colmena, su ambiente y la presencia, individual o conjunta, de agentes etiológicos de enfermedades. Comprender las interacciones que ocurren entre estos factores resulta crucial para diseñar estrategias de manejo tendientes al control de las enfermedades que afectan a la apicultura.

Con el presente trabajo, se espera obtener resultados que ayuden a:

1) comprender aspectos epidemiológicos de la presencia y difusión de *V. destructor*, *Nosema* sp. y virus en apiarios de las provincias de Santa Fe, Chaco y Formosa con base en:

- i) estimar la prevalencia de los agentes causales de las tres enfermedades en apiarios localizados en tres provincias con características agroecológicas diferentes (Santa Fe, Chaco y Formosa).

- ii) comprender las interacciones existentes entre las tres enfermedades considerando los aspectos agroecológicos.
- iii) identificar los factores de riesgo potencialmente asociados con la presencia de estas tres enfermedades.
- iv) conocer el patrón de distribución espacial y estacional de las tres enfermedades.

2) identificar los factores de riesgo asociados con la presencia de estos agentes en colmenas localizadas en regiones templadas y subtropicales.

Las técnicas disponibles para el diagnóstico de varroosis, nosemosis y virosis permitirán estimar la prevalencia de estas tres patologías –de manera individual y conjuntamente– en apiarios localizados en regiones con diferentes situaciones agroecológicas. De esta forma, será posible evaluar tanto el impacto directo de cada enfermedad sobre el estado sanitario de las colmenas como la interacción existente entre ellas.

Este estudio posibilitará, adicionalmente, identificar los factores asociados con la presencia y difusión de los agentes causales, recabando datos de los apiarios que profundicen en la aplicación de diferentes medidas de manejo, prácticas higiénicas, profilaxis, alimentación, entre otras que pudieran estar asociadas con la presencia de estos. El análisis univariado, combinado con la regresión logística, permitirá identificar esos factores y predecir la probabilidad de que se presenten las diferentes enfermedades (solas o en simultáneo) en función de la exposición a determinados factores de riesgo o niveles de estos factores.

Dentro de los factores asociados a la presentación de las enfermedades, las realidades agroecológicas suelen jugar un papel fundamental en explotaciones extensivas como la apicultura. Las herramientas disponibles para el análisis espacial de datos en epidemiología permiten identificar áreas o *clusters* con características particulares que determinan un patrón de presentación de estas en las colmenas. Con estas herramientas se podrán identificar áreas con comportamientos específicos y definir zonas que, por sus características agroecológicas, generen condiciones particulares para la presencia y difusión de las enfermedades.

Bibliografía

- Asociación Civil para el Desarrollo y la Innovación Agencia Rafaela (2010), *Revisión de Colmenas. Período otoño 2010* [en línea]. Disponible en: <<http://www.acdicar.org>>.
- Bulacio-Cagnolo, N. V.; Basualdo, M. y M. Eguaras (2010), “Actividad Varroocida del timol en colonias de *Apis mellifera* L. de la provincia de Santa Fe”, *InVet* 12 (1), pp. 85-90.
- Bulacio-Cagnolo, N. V. (2011), “Manejo Integrado de *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) en colonias de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) en el centro oeste de la provincia de Santa Fe”, Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.
- Bulacio-Cagnolo, N. V. y R. Rivero (2012), “Evaluación del ácido fórmico y el timol para el control de la Varroosis en un apiario con manejo sanitario orgánico”, *Revista FAVE Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral* 10 (2), pp. 25-32.
- Cantwell, G. E. (1970), “Standard methods for counting nosema spores”, *American Bee Journal* 110 (6), pp.222-223.
- Chen, Y. P.; Higgins, J. A. y M. F. 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), pp. 436-441.
- De Jong, D.; Morse, R. A. y G. C. Eickwort (1982), “Mite pests of honey bees”, *Annals Review Entomology* 27, pp. 229-252.
- Del hoyo, M. y G. Rodriguez (1997), “Protocolos de Laboratorio de Sanidad Apícola”, *Boletín PROAPI* [en línea]. Disponible en: <<http://www.inta.gov.ar>>.
- Delaplane, K.; Van der Steen, J. y E. Guzmán-Novoa (2013), “Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies”, *Journal of Apicultural Research* 52 (1), doi: 10.3896/IBRA.1.52.1.03.
- Fondevila, N.; Figini, E.; Palacio, M. A.; Montenegro, J.; Compaired, D. y E. Bedascarrasbure (2011), “Presence and prevalence of viruses in apiaries in Argentina”, 42.º *Congreso Internacional de Apicultura Apimondia*, Buenos Aires, p. 87.
- Forsgren, E.; de Miranda, J. R.; Isaksson, M.; Wei, S. y I. Fries (2009), “Deformed wing virus associated with *Tropilaelaps mercedesae* infesting European honey bees (*Apis mellifera*)”, *Experimental Applied Acarology* 47 (2), pp. 87-97, doi: 10.1007/s10493-008-9204-4.
- Fries, I. (1988), “Contribution to the study of Nosema disease (*Nosema apis* Z.) in honey bee (*Apis mellifera* L.)”, *Swedish University of Agricultural Sciences*, Uppsala, Sweden, PhD Thesis.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (2010), *Folleto de difusión técnica: Varroa (Final de temporada)*, INTA [en línea]. Disponible en: <www.inta.gov.ar>.
- Lanzi, G.; de Miranda, J. R.; Boniotti, M. B.; Cameron, C. E.; Lavazza, A.; Capucci, L.; Camazine, S. M. y C. Rossi (2006), “Molecular and Biological Characterization of Deformed Wing Virus of Honeybees (*Apis mellifera* L.)”, *Journal of Virology* 80(10), pp. 4998-5009, doi: 10.1128/JVI.80.10.4998-5009.2006.
- Locke, B.; Forsgren, E.; Fries, I. y J. R. de Miranda (2012), “Acaricide treatment affects viral dynamics in *Varroa destructor*-infested honey bee colonies via both host physiology and mite control”, *Applied and Environmental Microbiology* 78 (1), pp. 227-235, doi:10.1128/AEM.06094-11.
- Marcangeli, J. A. (2000), “Aplicación de una nueva técnica para determinar los niveles de infección de *Varroa jacobsoni* en colmenas de *Apis mellifera*”, *Natura Neotropicalis* 31 (1-2), pp. 81-85.
- Martin, S. J.; Highfield, A. C.; Brettell, L.; Villalobos, E. M.; Budge, G. E.; Powell, M.; Nikaido, S. y D. C. Schroeder (2012), “Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite”, *Science* 336 (6086), pp. 1304-1306, doi: 10.1126/science.1220941.
- Mayack, C. y D. Naug (2009), “Energetic stress in the honey bee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection”, *Journal of Invertebrate Pathology* 100, pp. 185-188.
- Merke J. y M. A. Palacio (2011a), “Variaciones temporales en parámetros reproductivos de *Varroa destructor* en colmenas de *Apis mellifera* L. seleccionadas por bajos niveles de infestación”, CD *Resúmenes 42º Congreso Internacional de Apicultura* (APIMONDIA) [en línea]. Disponible en: <www.scielo>.

- Merke, J. y M.A. Palacio (2011b), "Influencia del comportamiento higiénico de *Apis mellifera* L. en los niveles de parasitación de *Varroa destructor*", CD *Resúmenes 42º Congreso Internacional de Apicultura* (APIMONDIA), disponible en: <www.scielo.org>.
- Merke, J.; Palacio, A.; Eguaras, M.; Salto, C.; Bedascarrasbure, E. y N. Bulacio (2008), "Comparación de la evolución de los niveles de infestación de *Varroa destructor* en colmenas de *Apis mellifera* L. con reinas de diferentes orígenes", *Libro de resúmenes del 2.º Congreso Argentino de Apicultura*, p. 64.
- Ministerio de Agroindustria (2012), "Informe de Coyuntura. Sector Apícola", *Alimentos Argentinos*, Argentina [en línea]. Disponible en: <http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/otros/apicola/informes/2012_04Abr.pdf>.
- Molineri, A.I.; Signorini, M. L.; Cuatrín, A. L., Canavesio, V. R.; Neder, V. E.; Russi, N. B.; Bonazza, J. C. y L. F. Calvino (2010), "Calidad bacteriológica y relación entre grupos bacterianos en leche de tanque de frío", *Revista FAVE* 8 (2), pp. 75-86.
- Murilhas, A. M. (2002), "Varroa destructor infestation impact on *Apis mellifera* carnica capped worker brood production, bee population and honey storage in a Mediterranean climate", *Apidologie* 33, pp. 271-281.
- Olvera-Yabur, A.; Signorini, M. L. y H. Tarabla (2010), "Escherichia coli verotoxigénica: Modelo cuantitativo de exposición y escenarios de riesgos en canales bovinas de Argentina", *Revista Panamericana de Salud Pública* 27 (6), pp. 403-413.
- Ongus, J. R.; Peters, D.; Bonmatin, J. M.; Bengsch, E.; Vlak, J. M. y M. M. van Oers (2004), "Complete sequence of a picorna-like virus of the genus Iflavirus replicating in the mite *Varroa destructor*", *Journal of Genetic Virology* 85, pp. 3747-3755, doi: 10.1099/vir.0.80470-0.
- Reynaldi, F. J.; Sguazza, G. H.; Pecoraro, M. R.; Tizzano, M. A. y M. C. Galosi (2010), "First report of viral infections that affect Argentine honeybees", *Environmental Microbiology Reports* 2, pp. 749-751, doi: 10.1111/j.1758-2229.2010.00173.x.
- Reynaldi, F. J.; Sguazza, G. H.; Tizzano, M. A.; Fuentealba, N.; Galosi, C. M. y M. R. Pecoraro (2011), "First report of Israeli acute paralysis virus in asymptomatic hives of Argentina", *Revista Argentina de Microbiología* 43 (2), pp. 84-86, doi: 10.1590/S0325-75412011000200003.
- Rivero, M. A.; Passucci, J. A.; Rodriguez, E. M.; Signorini, M. L.; Tarabla, H. D. y A. E. Parma (2011), "Factors associated with sporadic Verotoxigenic *E. coli* infection in children with diarrhoea from the Central Eastern area of Argentina", *Foodborne Pathogens and Disease* 8 (8), pp. 901-906.
- Rivero, M.; Passucci, J.; Luccesi, P.; Signorini, M. L.; Alconcher, L.; Rodríguez, E.; Rocha Martín, V.; Meneguzzi, B.; San Juan, F.; Ballesteros, B. y H. Tarabla (2013), "Epidemiología del Síndrome Urémico Hemolítico en dos regiones de la provincia de Buenos Aires", *Medicina* 73, pp. 127-135.
- Sarlo, E. G. (2010), "Aportes al conocimiento de la naturaleza y control de la Microsporidiosis causada por *Nosema ceranae* (Microsporidia, Nosematidae) en las colonias de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) asentadas en la región sudeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina", Tesis doctoral, Universidad nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Exactas y naturales.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (2007), *Situación actual de Varroosis*, SENASA [en línea]. Disponible en: <<http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File3824-varroosis-situacion-actual-argentina.pdf>>.
- Signorini, M. L. y L. S. Frizzo (2009), "Modelo de contaminación cruzada por *Escherichia coli* verotoxigénica en hamburguesas caseras utilizando la evaluación cuantitativa de riesgos", *Revista Argentina de Microbiología* 41 (4), pp. 237-244.
- Signorini, M. L. e I. Guerrero-Legarreta (2009), "Producción de aminas biogénicas en carne de bovino conservada con ácido láctico de origen químico y bacteriano", *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 8 (1), pp. 41-49.
- Signorini, M. y H. Tarabla (2009), "Quantitative risk assessment for Verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef hamburgers in Argentina", *International Journal of Food Microbiology* 132, pp.153-161.

- Signorini, M. L.; Molineri, A. I.; Bulacio-Cagnolo, N.; Merke, J.; Luiselli, S. y J. Caporgno, J. (2010), “Evaluación a campo de la efectividad del tratamiento contra nosemosis en la provincia de Santa Fe”, *Revista FAVE, Ciencias Veterinarias* 9 (1), pp. 7-16.
- Signorini, M. y H. Tarabla, H. (2010), “Interventions to reduce verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef in Argentina: A simulation study”, *Preventive Veterinary Medicine* 94, pp. 36-42.
- Signorini, M. L.; Zbrun, M. V.; Romero-Scharpen, A.; Olivero, C.; Bongiovanni, F.; Soto, L. P.; Frizzo, L. S. y M. R. Rosmini (2013), “Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis by consumption of salad cross-contaminated with thermophilic *Campylobacter* spp. from broiler meat in Argentina”, *Preventive Veterinary Medicine* 109, pp. 37-46.
- Teixeira, E. W.; Chen, Y.; Message, D.; Pettis, J. y J. D. Evans (2008), “Virus infections in Brazilian honey bees”, *Journal of Invertebrate Pathology* 99 (1), pp. 117-119, doi: 10.1016/j.jip.2008.03.014.
- Williams, G. R.; Sampson, M. A.; Shutler, D. y R. E. L. Rogers (2008), “Does fumagillin control the recently detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)?”, *Journal of Invertebrate Pathology* 99, pp. 342-344.