

Desarrollo de técnicas moleculares para el diagnóstico de patógenos apícolas bacterianos y virales

Antunez, K., D'Alessandro, B., Piccini, C., Zunino, P*.

RESUMEN

La actividad apícola ha venido adquiriendo cada vez mayor relevancia dentro del sector agroexportador. Sin embargo, la presencia de patógenos bacterianos como *Paenibacillus larvae larvae* y virales, como el virus de la parálisis crónica (CBPV) y el virus de la parálisis aguda (ABPV), representan un desafío para profesionales y apicultores. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar métodos moleculares para detectar diferentes patógenos apícolas. El ADN bacteriano fue extraído de larvas, abejas y miel, mientras que el ARN viral fue extraído de abejas. Para la detección de *P. l. larvae* se amplificó mediante PCR un fragmento del gen que codifica para el ARNr 16S y un fragmento que codifica para una metaloproteasa. Para la detección de los virus, se amplificó mediante RT-PCR un fragmento del gen que codifica para la ARN polimerasa viral del CBPV y un fragmento del gen que codifica para proteínas de la cápside en el caso del ABPV. *P. l. larvae* fue detectado en larvas, abejas y miel mientras que CBPV y ABPV fueron detectados en abejas. El diagnóstico exitoso de estos patógenos mediante técnicas moleculares puede contribuir en el desarrollo de estrategias de control de las enfermedades relacionadas con la apicultura en Uruguay.

Palabras clave: *Paenibacillus larvae larvae*, virus de abejas, PCR, RT-PCR.

SUMMARY

Apiculture has strongly developed in Uruguay during the recent years. However, the presence of pathogen bacteria such as *Paenibacillus larvae larvae* and viruses, like Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) and Acute Bee Paralysis Virus (ABPV) represents a challenging problem to professionals and bee-keepers. Therefore, the goal of the present work was to perform molecular methods to detect different pathogens that affect honeybees. Bacterial DNA was extracted from different samples including larvae, adult bees and honey, and viral RNA was extracted from adult bees. For the detection of *P. l. larvae*, a partial region of the 16S rRNA gene and a partial region of the gene that codifies for a metallo-protease were amplified by PCR. Amplification of a region of the CBPV gene that codifies for the viral RNA polymerase and amplification of a partial region of the gene that codifies for an ABPV capsid protein were done by RT-PCR. *P. l. larvae* was detected in larvae, bees and honey while CBPV and ABPV were detected in bees. Successful diagnosis of these bee pathogens from natural samples confirmed that these molecular techniques are fast and sensitive diagnosis tools that can contribute to the control of apiculture-related diseases in Uruguay.

Key words: *Paenibacillus larvae larvae*, honeybee virus, PCR, RT-PCR.

INTRODUCCIÓN

Dadas sus condiciones de vida y cuidado comunal, los insectos sociales son un blanco conspicuo para patógenos de diferentes clases tales como bacterias, virus, hongos y protozoarios, hecho que se pone claramente de manifiesto en el caso de las abejas melíferas (22).

La enfermedad bacteriana más severa que afecta a las larvas de abejas melíferas es la Loque Americana, causada por la bacteria Gram positiva formadora de esporas *Paenibacillus larvae* subespecie *larvae* y que da lugar a un progresivo desdoblamiento de las colonias afectadas culminando usualmente con la muerte de la colonia (19).

Esta enfermedad está distribuida mundialmente, habiéndose detectado casos en los cinco continentes (1). En el Uruguay se encuentra ampliamente distribuida, en particular en el litoral y sur del país (7). Las larvas de las obreras, reinas y zánganos se infectan al ingerir alimento contaminado con esporas. A los pocos días ocurre la infección sistémica, la larva muere y se degrada por la acción de enzimas proteolíticas bacterianas. Aquellas larvas menores de 24 hs son las más susceptibles a la infección y necesitan un bajo número de esporas para infectarse mientras que larvas mayores se tornan progresivamente más resistentes (14). Se ha propuesto que la resistencia se debe a

la presencia de compuestos inhibidores del crecimiento bacteriano en el intestino de la larva de más de 24 hs. (15). Aunque las abejas adultas no sufren la enfermedad, las esporas pueden permanecer en el tracto digestivo por más de dos meses, favoreciendo su diseminación.

Por otra parte, también se han descrito y caracterizado más de dieciocho virus que afectan a las abejas, entre ellos el virus de la Parálisis Crónica (CBPV) y el virus de la Parálisis Aguda (ABPV) (10). El CBPV fue uno de los primeros virus aislados de las abejas (8). Éste es uno de los pocos virus que causan infecciones sintomáticas, observándose abejas temblorosas, que no vuelan y se arrastran en la

Laboratorio de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Montevideo, Uruguay. Avenida Italia 3318, Montevideo, CP11600, Uruguay. E-mail: *pablo@iibce.edu.uy
Este trabajo fue presentado al 12° Simposio Internacional de la Asociación Mundial de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario, realizado en noviembre del 2006.

Recibido: 13-03-06 Aprobado: 25-04-06

entrada de la colmena. Se puede multiplicar hasta altos niveles de partículas virales en las abejas y causa pérdidas significativas a los apicultores. Las condiciones de deficiencia nutricional y el mal tiempo asociados a verano e inviernos severos favorecen los brotes de este virus (4). Por el contrario, el ABPV es un agente infeccioso común en las abejas, que causa infecciones asintomáticas (4,9). Se ha postulado que este virus fue el factor desencadenante en las mortandades de abejas ocurridas en colmenas afectadas con el ácaro *Varroa destructor* en Estados Unidos y en diversos países de Europa (17,12, 23). La presencia de ambos virus ha sido reportada en diversos países alrededor del mundo (4) y recientemente en nuestro laboratorio se confirmó su presencia en Latinoamérica (6). Dado que los síntomas producidos por el CBPV pueden ser asociados a otras enfermedades de las abejas o a intoxicaciones con pesticidas, y que los dos virus pueden persistir en las poblaciones como infecciones inaparentes o latentes, para confirmar su presencia se requiere un diagnóstico de laboratorio (26,11).

En los últimos años la apicultura ha experimentado un notable desarrollo en Uruguay. Sin embargo, la presencia de patógenos bacterianos como *P. l. larvae* (causante de la Loque Americana) o virus, en particular de la Parálisis Crónica (CBPV) y de la Parálisis Aguda (ABPV), potencialmente asociados a episodios de despoblamiento de colmenas en el país, representan graves problemas sanitarios. Las técnicas de diagnóstico molecular pueden ahorrar mucho tiempo y dinero cuando se aplican en gran escala, siendo una herramienta valiosa para evaluar la presencia de estos patógenos.

El objetivo del presente trabajo fue poner a punto técnicas moleculares para el diagnóstico de los mencionados patógenos apícolas. En el caso de *P. l. larvae* se desarrollaron dos técnicas en base a PCR, amplificando un fragmento de 700 pb correspondiente al gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal (ARNr 16S) y otro de 280 pb correspondiente al gen que codifica una metaloproteasa dependiente de zinc. Para detectar la presencia de CBPV y

ABPV en muestras de abejas se desarrolló un método de diagnóstico basado en RT-PCR ya que ambos son virus RNA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de larvas, abejas y miel para la detección de *P. l. larvae*

Para estos ensayos se emplearon dos muestras de larvas de *Apis mellifera* con síntomas de Loque Americana provenientes de apiarios ubicados en Colonia, dos muestras de abejas adultas de apiarios ubicados en Paysandú y nueve muestras de miel de apiarios localizados en diferentes regiones geográficas de nuestro país (cuadro 1).

Cultivo de *P. l. larvae*

Para el cultivo bacteriano, los restos larvales se suspendieron en 1 ml de agua destilada estéril y se sometieron a shock térmico a 80° C durante 20 min. Este método activa las esporas de *P. l. larvae* y elimina otras bacterias no formadoras de esporas (3). Luego de una agitación vigorosa la suspensión se centrifugó a 650 x g durante 5 min en para eliminar los restos larvales. El sobrenadante se sembró en placas de agar J: triptona 0,5 %

(Difco), extracto de levadura 1,5 % (Difco), K₂H₂PO₄ 0, 2 %, glucosa 0,3 %, agar 1,5 % (Difco) (20). El medio se suplementó con 9 µg/ml de ácido nalidixico (Sigma) (J/Nal), para inhibir el crecimiento de otros microorganismos pertenecientes a la flora normal de las colmenas (2) como *Paenibacillus alvei* que puede invadir las placas impidiendo el desarrollo de *P. l. larvae*.

En el caso del cultivo a partir de abejas adultas, se tomaron grupos de 20 abejas obreras muertas y se colocaron en una bolsa estéril para procesamiento en *Stomacher*. Se agregaron 10 ml de agua destilada estéril y se homogeneizó en un *Stomacher* 80 Lab Blender (Seward) a velocidad máxima durante 2 min. La muestra se centrifugó a 500 x g durante 5 min para eliminar restos de abejas y el sobrenadante se centrifugó a 6000 x g por 40 min para obtener las esporas. El *pellet* se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril, se calentó a 80° C durante 20 min y se sembraron 200 µl por placa de agar J/Nal.

Para el cultivo de *P. l. larvae* a partir de miel, se tomaron 20 ml de miel y se agregaron 20 ml de agua destilada estéril. La mezcla se homogeneizó vigorosamente y

Cuadro 1. Fuente y localización geográfica de las cepas de *P.l.larvas*.

Nombre	Fuente	Departamento
86	miel	Canelones
30	miel	Tacuarembó
44	miel	Durazno
20	miel	Flores
81	miel	Florida
99	miel	Lavalleja
14	miel	Maldonado
46	miel	Treinta y Tres
75	miel	Río Negro
A4	abejas	Paysandú
A5	abejas	Paysandú
OL1	larvas	Colonia
OL4	larvas	Colonia

se centrifugó a 6000 x g durante 45 min para obtener las esporas. El *pellet* se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril, se calentó durante 20 min a 80 °C y se sembraron 200 μ l por duplicado en agar J/Nal.

En todos los casos las placas se incubaron a 37 °C en microaerofilia (5-10% de CO₂) durante 2 a 3 días hasta observar crecimiento bacteriano.

Una colonia de cada muestra obtenida en agar J fue seleccionada para la identificación inicial, mediante análisis macroscópico y microscópico de la colonia y pruebas bioquímicas estándar (3).

Extracción de ADN bacteriano

El ADN molde para las reacciones de PCR se extrajo a partir de los cultivos bacterianos obtenidos así como de los restos larvales directamente, como se detalla a continuación.

Para la detección de *P. l. larvae* a partir de cultivos puros del microorganismo, el ADN se obtuvo mediante la técnica descrita por Govan *et al.* (18). Esta técnica consiste en suspender una colonia en 200 μ l de agua destilada estéril, calentar la suspensión obtenida a 95 °C durante 15 min y centrifugar a 5000 x g durante 5 min para eliminar restos celulares. El sobrenadante obtenido se utilizó como molde para PCR.

Para la detección directa de *P. l. larvae* a partir de restos larvales, se utilizó la técnica descrita por Piccini *et al.*, (24). Los restos se colocaron en forma individual en tubos de microcentrifuga y se sometieron a tratamiento de microondas durante 7 minutos a potencia máxima. Luego, cada larva se suspendió en 300 μ l de agua destilada estéril, se agitó vigorosamente en *vortex* durante 3 minutos y se centrifugó a 825 x g durante 5 minutos para eliminar restos larvales. Con el fin de atenuar el posible efecto de inhibidores de la reacción, el sobrenadante obtenido luego de la última centrifugación se diluyó en forma seriada en agua estéril y 1 μ l de cada dilución se empleó como molde para las reacciones de PCR.

PCR para detección de *P. l. larvae*

Con el fin de detectar la presencia de *P. l. larvae* por medio de PCR se diseñaron dos estrategias de amplificación génica.

Se emplearon los *primers* P15 y P14, diseñados por Piccini *et al.* (24) para amplificar específicamente un fragmento de 700 pb correspondiente al gen que codifica el ARNr 16S de *P. l. larvae*. La secuencia de los *primers* se dedujo a partir de secuencias disponibles en las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), las que fueron analizadas para confirmar que no presentaban homología con ninguna otra especie bacteriana (número de acceso: AY030079). Los *primers* utilizados fueron: P15: 5'-CGAGCGGACCTTGTTGTTTC-3' (posiciones 8 a 26), y P14: 5'-TCAGTTATAGGCCAGAAAGC-3' (posiciones 992 a 973) (24). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 25 μ l conteniendo: 1X buffer de la enzima, 0.2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 0.4 μ M de cada *primer*, 1 U de Taq ADN polimerasa y agua destilada estéril y por último 1 μ l del ADN molde. Todos los productos para PCR fueron obtenidos de Gibco BRL. El programa empleado consistió en: 1 min a 95 °C, 30 ciclos de: 1 min a 93 °C, 30 seg a 60 °C, 1 min a 72 °C y un ciclo final de extensión a 72 °C durante 5 min.

En segundo término, se puso a punto una reacción de amplificación de una región del gen de la metaloproteasa dependiente de Zn, un factor potencial de virulencia de *P. l. larvae*. Para ello se emplearon los *primers* Prot.1 5'-GCAGCAAT-

CGTATTCAG-3' y Prot.2 5'-GGT-CCTTTGTAACGATTG-3' diseñados en base a la secuencia publicada de la proteasa de *P. l. larvae* (n° acceso AF111421), para amplificar un producto de 280 pb. Los reactivos así como el programa de ciclado fue similar al descrito previamente para la amplificación de gen de ARNr 16S.

Las reacciones se realizaron en un termociclador Biometra T1 y el tamaño de los productos obtenidos se determinó en geles de agarosa 0.8% (Gibco) teñidos con bromuro de etidio 0.5 mg/ml.

En ambos casos se realizaron controles negativos de la reacciones, sin incluir ADN en las mismas. Para corroborar la especificidad del método se utilizó también ADN de microorganismos relacionados tanto desde el punto de vista filogenético como ecológico (cuadro 2).

Muestras de abejas para detección de virus

En estos análisis se emplearon muestras de abejas *Apis mellifera* de apiarios localizados en los departamentos de Soriano, Canelones, San José, Maldonado, Lavalleja y Rivera, que se muestran en cuadro 3 de la sección Resultados.

Extracción de ARN viral

Se seleccionaron al azar 10 abejas de cada muestra y se homogeneizaron en 10 ml

Cuadro 2. Cepas utilizadas como control.

Cepas Bacterianas	Fuente
<i>Paenibacillus alvei</i>	Colmena (Colonia, Uruguay)
<i>Paenibacillus macerans</i>	Colmena (Colonia, Uruguay)
<i>P. l. pulvifaciens</i> (NRRL B-14152)	Dra. A. Alippi (UNLP)
<i>Bacillus brevis</i>	Colmena (Colonia, Uruguay)
<i>Bacillus cereus</i> (BZ904)	B-Z Laboratorio (Uruguay)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Colmena (Colonia, Uruguay)
<i>Bacillus megaterium</i>	Colmena (Colonia, Uruguay)
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6133)	ATCC (USA)
<i>Corynebacterium propinquum</i>	Colmena (Colonia, Uruguay)

Cuadro 3. Análisis de la presencia de CBPV y ABPV mediante RT-PCR

Nombre	Departamento	CBPV	ABPV
V5	San José	+	-
V6	San José	-	-
V7	Colonia	+	-
AL	Colonia	+	+
3L	Colonia	-	+
V9	Colonia	-	+
V10	Colonia	+	-
V12	Colonia	-	+
V13	Colonia	+	+
V14	Colonia	+	+
V15	Colonia	+	+
V16	Colonia	+	+
V17	Colonia	-	+
V18	Maldonado	+	+
V19	Maldonado	+	+
V20	Maldonado	+	+
V21	Maldonado	+	-
V22	Rivera	+	-
V23	Lavalleja	-	-
V24	Lavalleja	+	-
V25	Lavalleja	+	+
V26	Lavalleja	+	-
V27	Lavalleja	+	+
V28	Colonia	+	-
V29	San José	+	+
V30	Rivera	+	+
V31	Colonia	+	-
V32	Canelones	-	-
V33	Canelones	-	+
V40	Mercedes	-	-
V46	Maldonado	-	-
V50	Colonia	-	-
V52	Maldonado	+	-
V57	Maldonado	-	-
V58	Colonia	-	-
V59	Canelones	-	+

de agua destilada estéril. Se realizaron dos centrifugaciones sucesivas y el sobrenadante fue utilizado para la extracción de ARN viral, empleando el kit específico para estos fines QIAamp Viral RNA Minikit (QIAGEN), de acuerdo a las condiciones del fabricante. Estos productos se emplearon para RT-PCR.

RT-PCR para diagnóstico de CBPV y ABPV

Tanto el virus CBPV como APVB son virus ARN por lo cual es necesario generar inicialmente el ADN complementario a partir del ARN viral para poder llevar a cabo posteriormente la amplificación de los genes seleccionados. Para detectar el CBPV se utilizaron los *primers* CBPV1 (5'-AGTTGTCATGGTTAA-CAGGATACGAG-3') y CBPV2 (5'-TCTAATCTTAGCACGAAAGC-CGAG-3'), desarrollados por Ribiere *et al.* (25) y que amplifican una región del gen de la RNA polimerasa viral. Para la detección del ABPV se emplearon los *primers* ABPV1 (5'-TTATGTGTCCA-GAGACTGTATCCA-3') y ABPV2 (5'-GCTCCTATTGCTCGGTTTTT-CGGT-3'), diseñados por Benjeddou *et al.* (13) y que amplifican una región del gen de la proteína de la cápside. La RT-PCR fue realizada con el kit One Step PCR Kit (QIAGEN), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Biometra T1 y el tamaño de los productos obtenidos se determinó en geles de agarosa 0.8% (Gibco) teñidos con bromuro de etidio 0.5 mg/ml. En ambos casos se realizaron controles negativos de la reacciones, sin incluir ARN en las mismas.

Secuenciación de los productos de PCR y RT-PCR

Los productos de PCR y RT-PCR se purificaron a partir de las bandas escindidas de los geles de agarosa utilizando el kit comercial *Concert Rapid Gel Extraction System* (Life Technologies), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La secuenciación del ADN se llevó a cabo en el Centro Técnico de Análisis Genéticos de la Facultad de Ciencias, Universidad de la República, utilizando un secuenciador automático Applied Biosys-

tems (model 377). La búsqueda de similitud de secuencias se realizó por medio del programa BLAST del NCBI.

RESULTADOS

Cultivos puros de *P. l. larvae*

En todas las muestras de larvas, abejas y miel analizadas en agar J se obtuvieron colonias típicas de *P. l. larvae*, resultando ser bacilos Gram positivos, catalasa, Voges-Proskauer, crecimiento en caldo nutritivo e hidrólisis de almidón negativas y fueron capaces de licuar la gelatina, concordando con las características descriptas para la bacteria (3). La lista de cepas obtenidas se muestra en el cuadro 1.

Detección de *P. l. larvae* por cultivo y amplificación del gen del ARNr 16S

La técnica de PCR para detectar la presencia de *P. l. larvae* basada en la amplificación del gen del ARNr 16S resultó exitosa, ya que se logró amplificar el fragmento esperado a partir de cultivos puros del microorganismo obtenidos de larvas, abejas y miel de diferentes zonas geográficas de nuestro país (figura 1), mientras que no se obtuvieron productos de amplificación en los controles negativos.

La especificidad de la técnica se comprobó utilizando ADN extraído de cultivos puros de microorganismos relacionados, tanto ecológica como filogenéticamente

(cuadro 2), no obteniéndose productos de amplificación (datos no mostrados).

Por otro lado, se logró la detección de ADN del patógeno directamente de restos larvales, utilizando una técnica de

extracción por microondas sin paso previo de aislamiento. Si bien en este caso existió inhibición de la reacción debida a algunos componentes presentes en la larva, esta inhibición se evitó al diluir el ADN extraído (figura 2).

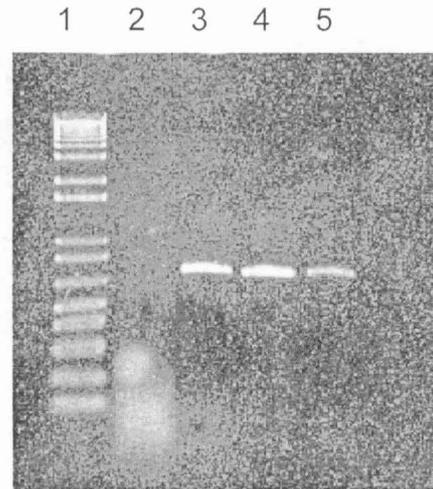


Figura 2. Identificación por PCR de *P.l.larvae* a partir de restos de larvas muertas por Loque Americana, utilizando *primers* que amplifican una región del ARNr 16S. La flecha indica el fragmento de ADN amplificado de 700 pb.

Carriles: 1) marcador 1 Kb plus (BioRad), 2) ADN restos de larvas (OL1) sin diluir, 3) dilución 10-1 del ADN, 4) dilución 10-2 del ADN, 5) dilución 10-3 del ADN.

Detección de *P. l. larvae* por amplificación del gen de una metaloproteasa

Los *primers* que amplifican una región del gen de la proteasa también permitieron detectar específicamente a *P. l. larvae*, ya que lograron amplificar ADN de cultivos puros de este

microorganismo obtenidos de larvas y miel de diferentes zonas geográficas de nuestro país (figura 3). La técnica también resultó específica ya que no se obtuvieron productos de amplificación al utilizar ADN de otros microorganismos relacionados ni en los controles negativos (datos no mostrados).

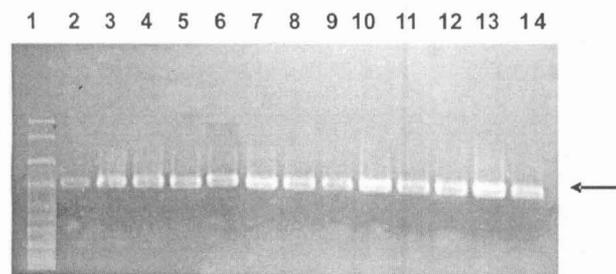


Figura 1. Identificación por PCR de *P.l.larvae* a partir de cultivos puros obtenidos de miel, abejas y larvas de diferentes regiones geográficas del país, utilizando *primers* que amplifican una región del ARNr 16S. La flecha indica el fragmento de ADN amplificado de 700 pb.

Carriles: 1) marcador 1 Kb (Fermentas), 2) al 14) aislamientos de diferentes orígenes mostrados en el cuadro 1: 2) 86, 3) 30, 4) 44, 5) 20, 6) 81, 7) 99, 8) 14, 9) 46, 10) 75, 11) A4, 12) A5 13) OLI, 14) OL4.

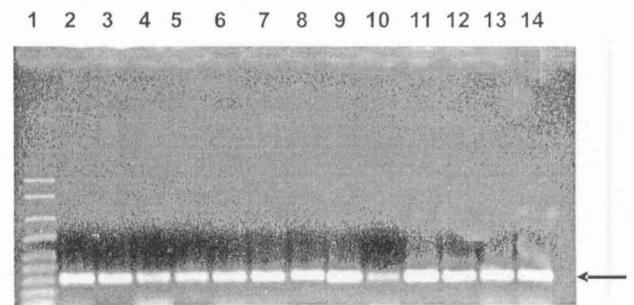


Figura 3. Identificación por PCR de *P.l.larvae* a partir de cultivos puros obtenidos de miel, y larvas de diferentes regiones geográficas del país, utilizando *primers* que amplifican una región de una proteasa. La flecha indica el fragmento de ADN amplificado de 280 pb.

Carriles: 1) marcador 1 Kb (Fermentas), 2) al 14) aislamientos de diferentes orígenes mostrados en el cuadro 1: 2) 86, 3) 30, 4) 44, 5) 20, 6) 81, 7) 99, 8) 14, 9) 46, 10) 75, 11) A4, 12) A5 13) OLI, 14) OL4.

Los productos obtenidos del gen de ARNr 16S y de la metaloproteasa fueron secuenciados y comparados con la base de datos del NCBI, obteniéndose en ambos casos un alto porcentaje de similitud (99%) con las secuencias publicadas, confirmando la identificación.

Detección de CPBV y APBV por RT-PCR

En la segunda parte de este trabajo, se amplificó una banda de 450 pb correspondiente al virus CBPV y una banda de 900 pb correspondiente al virus ABPV, a partir de muestras de abejas de diferentes regiones geográficas de nuestro país (figura 4). No se obtuvieron productos de amplificación en los controles negativos.

Los productos obtenidos fueron secuenciados y comparados con la base de datos del NCBI. En el caso del CBPV se obtuvo un 87 % de similitud con otras secuencias nucleotídicas publicadas de este virus y un 84 % en el caso de ABPV. Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos del NCBI, bajo los n° de acceso AY763287 para CBPV y AY763414 para ABPV (6).

Diez muestras resultaron infectadas con CBPV, seis con ABPV, doce muestras resultaron co-infectadas por ambos virus y sólo ocho muestras resultaron negativas para ambos. Los resultados se muestran en la figura 4 y el cuadro 3.

DISCUSIÓN

Los métodos moleculares basados en la amplificación de genes específicos mediante PCR o RT-PCR se han convertido

en estos últimos años en métodos de diagnóstico de elección para distintos patógenos de naturaleza diversa. Estas técnicas permiten la detección de microorganismos en forma rápida, segura y económica (21). La adaptación de estas técnicas con el fin de detectar patógenos de interés en apicultura puede constituir una valiosa alternativa para contribuir a la sanidad en un rubro agropecuario de creciente expansión en nuestro país.

En este trabajo se logró la detección de *P. l. larvae* a partir de cultivos puros de microorganismos obtenidos de diferentes muestras apícolas (larvas, abejas y miel) y directamente de larvas infectadas mediante PCR. Además, la técnica resultó altamente específica ya que la reacción fue negativa cuando se empleó un conjunto de especies relacionadas tanto desde un punto de vista taxonómico como ecológico, incluyendo la subespecie *P. l. pulvifaciens*.

La detección directa por PCR empleando muestras naturales presenta complicaciones frecuentes ya que los materiales biológicos contienen una variedad de compuestos que pueden inhibir la acción de la ADN polimerasa (27). En el presente trabajo la detección directa a partir de larvas con Loque Americana confirmó la presencia de inhibidores de PCR en las mismas, lo que pudo ser sobrellevado mediante una estrategia sencilla de dilución.

Es importante destacar que recientemente se puso a punto una técnica que permite la detección de esporas de *P. l. larvae* directamente a partir de muestras de abejas o miel, que utiliza el mismo

par de *primers* que amplifican la región de 700 pb del gen del ARNr 16S (16). La técnica incluye un paso inicial de desnaturalización química de la cubierta protectora de las esporas, disrupción enzimática de las mismas y precipitación del ADN con etanol. La detección directa a partir de larvas, abejas y miel sin la necesidad de un paso previo de cultivo permitirá disminuir los tiempos y los costos del diagnóstico.

Otra de las técnicas de diagnóstico molecular presentadas en este trabajo, la RT-PCR, permitió detectar la presencia de los virus ABPV y CBPV en muestras de abejas. A partir de este estudio incluso se determinó la coinfección de colonias por ABPV y CBPV. Estos resultados muestran la utilidad de la técnica para la confirmación e identificación de la presencia de virus en muestras de abejas, lo que no se podría lograr únicamente mediante la observación de la sintomatología de campo.

La posible asociación de éstos y otros virus patógenos con recientes y periódicos episodios de despoblación de colmenas en distintas zonas del país se encuentra actualmente en estudio. Este fenómeno, denominado por algunos autores como "síndrome de despoblación de colmenas" puede estar vinculado con diversas causas y su incidencia se ha visto incrementada en el mundo entero en los últimos años.

Recientemente hemos desarrollado variaciones de esta técnica con el fin de detectar la posible presencia de otros virus patógenos de interés en apicultura como virus de la celda negra, virus de la cría ensacada y virus de las alas deformadas (5).

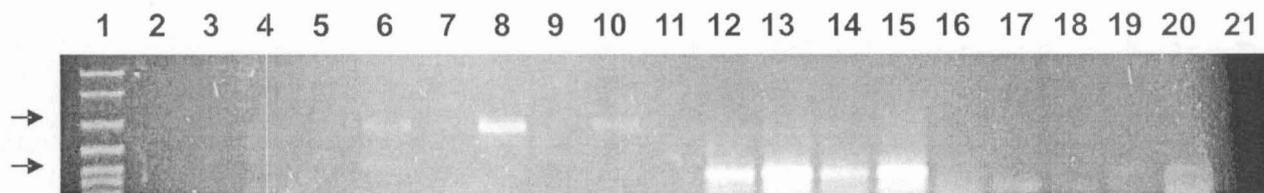


Figura 4. Identificación por RT-PCR de ABPV y CBPV, utilizando *primers* específicos para la detección de estos virus. La flecha superior e inferior indican las bandas de 900 y 455 pb correspondientes al ABPV y al CBPV respectivamente.

Carriles: 1) marcador, 1 Kb (Fermentas), de 2) al 11) detección de ABPV: 2) V5, 3) V7, 4) V10, 5) V21, 6) V25, 7) V32, 8) V33, 9) V46, 10) V59, 11) V58, 12) al 21) detección de CBPV: 12) V5, 13) V7, 14) V10, 15) V21, 16) V25, 17) V32, 18) V33, 19) V46, 20) V59, 21) V58.

CONCLUSIONES

Las técnicas de diagnóstico molecular (PCR y RT-PCR) empleadas en este trabajo con el fin de diagnosticar diferentes patógenos de interés en apicultura resultaron ampliamente satisfactorias para el diagnóstico de *P. l. larvae* empleando distintas aproximaciones y de los virus cau-

santes de las parálisis crónica y aguda (CBPV y ABPV respectivamente).

Estos métodos presentan un gran potencial tanto para la evaluación sanitaria cotidiana de las colmenas como para la generación de información que pueda sentar bases para el diseño de programas de control de patógenos y sanidad apícola en general.

Agradecimientos

Al Dr. Eduardo Corbella por su colaboración en distintos aspectos del trabajo. Este estudio fue financiado por el INIA.

Referencias Bibliográficas

1. Alippi, A. y Aguilar, M. (1998). Unique DNA fingerprint patterns of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae* strains. *J. Apicult. Res.* 37: 273-280.
2. Alippi, A. (1995). Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinean honeys by using a semi-selective medium. *Microbiología Sem.* 11: 343-350.
3. Alippi, A. (1992). Characterization of *Bacillus larvae* White, the causative agent of American Foulbrood of honey bees. First record of its occurrence in Argentina. *Rev. Arg. Microbiol.* 24: 67-72.
4. Allen, M. F. y Ball, B.V. (1996). The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World* 77: 141-162.
5. Antúnez, K.; D'Alessandro, B.; Corbella, E. y Zunino, P. (2006). Honeybee viruses in Uruguay. Enviado al *J. Invert. Pathol.*
6. Antúnez, K.; D'Alessandro, B.; Corbella, E. y Zunino, P. (2005). Detection of Chronic bee paralysis virus and Acute bee paralysis virus in Uruguayan honeybees. *J. Invert. Pathol.* 90: 69-72.
7. Antúnez, K.; D'Alessandro, B.; Piccini, C.; Corbella, E. y Zunino, P. (2004). *Paenibacillus larvae larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey. *J. Invert. Pathol.* 86: 56-58.
8. Bailey, L. (1968). The purification and properties of chronic bee paralysis virus. *J. Gen. Virol.* 2: 251-260.
9. Bailey, L.; Gibbs, A. J. y Woods, R. D. (1963). Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology* 21: 390-395.
10. Ball, B. V. y Bailey, L. (1991). Virus of honey bees. En: Adams J. R.; Bonami J. R. Eds. Atlas of invertebrate viruses. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 525-551.
11. Ball, B. V. (1996). Honey bee viruses: a cause of concern? *Bee World* 77: 117-119.
12. Bekesi, L.; Ball, B. V.; Dobos-Kovaacs, M.; Bakonyi, T. y Rusvai, M. (1999). Occurrence of acute paralysis virus of the honey bee (*Apis mellifera*) in a Hungarian apiary infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Acta Vet. Hung.* 47: 319-324
13. Benjeddou, M.; Leat, N.; Allsopp, M. y Davison, S. (2001). Detection of acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2384-2387
14. Brodsagaard, C. J.; Ritter, W. y Hansen, H. (1998). Response of *in vitro* reared honey bee larvae to various doses of *Paenibacillus larvae larvae* spores. *Apidologie* 29: 569-578.
15. Crailsheim, K. y Riessberger-Gallé U. (2001). Honey bee age-dependent resistance against American Foulbrood. *Apidologie* 32: 91-103.
16. D'Alessandro B.; Antúnez K.; Piccini C. y Zunino P. (2006). DNA extraction and PCR detection of *Paenibacillus larvae larvae* spores in honey and bee samples. Enviado al *W. J. Microbiol. Biotechnol.*
17. Faucon, J. P. y Pepin, M. (2002). Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. *Apidologie* 33: 339-351.
18. Govan, V. A.; Allsopp, M. H. y Davison, S. (1999). A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae larvae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2243-2345.
19. Hansen, H. y Brødsgaard, C. (1999). American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World* 80, 5-23.
20. Hornitzky M. A. Z. y Nicholls P. J. (1993). J medium is superior to Sheep Blood Agar and Brain Heart Infusion for the isolation of *Bacillus larvae* from honey samples. *J. Apicult. Res.* 32: 51-52.
21. Kolbert, C. P. y Persing, D.H. (1999). Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 299-305.
22. Morse R. A. y Flottum, K. 1997. Honey bee pests, predators and diseases. 3rd ed. A. I. Root Co., Medina, O.H. 718 pp.
23. Nordstrom, S.; Fries, A.; Aarhus, H.; Hansen, H. y Korpela, S. (1999). Virus infections in Nordic honey bee colonies with no, low or severe *Varroa jacobsoni* infestation. *Apidologie* 30: 457-466.
24. Piccini, C.; D'Alessandro, B.; Antúnez, K. y Zunino, P. (2002). Detection of *Paenibacillus larvae larvae* subspecies *larvae* spores in naturally infected larvae and artificially contaminated honey by PCR. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 761-765.
25. Ribiere, M.; Tribolout, C.; Mathieu, L.; Aurieres, C.; Faucon, J. P. y Pepin, M. (2002). Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. *Apidologie* 33: 339-351.
26. Shimanuki, H. (1997). Synonymy in bee disease. En: Morse, R. A., Flottum, K. Eds. Honey bee Pests, Predators and Diseases. AI Root Company, Medina, pp. 534-537.
27. Wilson I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3741-3751.