

## Dicistrovirus de la comunidad de polinizadores encontrados en palomas: ¿un nuevo reservorio viral?

### Dicistrovirus from the pollinator community found in pigeons: a new viral reservoir?

María Laura Susevich<sup>1,3,\*</sup>, María Gabriela Echeverría<sup>1,3</sup>, Javier Origlia<sup>2</sup>

#### RESUMEN

Los Dicistrovirus son una familia de virus que afectan invertebrados de importancia sanitaria y económica. Las palomas son, asimismo, reservorios naturales de patógenos que han causado enfermedades emergentes y reemergentes en el humano. Se capturaron 25 palomas (24 *Columba livia* y una *Zenaida auriculata*) en La Plata, Buenos Aires, entre mayo y junio de 2019. Se tomaron hisopados de orofaringe/coana y luego cloacal de cada ave. Se realizó la extracción de ARN con Trizol®. Se utilizaron 5 µl del ARN total para la síntesis de ADN complementario (ADNc). La reacción se llevó a cabo utilizando una PCR múltiple (mPCR) como metodología de screening en un volumen final de 25 µl. Esta PCR múltiple amplifica seis virus. Como control positivo se utilizó una muestra previamente aislada y caracterizada en el laboratorio de los autores como virus de la parálisis aguda israelí (IAPV), y cuya presencia fue confirmada mediante screening utilizando cebadores específicos, para una PCR simple, que amplifican 185 pb. Quince de las muestras (60%) fueron positivas a IAPV tanto en la PCR múltiple como en la PCR especí-

<sup>1</sup> Cátedra de Virología, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina

<sup>2</sup> Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina

<sup>3</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas – CONICET, Buenos Aires, Argentina

\* E-mail: [mlsusevich@fcv.unlp.edu.ar](mailto:mlsusevich@fcv.unlp.edu.ar)

Recibido: 29 de diciembre de 2021

Aceptado para publicación: 14 de julio de 2022

Publicado: 31 de agosto de 2022

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

fica. Se requiere de estudios adicionales para explorar la patogenicidad de los dicistrovirus en las palomas y determinar si estos virus son los mismos que afectan a la comunidad de polinizadores.

**Palabras clave:** Dicistrovirus, palomas, polinizadores, ambiente

## ABSTRACT

Dicistroviruses are a family of viruses that affect invertebrates of sanitary and economic importance. Pigeons are also natural reservoirs of pathogens that have caused emerging and re-emerging diseases in humans. Twenty-five pigeons (24 *Columba livia* and one *Zenaida auriculata*) were captured in La Plata, Buenos Aires, between May and June 2019. Oropharyngeal/choana and then cloacal swabs were taken from each bird. RNA extraction was performed with Trizol®. For the analysis, 5 µl of total RNA was used for complementary DNA (cDNA) synthesis. The reaction was carried out using multiplex PCR (mPCR) as screening methodology in a final volume of 25 µl. This multiplex PCR amplifies six viruses. As a positive control, a sample previously isolated and characterized in the authors' laboratory as Israeli acute paralysis virus (IAPV) was used, and whose presence was confirmed by screening using specific primers, for a simple PCR, that amplify 185 bp. Fifteen of the samples (60%) were positive for IAPV in both the multiplex PCR and the specific PCR. Additional studies are required to explore the pathogenicity of dicistroviruses in pigeons and to determine if these viruses are the same ones that affect the pollinator community.

**Key words:** dicistrovirus, pigeons, pollinators, environment

## INTRODUCCIÓN

Los Columbidos son una familia que consta de más de 300 especies de palomas que se encuentran globalmente distribuidas (Gill, 2022). Si bien la cría de palomas para deportes, como mensajeras, para ornato o para el consumo de su carne es una práctica habitual en varios países del mundo, aún no se conoce a cabalidad la epidemiología y el curso de las enfermedades que afectan a estas aves (Zhao *et al.*, 2011). Tanto las palomas silvestres como las domésticas podrían considerarse hospedadores virales, lo que posiblemente permita la evolución y la recombinación, conduciendo al desarrollo de nuevas variantes virales con diversos niveles de patogenicidad (Felippe *et al.*, 2010).

Se estima que más del 60% de las enfermedades emergentes se originan en la vida silvestre (Bengis *et al.*, 2004; Chomel *et al.*, 2007; Cutler *et al.*, 2010; Mackenzi y Jeggo, 2013). Se reconoce que las aves son reservorios frecuentes de virus que preocupan a los seres humanos; en particular la influenza A, lo que facilita el reordenamiento de los segmentos del genoma y los cambios en el tropismo y la eficiencia de transmisión (Alexander *et al.*, 2000; Capua y Alexander, 2010; Amendola *et al.*, 2011; Rumschlag *et al.*, 2013). Las palomas son reservorios naturales de patógenos que han causado enfermedades emergentes y reemergentes en los seres humanos (Magnino *et al.*, 2008).

Los Dicistrovirus son una familia de virus sin envoltura con un genoma de ssRNA lineal de aproximadamente 7-10 kb. Son vi-

rus dicistrónicos similares a los picomaviridae. El genoma contiene dos marcos abiertos de lectura (ORF1 y ORF2) que están separados por un sitio interno de entrada de ribosoma (IRES) de la Región Intergénica (IGR) (Jan, 2006). El ORF-1 codifica las proteínas no estructurales: helicasa, proteasa y polimerasa. La traducción del ORF-2 codifica las proteínas estructurales de la cápside. La replicación ocurre en el citoplasma de la célula infectada (Nakashima y Uchiumi, 2009; Valles *et al.*, 2017).

Según el Comité Internacional de Nomenclatura de Virus (ICTV), los Dicistrovirus comprenden tres géneros: Triatovirus, Aparavirus y Cripavirus (Valles *et al.*, 2017). Los Dicistrovirus infectan huéspedes artrópodos, algunos de ellos afectan a las abejas (virus de la parálisis aguda de las abejas – ABPV, virus de la parálisis aguda israelí – IAPV) y a los camarones (virus del síndrome de Taura) (Hasson *et al.*, 1995; Cox-Foster *et al.*, 2007; Bonning y Miller, 2010; Guo *et al.*, 2013). Además, algunos son patógenos para insectos considerados plagas de importancia agrícola o médica, lo que los convierte en bioplaguicidas con un potencial uso en esas áreas (Bonning y Miller, 2010).

Los virus de abejas de mayor prevalencia a nivel mundial son el Virus de las Alas Deformadas (DWV) y el Virus de la Cría Ensacada (SBV) (Remnant *et al.*, 2017), mientras que los más prevalentes en Argentina son el DWV, IAPV y SBV (Molineri *et al.*, 2017), habiéndose registrado en abejas melíferas y en otros grupos de polinizadores y no polinizadores en el país (Susevich *et al.*, 2019).

La transmisión de los Dicistrovirus puede ocurrir en forma horizontal, a través de partículas virales presentes en las heces de artrópodos infectados (Gomariz-Zilber y Thomas-Orillard, 1993) o vía transmisión mediada por plantas (Wamonje *et al.*, 2017)

y en forma vertical por transmisión transovárica o transovum (Reinganum *et al.*, 1970; D'arcy *et al.*, 1981; Hatfill *et al.*, 1990). Además, también pueden transmitirse a través de vectores como el ácaro *Varroa destructor* (Rosenkranz *et al.*, 2010).

En las últimas dos décadas, debido principalmente al advenimiento de las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento (HTS), se han caracterizado numerosos Dicistrovirus que aún no se han podido ubicar taxonómicamente. Algunos han sido identificados en insectos (Feng *et al.*, 2017; Wamonje *et al.*, 2017; Roberts *et al.*, 2018; Nakasu *et al.*, 2019; Runckel *et al.*, 2019), otros en heces de mamíferos, aunque el problema parece estar relacionado con sus hábitos alimentarios (Li *et al.*, 2010; Krumbholz *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017; Duraisamy *et al.*, 2018). También se han descrito Dicistrovirus asociados a la sangre, tanto en murciélagos como en humanos (Phan *et al.*, 2015; Bennett *et al.*, 2019; Cordey *et al.*, 2019). Con metagenómica se ha logrado caracterizar virus conocidos y nuevos del tracto entérico de pavos (Day *et al.*, 2010), en el guano de murciélagos insectívoros (Reuter *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2010), así como en roedores (Phan *et al.*, 2011), palomas (Phan *et al.*, 2013) y patos (Fawaz *et al.*, 2016).

Según el conocimiento actual, no hay datos que indiquen una clara correlación entre la infección por Dicistrovirus de palomas y su estado de salud, así como determinar si estos virus son específicos de las palomas o son los que afectan a la comunidad de polinizadores. Es por ello que el objetivo de este estudio fue reportar por primera vez en Argentina sobre los Dicistrovirus que se encuentran en el tracto digestivo / excretor de palomas y, además, alertar sobre la posible transmisión de virus enteropatógenos de palomas a insectos de la comunidad.



Figura 1. Contención manual y toma de muestra con hisopo de orofaringe/coana y cloaca. Ejemplares de *Columbia livia* y *Zenaidia auriculata*. La Plata, Buenos Aires, Argentina

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Declaración de Ética

El permiso para capturar palomas para el muestreo fue otorgado por la Dirección de Flora y Fauna de la provincia de Buenos Aires (Argentina); con el aval del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL).

### Muestreo

Se capturaron 25 palomas (24 ejemplares de *Columba livia* y una de *Zenaida auriculata*) en La Plata (Terminal de Ómnibus La Plata), Buenos Aires entre mayo y junio de 2019. La captura se realizó con jaula trampa cebada con granos. Se realizó la contención manual para la toma de muestras y las aves fueron liberadas en forma inmediata a la toma de la muestra (Figura 1).

Las muestras de orofaringe/coana y cloaca se colectaron con un único hisopo, y colocadas en tubos secos para su transporte inmediato al laboratorio. Cada hisopo correspondía a un ejemplar adulto. En el laboratorio se añadió 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a cada tubo, y se homogenizaron para realizar la extracción de ARN. Después de la homogeneización, las muestras se centrifugaron durante 15 min a 500 ×g para aclarar. Una segunda centrifugación se llevó a cabo a 5000 ×g durante 30 min.

### Extracción de ARN

Se agregó 500 µl de reactivo Trizol® (Invitrogen, USA) a 500 µl del material obtenido en el paso anterior. La mezcla se extrajo con 220 µl de cloroformo, se agitó y se centrifugó a 12 000 x g durante 10 min. El ARN contenido en la solución acuosa se precipitó mediante la adición de un volumen igual

de isopropanol. El ARN precipitado se recogió por centrifugación a 12 000 x g durante 10 min, se lavó con etanol al 70% y el pellet fue resuspendido en 20 µl de agua libre de RNasas.

### RT-PCR Multiplex

Se utilizaron 5 µl del ARN total para la síntesis de ADN complementario (ADNc). La reacción fue llevada a cabo utilizando la enzima Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV; Promega) en las condiciones especificadas por el proveedor. La reacción de PCR se hizo de acuerdo con la metodología descrita por Sguazza *et al.* (2013) utilizando una PCR múltiple (mPCR) como metodología de screening en un volumen final de 25 µl. Esta PCR múltiple amplifica seis virus: SBV, DWV (Ifilaviridae), Virus de las Celdas Reales Negras – BQCV, ABPV e IAPV (Dicistroviridae) y CBPV (Virus de la Parálisis Crónica de las Abejas; aún sin clasificar). Como control positivo se utilizó una muestra previamente aislada y caracterizada en el Laboratorio de Virología como IAPV. La presencia de IAPV se confirmó luego del screening utilizando los cebadores específicos propuestos por Reynaldi *et al.* (2011) para una PCR simple, que amplifican 185 pb. Luego de la amplificación las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 2.5% durante 40 min a 100 V que fue inmediatamente teñido con bromuro de etidio y observado bajo luz UV.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las muestras analizadas, 15 (60%) fueron positivas a IAPV tanto en la PCR múltiple como en la PCR específica, en la cual se evidenciaron amplicones de 185 pb específicos de acuerdo con Reynaldi *et al.* (2011).

Se han identificado Dicistrovirus en las heces de mamíferos, incluidos murciélagos insectívoros y humanos, pero el viroma fecal

incluye virus asociados a alimentos que simplemente pueden haber pasado a través del intestino (Kapoor *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Reuter *et al.*, 2014). Los virus de plantas o insectos detectados en las heces se deben mayormente a exposiciones dietéticas, pero puede no indicar una infección replicativa (Balique *et al.*, 2015). Existe la posibilidad que algunos Dicistrovirus que circulan en la sangre de murciélagos frugívoros hayan pasado del sistema gastrointestinal al circulatorio a través de microabrasiones durante la masticación y la deglución de alimentos de materiales ásperos, de manera tal que la transmisión ocasional entre artrópodos y murciélagos en condiciones ecológicamente favorables podría explicar la esporádica aparición de tales virus «asociados a murciélagos» (Bennett *et al.*, 2019), por lo que es posible que esto pueda estar ocurriendo con las palomas.

Las palomas pueden ser un reservorio de varios patógenos, a menudo con un curso subclínico o atípico de la enfermedad, lo que les permite propagarse entre individuos, brindando una oportunidad para pasajes y mutaciones (Łukaszuk y Stenzel, 2020). Se plantea la posibilidad de que la transmisión de virus de invertebrados entre especies de aves, murciélagos y otros mamíferos puede ocurrir con más regularidad de lo que se ha descrito, y que los artrópodos pueden albergar muchos virus «asociados a otros animales». Es así que para poder hablar de virus asociados a palomas, se deberían incluir muestras de invertebrados que estén ecológicamente asociados con estas aves (o incluso mamíferos) y que puedan albergar virus capaces de infectar a las palomas. Es por ello que se requieren estudios adicionales para determinar si son los mismos virus los que afectan a abejas y otros polinizadores y no polinizadores, los hallados en palomas.

## CONCLUSIONES

Es la primera vez que se encuentran virus citados en abejas/polinizadores en palo-

mas (*Columba livia* y *Zenaidia auriculata*) en Argentina. Su hallazgo permite ampliar los reservorios para estas virosis.

#### LITERATURA CITADA

1. **Alexander D, Brown I. 2000.** Recent zoonoses caused by influenza A viruses. *Rev Sci Tech OIE* 19: 197-225. doi: 10.20506/rst.19.1.1220
2. **Amendola A, Ranghiero A, Zanetti A, Pariani E. 2011.** Is avian influenza virus A (H5N1) a real threat to human health? *J Prev Med Hyg* 52: 107-110. doi: 10.15167/2421-4248/jpmh2011.-52.3.259
3. **Balique F, Lecoq H, Raoult D, Colson P. 2015.** Can plant viruses cross the kingdom border and be pathogenic to humans? *Viruses* 7: 2074-2098. doi: 10.3390/v7042074
4. **Bengis RG, Leighton FA, Fischer JR, Artois M, Mörner T, Tate CM. 2004.** The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. *Rev Sci Tech OIE* 23: 497-511.
5. **Bennett A, Bushmaker T, Cameron K, Ondzie A, Niama F, Parra H, Mombouli J, Olson S, et al. 2019.** Diverse RNA viruses of arthropod origin in the blood of fruit bats suggest a link between bat and arthropod viromes. *Virology* 528: 64-72. doi: 10.1016/j.virol.2018.12.009
6. **Bonning BC, Miller WA. 2010.** Dicistroviruses. *Annu Rev Entomol* 55: 129-150. doi: 10.1146/annurev-ento-112408-085457
7. **Capua I, Alexander D. 2010.** Perspectives on the global threat: the challenge of avian influenza viruses for the world's veterinary community. *Avian Dis* 54: 176-178. doi: 10.1637/8870-041009-Reg.1
8. **Cordey S, Laubscher F, Hartley M, Junier T, Pérez-Rodríguez F, Keitel K, Vieille G, et al. 2019.** Detection of dicistroviruses RNA in blood of febrile Tanzanian children. *Emerg Microbes Infect* 8: 613-623. doi: 10.1080/2222-1751.2019.1603791
9. **Cox-Foster D, Conlan S, Holmes E, Palacios G, Evans J, Moran N, Quan P, et al. 2007.** A metagenomic survey of microbes in honeybee colony collapse disorder. *Science* 318: 283-287. doi: 10.1126/science.1146498
10. **Cutler S, Fooks A, van der Poel W. 2010.** Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerg Infect Dis* 16: 1-7. doi: 10.3201/eid1601.081467
11. **Chomel B, Belotto A, Meslin F. 2007.** Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. *Emerg Infect Dis* 13: 6-11. doi: 10.3201/eid1301.060480
12. **Day J, Ballard L, Duke M, Scheffler B, Zsak L. 2010.** Metagenomic analysis of the turkey gut RNA virus community. *Virology* 7: 313. doi: 10.1186/1743-422X-7-313
13. **D'Arcy C, Burnett P, Hewings A. 1981.** Detection, biological effects, and transmission of a virus of the aphid *Rhopalosiphum padi*. *Virology* 114: 268-272. doi: 10.1016/0042-6822(81)90275-0
14. **Duraisamy R, Akiana J, Davoust B, Mediannikov O, Michelle C, Robert C, Parra H, et al. 2018.** Detection of novel RNA viruses from free-living gorillas, Republic of the Congo: genetic diversity of picobirnaviruses. *Virus Genes* 54: 256-271. doi: 10.1007/s11262-018-1543-6
15. **Fawaz M, Vijayakumar P, Mishra A, Gandhale P, Dutta R, Kamble N, Sudhakar S, et al. 2016.** Duck gut viral metagenome analysis captures snapshot of viral diversity. *Gut Pathog* 8: 30. doi: 10.1186/s13099-016-0113-5
16. **Felippe P, da Silva L, Santos M, Spilki F, Arns C. 2010.** Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolated from domestic chicken flocks and coronaviruses from feral pigeons in Brazil between 2003 and 2009. *Avian Dis* 54: 1191-1196. doi: 10.1637/9371-041510-Reg.1

17. **Feng Y, Krueger E, Liu S, Dorman K, Bonning B, Miller W. 2017.** Discovery of known and novel viral genomes in soybean aphid by deep sequencing. *Phytobiomes J* 1: 36-45. doi: 10.1094/PBIOMES-11-16-0013-R.
18. **Gill F, Donsker D, Rasmussen P. 2022.** IOC World Bird List (v12.1). doi: 10.14344/IOC.ML.12.1
19. **Gomariz-Zilber E, Thomas-Orillard M. 1993.** Drosophila C virus and Drosophila hosts: a good association in various environments. *J Evolution Biol* 6: 677-689. doi: 10.1006/jipa.1995.1037
20. **Guo Z, He J, Xu H, Weng S. 2013.** Pathogenicity and complete genome sequence analysis of the mud crab dicistrovirus-1. *Virus Res* 171: 8-14. doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.002
21. **Hasson K, Lightner D, Poulos B, Redman R, White B, Brock J, Bonami J. 1995.** Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. *Dis Aquat Organ* 23: 115-126. doi: 10.3354/dao02258
22. **Hatfill S, Williamson C, Kirby R, von Wechmar M. 1990.** Identification and localization of aphid lethal paralysis virus particles in thin tissue sections of the *Rhopalosiphum padi* aphid by *in situ* nucleic acid hybridization. *J Invertebr Pathol* 55: 265-271. doi: 10.1016/0022-2011(90)90062-b
23. **Jan E. 2006.** Divergent IRES elements in invertebrates. *Virus Res* 119: 16-28. doi: 10.1016/j.virusres.2005.10.011
24. **Kapoor A, Mehta N, Esper F, Poljsak-Prijatelj M, Quan P-L, Qaisar N, Delwart E, et al. 2010.** Identification and characterization of a new Bocavirus species in gorillas. *Plos One* 5: e11948. doi: 10.1371/journal.pone.0011948
25. **Krumbholz A, Groth M, Esefeld J, Peter H, Zeld R. 2017.** Genome sequence of a novel picorna-like RNA virus from feces of the antarctic fur seal (*Arctocephalus gazella*). *Genome Announc* 5: 17-18. doi: 10.1128/genomeA.01001-17
26. **Li L, Victoria J, Wang Ch, Jones M, Fellers G, Kunz T, Delwart E. 2010.** Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. *J Virol* 84: 6955-6965. doi: 10.1128/JVI.00501-10
27. **Łukaszuk E, Stenzel T. 2020.** Occurrence and role of selected RNA-viruses as potential causative agents of watery droppings in pigeons. *Pathogens* 9: 1025. doi:10.3390/pathogens9121025
28. **Mackenzie J, Jeggo M. 2013.** Reservoirs and vectors of emerging viruses. *Curr Opin Virol* 3: 170-179. doi: 10.1016/j.coviro.2013.02.002
29. **Magnino S, Haag-Wackernagel D, Geigenfeind I, Helmecke S, Dovc A, Prukner-Radovciæ E, Residbegoviæ E, Ilieski V, et al. 2009.** Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: review of data and focus on public health implications. *Vet Microbiol* 135: 54-67. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.045
30. **Molineri A, Giacobino A, Pacini A, Bulacio N, Cagnolo N, Fondevilla N, Ferruffino C, et al. 2017.** Risk factors for the presence of deformed wing virus and acute bee paralysis virus under temperate and subtropical climate in Argentinian bee colonies. *Prev Vet Med* 140: 106-111. doi: 10.1016/j.prevetmed.-2017.02.019
31. **Nakashima N, Uchiumi T. 2009.** Functional analysis of structural motifs in dicistroviruses. *Virus Research* 139: 137-47. doi: 10.1016/j.virusres.2008.-06.006
32. **Nakasu E, Hedil M, Nagata T, Michereff-Filho M, Lucena V, Inoue-Nagata A. 2019.** Complete genome sequence and phylogenetic analysis of a novel dicistrovirus associated with the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virus Res* 260: 49-52. doi: 10.1016/j.virusres.2018.-11.008
33. **Phan T, Kapusinszky B, Wang C, Rose R, Lipton H, et al. 2011.** The fecal viral flora of wild rodents. *Plos Pathog* 7: e1002218. doi: 10.1371/journal.ppat.-1002218

34. **Phan TG, Vo NP, Boros A, Pankovics P, Reuter G, Li OT, Wang C, Deng X, Poon LL, Delwart E. 2013.** The viruses of wild pigeon droppings. *PLoS One* 8: e72787. doi: 10.1371/journal.pone.0072787
35. **Phan TG, Del Valle Mendoza J, Sadeghi M, Altan E, Deng X, Delwart E. 2018.** Sera of Peruvians with fever of unknown origins include viral nucleic acids from non-vertebrate hosts. *Virus Genes* 54: 33-40. doi: 10.1007/s11262-017-1514-3
36. **Reinganum C, O'Loughlin G, Hogan T. 1970.** A nonoccluded virus of the field crickets *Teleogryllus oceanicus* and *T. commodus* (Orthoptera: Gryllidae). *J Invertebr Pathol* 16: 214-220. doi: 10.1016/0022-2011(70)90062-5
37. **Remnant E, Shi M, Buchmann G, Blacquièrre T, Holmes E, Beekman M, Ashe A. 2017.** A diverse range of novel RNA viruses in geographically distinct honey bee populations. *J Virol* 91: e00158-17. doi: 10.1128/JVI.00158-17
38. **Reynaldi F, Sguazza G, Tizzano M, Fuentealba N, Galosi C, Pecoraro M. 2011.** First report of Israeli acute paralysis virus in asymptomatic hives of Argentina. *Rev Argent Microbiol* 43: 84-86.
39. **Reuter G, Pankovics P, Gyöngyi Z, Delwart E, Boros A. 2014.** Novel dicistrovirus from bat guano. *Arch Virol* 159: 3453-3456. doi: 10.1007/s00705-014-2212-2
40. **Roberts J, Anderson D, Durr P. 2018.** Metagenomic analysis of Varroa-free Australian honey bees (*Apis mellifera*) shows a diverse Picornavirales virome. *J Gen Virol* 99: 818-826. doi: 10.1099/jgv.0.001073
41. **Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B. 2010.** Biology and control of Varroa destructor. *J Invertebr Pathol* 103(Suppl 1): S96-119. doi: 10.1016/j.jip.2009.07.016
42. **Rumschlag-Booms E, Rong L. 2013.** Influenza a virus entry: implications in virulence and future therapeutics. *Adv Virol* 2013: 121924. doi: 10.1155/2013/121924
43. **Runckel C, Flenniken M, Engel J, Ruby J, Ganem D, Andino R, DeRisi J. 2019.** Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, Nosema, and Crithidia. *Plos One* 6: e20656. doi: 10.1371/journal.pone.0020656
44. **Sguazza G, Reynaldi F, Galosi C, Pecoraro M. 2013.** Simultaneous detection of bee viruses by multiplex PCR. *J Virol Methods* 194: 102-106. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.08.003
45. **Susevich M, Reynaldi F, Marti G, Echeverria M. 2019.** Primer hallazgo del virus de la parálisis aguda israelí (IAPV) en *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Rev Soc Entomol Argent* 78: 36-39.
46. **Valles S, Chen Y, Firth A, Guérin D, Hashimoto Y, Herrero S, de Miranda J, Ryabov E. 2017.** ICTV virus taxonomy profile: Dicistroviridae. *J Gen Virol* 98: 355-356. doi: 10.1099/jgv.0.000756
47. **Wamonje F, Michuki G, Braidwood L, Njuguna J, Musembi Mutuku J, Djikeng A, Harvey J, et al. 2017.** Viral metagenomics of aphids present in bean and maize plots on mixed-use farms in Kenya reveals the presence of three dicistroviruses including a novel Big Sioux River virus-like dicistrovirus. *Virol J* 14: 188. doi: 10.1186/s12985-017-0854-x
48. **Zhang W, Yang S, Shan T, Hou R, Liu Z, Li W, Guo L, Wang Y, Chen P, Wang X. 2017.** Virome comparisons in wild-diseased and healthy captive giant pandas. *Microbiome* 5: 90. doi: 10.1186/s40168-017-0308-0
49. **Zhao W, Zhu A, Yuan C, Yu Y, Zhu C, Lan D, Yang Z, Cui L, Hua X. 2011.** Detection of astrovirus infection in pigeons (*Columbia livia*) during an outbreak of diarrhea. *Avian Pathol* 40: 361-365. doi: 10.1080/03079457.2011.587792