

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y EL MAR
ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS**

**Estandarización y validación del PCR para el diagnóstico de
Loque Americana (*Paenibacillus larvae*) y Loque Europea
(*Melissococcus plutonius*), en abejas *Apis mellifera***

Práctica dirigida para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica

Estudiante

Yinnel de los Ángeles Soto Araya

Tutora

Licda. Guisella Chaves Guevara

Asesores

M. Sc. Bernal León Rodríguez

M.Sc. Silvia Elena Berrocal Montero

**Campus Omar Dengo
Heredia, Costa Rica, 2017**

**Estandarización y validación del PCR para el diagnóstico de
Loque Americana (*Paenibacillus larvae*) y Loque Europea
(*Melissococcus plutonius*), en abejas *Apis mellifera***

Estudiante

Yinnel de los Ángeles Soto Araya

**Trabajo final de graduación de tesis sometida a consideración del
tribunal examinador de la Escuela de Ciencias Agrarias para optar
por el grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica.**

Trabajo final de Graduación presentado como requisito parcial para optar al grado de Licenciado en Ingeniería Agronómica.

Tribunal Examinador

M.Sc. Tomas Marino Herrera
Decano FCTM

Dr. Evelio Granados Carvajal
Director Escuela de Ciencias Agrarias

Licda. Guisella Chaves Guevara
Directora de Tesis

M.Sc. Bernal León Rodríguez
Asesor

M.Sc. Silvia Elena Berrocal Montero
Asesora

Yinnel de los Ángeles Soto Araya
Estudiante

DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente, y por haber puesto en mi camino a todas aquellas maravillosas personas, con un corazón de oro, que han sido mi soporte y compañía durante toda esta aventura denominada vida. Gracias por tu infinita bondad y amor.

A mi mamita Dunnia por darme la vida, por amarme, por creer en mí y por su apoyo incondicional. Sé que en el cielo celebras conmigo mis triunfos, me acompañas, me ayudas y me animas en todos los momentos y etapas de mi vida. Todo lo que soy hoy en día, te lo debo a ti. Te bendigo y te amo.

A mi abuelita Blanca, por su apoyo durante todos estos años, su cariño, sabiduría, consejos, oraciones y quien ha sido la principal motivación que me permite seguir adelante. Es una bendición tenerte conmigo.

A mi segunda familia, mis padres Mariana Fuentes y Daniel Martínez por sus consejos, valores y por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada por su amor. Y a mi hermana Carolina del Sol, por sus consejos, cariño, confianza, paciencia, atenciones, su ejemplo de perseverancia y por creer siempre en mí. A todos ustedes familia, los amo "cuquitas".

A mis amigos y colegas Guisela Chaves, Bernal León, Silvia Berrocal a quienes agradezco de todo corazón por su apoyo brindado desde siempre, paciencia, comprensión, confianza, consejos y enseñanza.

A los profesores de la Escuela de Ciencias Agrarias y a todas las personas que de una u otra manera influyeron tanto en mi formación personal como profesional, porque todos con mucho cariño y dedicación han aportado con un granito de arena mi formación.

A Carlos Rodríguez el cual durante el proceso de mi investigación en todo momento me brindó su apoyo, consejos, disciplina y motivación. Gracias por su amistad, por creer y confiar en mí y enseñarme que nada es imposible cuando se quiere.

A mis amigos Grettel Gonzales, Erick Ballester, Michael Méndez, Yuli Gonzales, Francisco Morazán, Michelle Wolf, Wendy Fuentes, Leonor Corrales, Jacqueline Rojas, Steven Ramírez, Juan Pablo Castillo, Alex Bin, Adrián Benavides, Karol Solis, Jessicka Abarca, Gabriela Corrales, Gidgeth Guerrero, Glend Guerrero y Roger Cordero, por su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Los quiero mucho.

A todos mis compañeros y amigos presentes y pasados, quienes sin esperar nada a cambio compartieron su conocimiento, alegrías, tristezas y amistad conmigo. Y finalmente, a todas aquellas personas que durante el transcurso de mi vida estuvieron a mi lado para brindarme su apoyo, vieron en mí un gran futuro, me dedicaron su tiempo, su paciencia, pero sobre todo su confianza.

*Pon tu vida en las manos de Dios
y da lo mejor de ti, que Él hará el resto.
Pon todos tus planes en las manos del Señor,
y tus planes tendrán éxito.
Proverbios 16:1-3.
Dios lleva mi vida más allá de mis sueños.*

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por darme la vida y guiarme por buen camino, por brindarme el conocimiento, la oportunidad y la paciencia para poder realizar y finalizar esta práctica. Gracias por darme fuerzas para seguir adelante y por hacer todos mis sueños una realidad.

A mi amiga, colega y directora de tesis, Licda. Guisella Chaves por su esfuerzo, dedicación y atención, quien con sus conocimientos, experiencia, consejos, paciencia y motivación, me ayudó a culminar esta investigación. Gracias por creer en mí, por su amistad, por brindarme su ayuda cuando más la necesité, por ser una persona con la que puedo contar siempre, y por el cariño que me brinda y los ánimos que me da.

Al Dr. Bernal León por abrirme las puertas del Laboratorio de Bioseguridad y por brindarme siempre su disposición y atención para enseñarme, guiarme, escucharme y aconsejarme, pero sobre todo porque con paciencia me mostró que la biología molecular no es un trabajo, es una pasión.

A la profesora M.Sc. Silvia Berrocal por su ayuda, dedicación, interés, consejos, paciencia, y aportes en este proyecto de investigación.

A la Ing. Ana Cubero del SENASA por facilitarnos los panales y al Dr. Gabriel Zamora del CINAT por facilitarnos las cepas.

Al SENASA y al Dr. Ronald Mora Castillo, quien me permitió en primera instancia realizar mi TFG en la institución.

Al personal del Laboratorio de Bioseguridad: Idania Chacón, Erick Koying, Fabián Carvajal, Mónica Guzmán, Marielita Valverde, Diana Pérez, Rocío Gonzales, Olguita Aguilar, Juan Miguel Cordero, Lisbeth Ramírez, Susana Cruz, Esmeralda Vásquez, Don Marco y la Dra. Evans por hacerme sentir como parte del laboratorio, compartir su amistad conmigo, escuchar mis inquietudes, brindarme sus consejos, alegría, optimismo, apoyo profesional y humano.

A mis compañeros y amigos del SENASA, Ingrid Fajardo, Hilda Sánchez, Alex Bin, Marielitos Villalobos, Margarita Alfaro, Vane Soto, Karol Solis, mis queridas “cucas” Glend Guerrero y Roger Cordero, las chiquillas de micro: Gidgeth Guerrero, Gaby Corrales, Jessy Abarca, y Adrián Benavides, por su amistad sincera, cariño, apoyo, motivación, consejos y todas las alegrías compartidas. Los quiero muchísimo.

A todos mis amigos y familia, por estar siempre cuando los necesito, por alegrarme la vida. Especialmente a mi abuelita, mi primo Leonel, mis segundos padres Mariana y Daniel, mi hermana Carito, Wendy Fuentes, Carolina Fallas, Yuli Gonzales, Grettel Gonzales, Francisco Morazán, Michael Méndez, Erick Ballestero, Juan Pablo Castillo, Steven Ramírez, Fabiana Esquivel, Jacky Salazar, Jacky Cubillo, Leo Corrales. Gracias por estar a mi lado todos estos años.

Y por último, pero no menos importante a mis profesores de la Escuela de Ciencias Agrarias por brindarme su ayuda, aporte y consejo en la realización de esta investigación.

GRACIAS POR TODAS SUS BENDICIONES

RESUMEN

La Loque Europea (EFB) y la Loque Americana (AFB) son dos enfermedades infecto-contagiosas que afectan a la cría de las abejas. En este trabajo se desarrolló una estandarización y optimización de la PCR con el fin de detectar los principales agentes causales de la enfermedad de la EFB (*Melissococcus plutonius*) y de la AFB (*Paenibacillus larvae*). Para lo anterior, se utilizó como referencia el protocolo establecido por la OIE (2008), además de cepas de referencia utilizadas como control positivo y larvas con sintomatología sospechosa. Tanto las cepas control como las larvas fueron cultivadas en los medios MYPGP y J para verificar el crecimiento de ambas bacterias. Así mismo, para la estandarización se empleó el ADN previamente purificado el cual se evaluó con iniciadores específicos mediante la realización de diversas PCR. Se evidenció el crecimiento de la cepa control de *P. larvae* en el medio MYPGP y *M. plutonius* en el medio J, además se determinó que las características morfológicas y microscópicas coinciden con las ya descritas para ambos patógenos. En cuanto a la técnica de PCR, el protocolo de extracción de ADN utilizado fue idóneo ya que se obtuvo material genético de alta pureza, integridad y calidad. Con respecto a la estandarización y optimización, luego de realizar las modificaciones en el protocolo base, se determinó que la cantidad de ADN (2 µl y 3 µl), la temperatura de alineamiento (58°C), concentración de primers (0.5 µM) y el volumen de reacción (12.5 µl), difieren de resultados expuestos en otros estudios, esto posiblemente por las distintas condiciones en las que se realizó el ensayo. Se obtuvo un 100% de especificidad tanto en EFB como AFB. El ensayo para límite de detección estableció que la reacción estandarizada y optimizada permite detectar hasta $6,2145 \times 10^1$ UFC/mL de *P. larvae* y $5,72 \times 10^3$ UFC/mL de *M. plutonius*, asimismo, se evidenció que la PCR de *P. larvae* es más sensible. En cuanto al cultivo de larvas con sintomatología sospechosa, no se obtuvo ningún aislamiento de las bacterias en los medios utilizados, sin embargo, la PCR amplificó con éxito el fragmento 272 pb en tres de las muestras lo cual evidencia su alta confiabilidad y reproducibilidad. En cuanto a la secuenciación, se comprobó que el método de PCR detecta el gen 16S rRNA para ambas especies, lo cual garantiza su especificidad.

ABSTRACT

The European Foul Brood (EFB) and American Foul Brood (AFB) are two infectious diseases that affect the breeding of bees. In this project, a standardization and optimization of PCR was developed in order to detect the agents that cause EFB (*Melissococcus plutonius*) and AFB (*Paenibacillus larvae*). To do this, the protocol established by the OIE (2008) was used, along with reference strains as positive controls, and potentially infected larvae. Both control types; the reference strains and larvae were cultivated in MYPGP and J to verify the growth of both bacteria. Likewise, for the standardization, purified DNA was used, and evaluated with specific initiators for the realization of several PCR. The growth of *P. larvae* strain was evidenced in MYPGP and growth of *M. Plutonius* was evidenced in J medium. Additionally, the morphological and microscopic characteristics of both genera were determined for their comparison with those already described for both pathogens. Regarding the PCR technique, the DNA extraction protocol employed was ideal, given that the genetic material obtained was of utmost purity, integrity and quality. In terms of standardization and optimization, after modifying the base protocol, it was determined that the amount of DNA (2µl y 3 µl), the temperature of alignment (58°C), primers concentration (0.5 µM) and the reaction volume (12.5 µl), differed from the parameters established in other studies, most likely due to different conditions under which the essays were conducted. A hundred percent of specificity was obtained for identification of both, EFB and AFB. The test for the detection limit evidenced that the standardized and optimized reaction allowed detection of up to $6,2145 \times 10^1$ UFC/MI for *P. larvae* and $5,72 \times 10^3$ UFC/MI for *M. plutonius*, the method was more sensitive to detect *P. Larvae* as compared with *M. plutonius*. Regarding the culture of larvae potentially infected, any of the bacteria genera were isolated through the proposed method, however, the PCR successfully amplified the 272 pb fragment in three of the samples, which implied that the method was reliable and reproducible. In relation to sequencing, it was confirmed that the PCR method can detect the 16s rRNA gene for both species, which guaranteed its specificity.

ÍNDICE

Dedicatoria.....	I
Agradecimientos.....	III
Resumen.....	V
Abstract.....	VI
Índice.....	VII
Lista de cuadros.....	X
Lista de figuras.....	XI
Lista de Anexos.....	XIV
I. Introducción.....	1
II. Objetivos.....	3
2.1. Objetivo general.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
III. Revisión de literatura.....	4
3.1. Loque Europea.....	5
3.2. Loque Americana.....	6
3.3. Diagnóstico de EFB y AFB por medio de la PCR.....	9
IV. Materiales y métodos.....	11
4.1. Trabajo de laboratorio.....	11
4.2. Estandarización y optimización de la técnica molecular para la detección de <i>M. plutonius</i> y <i>P. larvae</i>.....	11
4.2.1. Control positivo.....	11
4.2.2. Cultivo de <i>M. plutonius</i> y <i>P. larvae</i>.....	11
4.3. Extracción del ADN.....	12
4.4. Técnica de la PCR.....	13
4.4.1. Mezcla de reacción y selección de iniciadores.....	13
4.4.2. Condiciones de la PCR.....	14
4.5. Visualización de los amplicones.....	15
4.6. Estandarización, validación y optimización de la PCR.....	15
4.7. Temperatura de alineamiento, concentración idónea de iniciadores y volumen de muestra.....	15
4.8. Límite de detección.....	16

4.8.1. Estándares de turbidez McFarland.....	16
4.8.2. Patrón de turbidez McFarland de 0.5-10.....	18
4.8.3. Límite de detección para <i>M. plutonius</i> y <i>P. larvae</i>	19
4.9. Especificidad de los primers.....	20
4.10. Reproducibilidad de las PCRs.....	20
4.11. Repetibilidad de las PCRs.....	20
4.12. Análisis en muestras de campo.....	21
4.13. Detección molecular de <i>P. larvae</i> y <i>M. plutonius</i> en muestras de campo.....	22
4.14. Extracción, purificación y secuenciación de los productos de la PCR.....	22
4.15. Documentación de los procedimientos técnicos.....	24
IV. Resultados.....	25
5.1. Establecimiento de controles de referencia positivos.....	25
5.2. Técnica de la PCR.....	28
5.3. Estandarización, optimización y validación de la PCR.....	28
5.3.1. Temperatura de alineamiento.....	28
5.3.2. Concentración de iniciadores.....	30
5.3.3. Volumen de muestra.....	31
5.3.4. Estándares de turbidez de McFarland.....	32
5.3.5. Límite de detección de <i>M. plutonius</i> y <i>P. larvae</i>	35
5.3.6. Especificidad de los primers.....	37
5.3.7. Reproducibilidad de las PCRs.....	42
5.3.8. Repetibilidad de las PCRs.....	44
5.4. Análisis en muestras de campo.....	47
5.4.1. Detección molecular de <i>P. larvae</i> y <i>M. plutonius</i> en muestras de campo.....	47
5.5. Secuenciación de los productos de PCR.....	49
5.6. Documentación de los procedimientos técnicos.....	50
VI. Discusión.....	51

VII. Conclusiones y recomendaciones.....	57
7.1. Conclusiones.....	57
7.2. Recomendaciones.....	58
VIII. Bibliografía.....	60
IX. Anexos.....	69

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Secuencia de nucleótidos de los iniciadores utilizados en la amplificación de AFB y EFB.....	14
Cuadro 2. Programa de ciclaje utilizado en la amplificación de <i>M. plutonius</i> y <i>P. larvae</i>	14
Cuadro 3. Composición de la turbidez estándar McFarland y las correspondientes densidades de bacterias (UFC/mL).....	17
Cuadro 4. Escala de turbidez de McFarland, densidad óptica del recuento de bacterias aproximadas para <i>E. coli</i> y densidad óptica medida para Loque Europea y Loque Americana.....	32
Cuadro 5. Diluciones decimales (1:10) y sensibilidad analítica estimada en la PCR de EFB.....	36
Cuadro 6. Diluciones decimales (1:10) y sensibilidad analítica estimada en la PCR de AFB.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aislado de <i>M. plutonius</i> , inoculado en medio J y utilizado como control positivo.....	26
Figura 2. Cocos gram positivos de <i>Melissococcus plutonius</i> : La causante de la Loque Europea.....	26
Figura 3. Aislado de <i>P. larvae</i> , inoculado en medio MYPGP y utilizado como control positivo.....	27
Figura 4. Bacilos gram positivos de <i>Paenibacillus larvae</i> : La causante de la Loque Americana.....	28
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Ensayo para determinar la mejor temperatura de alineamiento para la optimización de la PCR de EFB.....	29
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Ensayo para determinar la mejor temperatura de alineamiento para la optimización de la PCR de AFB.....	29
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Resultados de las diferentes concentraciones de iniciadores para la optimización de la PCR de EFB.....	30
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Resultados de las diferentes concentraciones de iniciadores para la optimización de la PCR de AFB.....	30
Figura 9. Gel de electroforesis al 2%. Resultado del ensayo de volumen de muestra para la optimización de la PCR en la detección de EFB.....	31
Figura 10. Gel de electroforesis al 1%. Resultado del ensayo de volumen de muestra para la optimización de la PCR en la detección de AFB.....	31
Figura 11. Curva de calibración que establece el número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) de EFB a partir de cada uno de los estándares preparados con la escala de McFarland y los valores de densidad óptica (DO). El valor de R indica la relación entre la densidad óptica medida y el valor de UFC/mL de los estándares de McFarland preparados.....	33
Figura 12. Curva de calibración que establece el número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) de AFB a partir de cada uno de los estándares preparados con la escala de McFarland y los valores de densidad óptica (DO). El valor de R indica la relación entre la densidad óptica medida y el valor de UFC/mL de los estándares de McFarland preparados.....	34

Figura 13. Resultados del ensayo de determinación del límite de detección para EFB, mediante la visualización de un gel de agarosa al 2%.....	35
Figura 14. Resultados del ensayo de determinación del límite de detección para AFB, mediante la visualización de un gel de agarosa al 1%.....	36
Figura 15. Determinación de la especificidad de los iniciadores utilizados para EFB mediante el empleo del ADN de nueve microorganismos. C + Control positivo; 1) <i>Micrococcus</i> ATCC 884; 2) <i>Listeria</i> ATCC 19114; 3) <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615; 4) <i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 700404; 5) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923; 6) <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305; 7) <i>Streptococcus ruisotozooepidemicus</i> ATCC 700 400; 8) <i>Arcanobacterium pyogenes</i> ATCC19411 y 9) <i>Corynebacterium renale</i> ATCC 19412.....	38
Figura 16. Determinación de la especificidad de los iniciadores utilizados para AFB mediante el empleo del ADN de nueve microorganismos. C + Control positivo; 1) <i>Micrococcus</i> ATCC 884; 2) <i>Listeria</i> ATCC 19114; 3) <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615; 4) <i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 700404; 5) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, 6- <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305, 7- <i>Streptococcus ruisotozooepidemicus</i> ATCC 700 400; 8) <i>Arcanobacterium pyogenes</i> ATCC19411 y 9) <i>Corynebacterium renale</i> ATCC 19412.....	39
Figura 17. Evaluación de la nueva temperatura de anillamiento desde 58°C hasta 60°C. Determinación de la especificidad de los iniciadores utilizados para AFB mediante el empleo del ADN de cuatro microorganismos 1) <i>Micrococcus</i> ATCC 884; 2) <i>Listeria</i> ATCC 19114; 3) <i>Streptococcus ruisotozooepidemicus</i> ATCC 700 400; 4) <i>Corynebacterium renale</i> ATCC 19412.....	40
Figura 18. Evaluación de la temperatura de anillamiento a 61°C. Determinación de la especificidad de los iniciadores utilizados para AFB mediante el empleo del ADN de cuatro microorganismos 1- <i>Micrococcus</i> ATCC 884, 2- <i>Listeria</i> ATCC 19114, 3- <i>Streptococcus ruisotozooepidemicus</i> ATCC700 400, 4- <i>Corynebacterium renale</i> ATCC 19412.....	41
Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Prueba de límite de detección a una temperatura de alineamiento de 58°C y 61°C mediante la PCR para la detección de AFB.....	41

Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Reproducibilidad de la PCR estandarizada y optimizada para la detección de EFB efectuada por un primer operario.....	42
Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Reproducibilidad de la PCR estandarizada y optimizada para la detección de EFB efectuada por un segundo operario.....	43
Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Reproducibilidad de la PCR estandarizada y optimizada para la detección de AFB efectuada por un primer operario.....	43
Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Reproducibilidad de la PCR estandarizada y optimizada para la detección de AFB efectuada por un segundo operario.....	44
Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Repetibilidad de la PCR estandarizada y optimizada para la detección de EFB realizada por un primer operario.....	45
Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Repetibilidad de la PCR estandarizada y optimizada para la detección de AFB realizada por un primer operario.....	45
Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Repetibilidad de la PCR estandarizada y optimizada para la detección de EFB realizada por un primer operario.....	46
Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Repetibilidad de la PCR estandarizada y optimizada para la detección de AFB realizada por un primer operario.....	46
Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. ADN de larvas con sintomatología sospechosa de EFB.....	48
Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Amplificación de la banda 272 pb procedentes de muestras de larvas con sintomatología sospechosa a EFB.....	48
Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. No se observa amplificación del ADN en las muestras de larvas con sintomatología de AFB.....	49

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Cantidades e ingredientes para la elaboración del medio de cultivo J para el cultivo de Loque Europea según la OIE, 2008.....	69
Anexo 2. Cantidades e ingredientes para la elaboración del medio de cultivo MYPGP para el cultivo de Loque Americana según la OIE, 2008.....	69
Anexo 3. Programa de ciclaje inicial utilizado en ensayos anteriores para la amplificación de <i>M. plutonius</i>	70
Anexo 4. Programa de ciclaje inicial utilizado en ensayos anteriores para la amplificación de <i>P. larvae</i>	70
Anexo 5. Preparación del medio de J para el aislamiento de <i>Melissococcus plutonius</i> y medio MYPGP para <i>Paenibacillus larvae</i>	71
Anexo 6. Aislamiento de <i>Melissococcus plutonius</i> y <i>Paenibacillus larvae</i>	72
Anexo 7. PCR para la detección de Loque Europea <i>Melissococcus plutonius</i>	73
Anexo 8. PCR para la detección de Loque Americana <i>Paenibacillus larvae</i>	74
Anexo 9. Estándar de turbidez McFarland y límite de detección.....	75
Anexo 10. Tarifas actualizadas con base en el decreto ejecutivo 39600-MAG 25/05/2016.....	76

I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial existen alrededor de 20.000 mil especies de abejas (Orden Hymenoptera, Superfamilia Apoidea); las colonias de los géneros de *Apis* (Familia Apidae, tribu Apini), varias especies de *Bombus* (Subfamilia Apinae, Tribu Bombini), numerosas *Meliponini* (Subfamilia Apinae, Tribu Meliponini) y *Osmia* spp (Familia Megachilidae), son considerados como insectos relevantes debido a su rol en la polinización de los ecosistemas naturales y cultivos agrícolas. Además, la crianza de abejas resulta de gran importancia en la producción de miel, cera, resinas y otros productos, que al ser comercializados se convierten en una alternativa de ingresos para el sector productivo (FAO, 2015).

Dentro de todas las especies de abejas existentes, *Apis mellifera* es la más reconocida debido a su importancia en la producción de miel y programas de polinización dirigida, razón por la cual ha sido objeto de diversos estudios mediante el uso de técnicas moleculares, genéticas, biológicas y de manejo con tecnología sofisticada para su conservación y explotación (Dressler, 1982; Forsgren, 2010).

Sin embargo, en los últimos años las poblaciones de *A. mellifera* y otras especies de abejas han disminuido drásticamente, por lo cual apicultores de todo el mundo han experimentado pérdidas de colmenas que pueden ir desde el 30% hasta el 90% anual. Este evento ha sido denominado síndrome de despoblamiento de las colmenas (Colony Collapse Disorder, CCD), que consiste en un conjunto de síntomas en el que no hay un solo agente que produce la despoblación, sino que son varios factores que al coincidir, producen dicho fenómeno (Boecking y Genersch, 2008).

Los factores que contribuyen a dicho síndrome tienen diversas causas como: 1) carencias alimentarias; 2) el uso de pesticidas principalmente neonicotinoides; 3) cosechas modificadas genéticamente; 4) el cambio climático y 5) enfermedades provocadas por depredadores, parásitos, bacterias, virus y hongos. Dentro del diverso grupo de agentes infecciosos *Melissococcus plutonius* y *Paenibacillus larvae*, son microorganismos de origen bacteriano que causan dos importantes enfermedades que afectan directamente a las abejas (Gilliam y Vandenberg, 1997; Kearns et al., 1998; Forsgren, 2010).

Melissococcus plutonius es el microorganismo causante de la Loque Europea o European Foulbrood of Honey bees (EFB) enfermedad de la cría de las abejas melíferas. La enfermedad es causada por un complejo número de bacterias en donde *M. plutonius* como primer agente causal, debilita a la larva y favorece el ataque de otros patógenos como *Bacillus aleve*, *Bacillus laterosporus*, *Achromobacter eurydice* y otras bacterias de asociación que normalmente son parte de la flora microbiana de una larva sana (Bailey, 1960).

Por otra parte, *Paenibacillus larvae* origina la Loque Americana o American Foulbrood of Honey bees (AFB) enfermedad que afecta a las larvas de *Apis mellifera* y otras subespecies de *Apis* en todo el mundo. Ésta bacteria puede producir millones de esporas resistentes en cada larva infectada, por lo tanto, las larvas contagiadas constituyen una amenaza para el mantenimiento de las poblaciones de abejas y además de ello se generan grandes pérdidas en la apicultura, ya que el tratamiento principal consiste en la eliminación de los panales infectados (Alippi, 1991; Alippi, 1992b; Heyndrickx *et al.*, 1996).

Usualmente, la identificación de estas bacterias se realiza mediante métodos clásicos como lo son el cultivo bacteriológico (Haynes, 1972), el análisis morfológico de las colonias (Michael, 1957) y las pruebas bioquímicas-fisiológicas (Haynes, 1972). No obstante, estos procedimientos por lo general consumen mucho tiempo y los resultados pueden variar dependiendo de la experiencia del investigador. Por lo tanto, debido a la importancia que tienen las abejas en la conservación del ambiente y en la apicultura, es necesario realizar un diagnóstico temprano y preciso de estas enfermedades.

El desarrollo y uso de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa o Polymerase Chain Reaction (PCR) ha sido una herramienta útil que ha permitido identificar con éxito diferentes organismos de interés, entre ellos *P. larvae* (Dobbelaere *et al.*, 2001; Lauro *et al.*, 2003) y *M. plutonius* (Djordjevic *et al.*, 1998) mediante un diagnóstico específico, rápido y sensible. El presente trabajo consiste en estandarizar y validar la técnica de la PCR para el diagnóstico temprano de Loque Americana y Loque Europea en el laboratorio de Bioseguridad (LSE) del Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (LANASEVE).

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Estandarizar y validar la técnica de la PCR para la detección del agente causal de la Loque Americana y la Loque Europea, con el fin de ser utilizadas en el diagnóstico rutinario del área de Diagnóstico de Enfermedades Apícolas.

2.2. Objetivos específicos

- Establecer las condiciones apropiadas para la estandarización y validación de las PCRs.
- Identificar por medio de la PCR las cepas aisladas de *M. plutonius* y *P. larvae*.
- Elaborar la documentación de los procedimientos técnicos para la detección de *M. plutonius* y *P. larvae*.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

Las abejas son insectos sociales que se caracterizan por vivir en colmenas para formar colonias, su principal papel en el ecosistema se relaciona directamente con la polinización, en donde las abejas participan directamente en la reproducción de muchas especies vegetales importantes para la agricultura y hábitats silvestres. En el mundo existen miles de especies de diferentes abejas, sin embargo en el género *Apis* (Familia Apidae), se encuentra una de las especies más importantes para la apicultura: la abeja melífera occidental, *Apis mellifera* (Lesser, 2001).

Habitualmente, cada colonia está compuesta por: 1) una reina, la cual es la única hembra fértil y es la que coloca los huevos; 2) unos pocos machos (zánganos) que tienen por única función aparearse con la reina; y 3) las obreras (hembras no reproductoras) quienes se encargan de la limpieza de las celdas, cuidan y alimentan a las larvas, construyen panales, producen la cera, mantienen la ventilación en los panales, y protegen a las abejas jóvenes antes de convertirse en recolectoras (Sota y Bacci, 2005; Gramacho y Gonçalves, 2009).

Por otro lado, el comportamiento de limpieza que exhiben las abejas melíferas es de gran importancia, ya que esta conducta elimina cualquier material extraño encontrado, lo cual evita o dificulta el desarrollo de enfermedades. Sin embargo, las abejas al igual que todos los animales incluido el hombre, son sensibles a las bacterias, hongos, virus, parásitos y depredadores. De manera que, su resistencia ante los factores adversos depende primordialmente del estado sanitario de la colmena y su nutrición (Lesser, 2001; Gramacho y Gonçalves, 2009).

Existe una variedad de enfermedades que atacan a las abejas melíferas, razón por la cual se han clasificado en dos importantes grupos donde cada patógeno tiene su propia estrategia de infección y desarrollo: enfermedades de las abejas adultas y enfermedades de la cría. Por lo tanto, es necesario que el apicultor reconozca las enfermedades de las abejas, especialmente las que atacan a la cría, ya que de no tratarse a tiempo una colonia enferma, se pueden producir grandes pérdidas de material vivo y económico. Dos de las enfermedades de la cría de mayor importancia son la Loque Europea (EFB) y la Loque Americana (AFB) (Bailey, 1960; OIE, 1983; OIE, 2011_{1b}; OIE, 2011_{2b}).

3.1. LOQUE EUROPEA

Melissococcus plutonius es el agente etiológico de la Loque Europea o European Foulbrood of Honey bees (EFB) una enfermedad que ataca larvas y pupas. Dicho agente infeccioso es un coco gram positivo, oval-lanceolado, de aproximadamente 0,5-1,0 μm de tamaño, anaeróbico, que puede presentarse individualmente o en grupos, dispuestos en pares o en cadenas cortas longitudinales. En medio de cultivo Bailey sus colonias son pequeñas, color blanco-opaco, no productoras de esporas y además puede aparecer en forma de bacilo ya que puede comportarse como un microorganismo pleomórfico *in vitro* (Bailey, 1960; Allen y Ball, 1993; OIE, 2008_{1a}; Arai *et al.*, 2012).

M. plutonius no fermenta glucosa, fructosa y manosa, pero puede ser variable para la maltosa y la salicina. No utiliza el citrato. Requiere de una alta proporción de Na^{+2} y K^{+2} , cistina o cisteína, fuentes de nitrógeno y CO_2 , extracto de levadura y ciertas peptonas. Crece en un rango de pH de 7-9, y con una temperatura óptima entre 35°C- 37°C. Tiene notable resistencia a condiciones disgenésicas: un año a la desecación, 20 horas en exposición directa a los rayos solares, 25 días a la putrefacción a temperatura ambiente, es resistente a la acidez de la jalea real (pH 3.8) y la destruyen de forma lenta los antisépticos (Bailey y Collins, 1982; Alegría-Martínez, 1986).

La enfermedad ocurre durante el período en el que las colonias crecen rápidamente. Generalmente la bacteria debilita a la larva y favorece el ataque de otros gérmenes. La mayoría de las larvas enfermas salen de su posición de enroscamiento en el fondo de sus celdas antes de morir. Muchas son detectadas por las abejas limpiadoras y al ser retiradas extienden los gérmenes por toda la colonia. Algunas larvas infectadas sobreviven, alcanzan la fase de pupa y se convierten en adulto. Estas larvas que sobreviven son capaces de defecar el microorganismo y sus heces infectadas contribuyen en la diseminación de la enfermedad (Bailey, 1960).

Asimismo, las larvas infectadas primero se vuelven flácidas y su color se torna amarillo claro, luego se vuelve marrón progresivamente, convirtiéndose al mismo tiempo en una masa semi-líquida. Después se secan y forman escamas de color marrón oscuro que pueden extraerse fácilmente de las celdas. Las colonias gravemente afectadas pueden tener un olor muy rancio o agrio, algunas veces ácido como el vinagre, aunque a menudo no hay olor. El

agente infeccioso puede propagarse también por medio de los equipos y los suministros utilizados por los apicultores (Bailey, 1960; Bailey y Ball, 1991, OIE, 2011_{1b}).

La identificación del patógeno en el laboratorio se basa en la observación al microscopio a partir de las preparaciones adecuadas de restos de larvas, el aislamiento e identificación del microorganismo y pruebas bioquímicas. Asimismo, la bacteria puede ser identificada y diferenciada por medio de simples pruebas de aglutinación en tubo. También puede utilizarse la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta permite el examen directo de las larvas, las abejas adultas y los productos de la abeja melífera (OIE, 2011_{1a}).

La Loque Europea se ha reportado en casi todos los países donde existe apicultura. En nuestro país, se realizó un estudio en el año 2007 en el cual se registró un aumento de esta enfermedad en la época lluviosa siendo octubre el mes que presentó la mayor prevalencia (70%), mientras que para setiembre y noviembre la prevalencia fue de un 20% y 40 % respectivamente, siendo Hojanca, Coto Brus, Acosta y San Ramón los cantones más afectados. Esta alta prevalencia de la enfermedad fue relacionada con la época del año y la escasa aplicación de medidas preventivas en los apiarios (Calderón y Ortíz, 2000; Calderón y Sánchez, 2011).

En cuanto al tratamiento se refiere, las tetraciclinas y la estreptomycinina son los dos antibióticos más adecuados para tratar la Loque Europea, no obstante al tratar de suprimir la enfermedad con este tipo de tratamiento, la salud del consumidor podría verse afectada debido a que pueden permanecer en los residuos de la miel (Bailey y Ball, 1991; OIE, 2011_{1b}).

3.2. LOQUE AMERICANA

La Loque Americana o American Foulbrood of Honey bees (AFB) es una enfermedad importante a nivel mundial por los apicultores y es producida por la bacteria *Paenibacillus larvae* (Alippi, 1991; Alippi, 1992b; Heyndrickx *et al.*, 1996). Dingmann y Stahly (1983) y Haynes (1972), describen a *P. larvae* como un bacilo gram positivo, anaerobio facultativo, de extremos redondeados, recto o a veces curvo, que varía mucho de tamaño (0,5 µm de ancho por 1,5–6 µm de largo) y se presenta solo, en cadenas o en filamentos; algunas cepas son móviles.

Asimismo, *P. larvae* es una bacteria que puede producir más de mil millones de esporas en cada larva infectada. Con frecuencia, los esporangios son escasos *in vitro*, y las esporas elipsoidales, centrales o subterminales, que pueden deformar el esporangio se encuentran libres. Las esporas son extremadamente estables al calor y resistentes a los agentes químicos. Sólo las esporas son capaces de inducir la enfermedad, lo cual generan grandes pérdidas en las colonias (Heyndrickx *et al.*, 1996; OIE, 2008_{1b}).

En el agar MYPGP las colonias de *P. larvae* son pequeñas, regulares, casi siempre rugosas, planas o elevadas, borde irregular y de color entre blanquecino y beige. Los componentes indispensables para su crecimiento son la tiamina o vitamina B1, el extracto de levadura y varias peptonas. Para lograr la esporulación se describe el agregado de glucosa y piruvato de sodio (Dingmann y Stahly, 1983; OIE, 2011_{2b}).

Dentro de su perfil bioquímico las bacterias son catalasa negativas o positivas débiles retardadas; hidrolizan la esculina pero no al almidón, fermentan la manosa, glicerol, ribosa y trehalosa, pero no a la sacarosa y xilosa. Además, pueden reducir el nitrito a nitrato e hidrolizar la caseína. Generalmente no utilizan el citrato, ni producen ácido sulfhídrico e indol. Son negativas a la reacción de Voges-Proskauer, ureasa, β -galactosidasa u orto nitro fenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), pero positivas a la gelatinasa. Algunas cepas pueden cambiar los rasgos bioquímicos (Lloyd, 1986; Alippi, 1992a; Heyndrickx *et al.*, 1996).

La infección puede transmitirse a las larvas a través de las abejas nodrizas o por las esporas que permanecen en la base de las celdas de las crías, pero también a través de herramientas, miel, polen contaminado o enjambres artificiales. Cuando la enfermedad se presenta, la principal característica son los panales con cría salteada y los opérculos de los panales se tornan húmedos, más oscuros, grasosos y hundidos. Algunos se ven perforados. Las larvas muertas adquieren una consistencia semifluida que se asemeja a la goma de mascar, es por esto que cuando se introduce un palillo dentro del opérculo éste arrastra un residuo castaño en forma de hebra viscosa, que se estira hasta 4 cm (Bailey y Ball, 1991; Alippi y Núñez, 1991).

La coloración de las larvas también cambia, primero desde el pardo amarillento, luego un pardo oscuro y por último un negro parduzco. Durante este cambio, la larva se achica, deforma y finalmente se adhiere hacia uno de los lados de la celda, hasta adquirir el aspecto de una costra o “escama” difícil de desprender. Por otro lado, aunque las larvas de las

abejas obreras, los zánganos y de las reinas son susceptibles a la infección, bajo condiciones naturales raramente se observan las larvas de las reinas y los zánganos infectadas (Bailey y Ball, 1991; Alippi y Núñez, 1991; Hansen y Brodsgaard, 1999).

Existen diferentes técnicas de laboratorio para el diagnóstico de la Loque Americana. Puede realizarse una identificación completa de la bacteria aislada mediante el establecimiento del perfil bioquímico (colonias sospechosas aisladas) o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Otro tipo de pruebas incluyen el uso de la tinción de Gram, prueba de la catalasa, prueba de la reducción de nitratos (facultativa), la técnica modificada de la gota pendiente (basada en los movimientos Brownianos de las esporas) y la prueba láctea de Holst (basada en un alto nivel de actividad proteolítica durante la esporulación) (OIE, 2008_{1b}; OIE, 2011_{1b}).

El primer registro de Loque Americana fue en Argentina en 1989, donde se aisló el agente de los panales de cría. En la actualidad, la enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo sobre todo en las regiones templadas o subtropicales. Puede aparecer en cualquier época del año, pero es más frecuente durante las lluvias (Alippi y Núñez, 1991; Machová, 1993; Alippi, 1995; Alippi, 1996a).

En nuestro país, los reportes sobre la prevalencia y distribución de estas enfermedades han sido escasos. El primer reporte oficial de AFB se realizó en 1985 (Blanco, 1990). Posteriormente, en mayo de 1999 se determinó la presencia de la enfermedad en muestras de panal provenientes de San Ignacio de Acosta. Así mismo, para Diciembre del 2006 en el cantón de Mora, se confirmó la presencia de *P. larvae* en diversas colmenas. Actualmente no se conoce información sobre casos sospechosos de AFB ni EFB (Calderón y Sánchez, 2011).

El control de AFB se basa en la utilización de antibióticos que impiden temporalmente su multiplicación. Sin embargo, esta medida puede enmascarar el cuadro clínico, y además puede acarrear riesgos adicionales como la contaminación de la miel con residuos del producto. De manera que, debido a su alta patogenicidad y por las características propias de la enfermedad, una vez que se detecta en una región, si la enfermedad está muy avanzada y las abejas se encuentran muy debilitadas, el mejor modo de erradicar la enfermedad es destruyendo las colonias enfermas y todo el material infectado (Ritter, 2003; OIE, 2008_{1b}).

3.3. DIAGNÓSTICO DE EFB Y AFB POR MEDIO DE LA PCR

El diagnóstico de laboratorio para la detección de *P. larvae* y *M. plutonius* agentes causales de la Loque Americana y la Loque Europea, se basa en un principio en la aplicación de técnicas clásicas y sencillas para su confirmación, algunas de ellas requieren el aislamiento del agente patógeno por medio de sub-cultivos, la observación de la morfología microscópica a través de una tinción de gram, la identificación por medio de su perfil bioquímico, observación de esporas, métodos inmunológicos, pruebas confirmatorias sencillas (OIE, 2008_{1a}; 2008_{1b}).

Sin embargo, debido a que este tipo de técnicas requiere de experiencia y destreza, usualmente solo las personas experimentadas pueden basar el diagnóstico en la utilización exclusiva de este tipo de técnicas clásicas de confirmación de laboratorio. Asimismo, aunque este tipo de análisis tiene importancia en la identificación de los agentes causales de la Loque Europea y la Loque Americana, estos métodos son poco sensibles, inespecíficos y tediosos (Forsgren *et al.*, 2013).

Debido a estas limitaciones se han desarrollado técnicas que han compensado las deficiencias de las técnicas de detección tradicional, con la finalidad de identificar de forma rápida y eficiente *P. larvae* y *M. plutonius*, especialmente porque al ser ambos patógenos una bacteria fastidiosa, el estudio de rutina es de carácter difícil debido a su lento crecimiento, morfología (pleomórfica) requerimientos nutricionales y de crecimiento (OIE, 2011_{1a}; 2011_{1b}).

En referencia a lo anterior, los métodos de biología molecular han sido aplicados cada vez más en el campo de la apicultura, con la finalidad de identificar los principales agentes patógenos que causan las diferentes enfermedades infecciosas. Este tipo de técnicas de detección se basan principalmente en la utilización de ácidos nucleicos para fines diagnósticos, monitoreo o estimación de riesgos y pronósticos (Corvalán *et al.*, 2003).

Inicialmente, el diagnóstico molecular se desarrolló con la introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la cual se obtiene un gran número de copias de un fragmento específico de ADN a partir de un ácido nucleico diana, en este caso, del genoma del agente infeccioso. La región amplificada se caracteriza por dos (o más) oligonucleótidos cortos y dos primers o iniciadores que son complementarios con las

regiones de ADN que flanquean la secuencia diana. La secuencia de ADN entre los dos primers se obtiene con el uso de un ADN polimerasa (Burkhardt, 2000; Rodríguez y Barrera, 2004; OIE, 2006).

En el diagnóstico de *P. larvae* y *M. plutonius* la PCR es una técnica de huella genética que permite la identificación de ambos patógenos a partir de aislados bacterianos sospechosos, en larvas clínica y sub-clínicamente enfermas, abejas adultas, polen, esporas y en los productos de las abejas melíferas (OIE, 2008_{1a}; 2008_{1b}). En el caso de *P. larvae*, se describen dos protocolos para la PCR.

El primero fue descrito por Dobbelaere *et al.* (2001) en donde la amplificación se realiza con el uso del iniciador directo AFB-F y el iniciador inverso AFB-R. Esta prueba se utiliza en una confirmación rápida de AFB clínica y para identificar las colonias bacterianas después de una fase de cultivo. El segundo protocolo descrito por Lauro *et al.* (2003), permite el examen directo de las soluciones de esporas. La amplificación se realiza con el uso de los iniciadores PleF y PleR y PliF y PliR

En cuanto a la detección de *M. plutonius* se dispone también de dos protocolos para la PCR. El primero fue elaborado por Govan *et al.* (1998) y puede aplicarse a las colonias bacterianas sospechosas transferidas a medio líquido y que hayan crecido en él. La amplificación se realiza con el uso del cebador directo (EFB-F) e inverso (EFB-R). El segundo fue desarrollado por Djordjevic *et al.* (1998) y a partir de entonces se ha mejorado la sensibilidad de la detección del patógeno en la miel, polen, las larvas completas y las abejas adultas (McKee *et al.*, 2003). La amplificación se realiza con el uso de cebadores los cebadores específicos MP1, MP2 y MP3 (OIE, 2006)

Aunque inicialmente la utilización de los ensayos de la PCR fueron considerados como un método caro y complejo, en la actualidad son relativamente baratos, seguros y fáciles de utilizar en los laboratorios de diagnóstico. Entre las ventajas que presenta esta técnica se destaca su sensibilidad, ya que produce varios millones de copias del patógeno en estudio, su especificidad, debido a que los primers están diseñados para detectar secuencias nucleotídicas específicas en los genomas de los agentes infecciosos, y su facilidad, a la hora de procesar gran cantidad de muestras y brindar un diagnóstico en un corto período de tiempo (Louie *et al.*, 2000; Belak y Thoren, 2001).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Trabajo de laboratorio

La estandarización y optimización de la técnica de detección molecular por medio de la PCR se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioseguridad del Servicio Nacional en Salud Animal (SENASA) en Lagunilla, Barreal de Heredia. Este trabajo tuvo una duración de doce meses, inició en septiembre del 2014 y finalizó en septiembre del 2015.

4.2. Estandarización y optimización de la técnica molecular para la detección de *M. plutonius* y *P. larvae*

4.2.1. Control positivo

Como material de referencia para la optimización de la PCR y como control positivo en el análisis de las muestras, se utilizó ADN purificado de un aislado de *P. larvae* y *M. plutonius*. Las cepas se encontraban previamente conservadas en un vial de 5 mL a -80°C y fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales (CINAT) de la Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

4.2.2. Cultivo de *M. plutonius* y *P. larvae*

Para el cultivo puro de *M. plutonius* y *P. larvae* se tomaron 15 µL de los viales conservados y se aislaron en placas con medio MYPGP que favorece el crecimiento de *P. larvae* y en placas con medio J para el cultivo de *M. plutonius*. Los ingredientes utilizados para la elaboración de los medios se observan en el Anexo 1 y 2.

Una vez inoculadas las placas con las respectivas bacterias se incubaron en una atmósfera de aproximadamente 5-10% de CO₂ a 37°C (±2°C) por 96 h. Para crear este ambiente se utilizaron frascos herméticos de 2.5 L Oxoid™ Anaero-Jar™ Base (Thermo Fisher Scientific) y además se adicionó una bolsa de CO₂ Gen (Oxoid) a todas aquellas que contenían placas con medio MYPGP, mientras que a las placas con medio J se les agregó una bolsa de Anaero-Gen (Oxoid) (BID/OIRSA, 1990). Después de dicha incubación, se

evidenció el crecimiento de las colonias en las placas, luego se colocó una colonia sobre un portaobjetos por separado y se hizo una tinción de Gram.

Con las pruebas anteriores se realizó una descripción morfológica y microscópica de las colonias, para ello se utilizó el Manual de Enfermedades Terrestres de la OIE (2008_{1a-2a}). Por último, se tomaron colonias de las placas y se almacenaron nuevamente a -80°C en caldo infusión cerebro corazón (ICC). Con el material anterior se volvieron a hacer sub cultivos, y a partir de colonias nuevas se realizaron las extracciones de ADN.

4.3. Extracción del ADN

Para extraer el ácido nucleico de las bacterias utilizadas como control positivo se utilizó el Kit comercial DNA Mini Kit QIAamp para bacterias Gram positivas. El procedimiento se realizó siguiendo las siguientes instrucciones del fabricante:

1. Para extraer el ADN de los medios de cultivo se tomaron cinco asadas de las colonias y se re suspendieron en un tubo de 1.5 mL con 200 µL de agua libre de nucleasas.
2. Se utilizó agua libre de nucleasas como control negativo de extracción.
3. Seguidamente las muestras se centrifugaron durante 10 min a 5.000 g (7.500 rpm).
4. Después de centrifugar se descartó el sobrenadante y se utilizó el pelet.
5. Se preparó una solución enzimática con lisozima (20 mg/ml lisozima, 20 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 2 Mm de EDTA; 1,2% de Triton).
6. Luego al pelet se le adicionó 180 µL de la solución enzimática y se agitó con un vortex. Las muestras se incubaron durante 30 min a 37°C.
7. Después de la incubación se añadió a cada tubo 20 µL de proteínasa K y 200 µL del búfer AL. Las muestras se agitaron e inmediatamente se les realizó dos incubaciones, la primera a 56 °C durante 30 min y la segunda a 95 °C durante 15 min.
8. Luego se centrifugaron las muestras durante 30 s. Posteriormente, se les añadió 200 µL de etanol (96-100%), se agitaron por 5 s y nuevamente se centrifugaron de forma breve para remover las gotas del interior de la tapa.

9. Inmediatamente se utilizaron columnas con filtro QIAamp Mini spin de 2 mL y tubos colectores. A cada columna se le adicionó la mezcla del paso anterior y luego se centrifugaron en una centrífuga marca Eppendorf (Hamburgo-Alemania) a 6000 g (8000 rpm) durante 1 min.
10. Seguidamente se colocaron las columnas en un tubo colector limpio, se desechó el tubo colector anterior, y se añadió 500 µL del Buffer AW1. Las muestras se volvieron a centrifugar a 6000 g (8000 rpm) durante 1 min.
11. Se volvió a transferir las columnas a un nuevo tubo colector y se añadió 500 µL del buffer AW2. Las muestras se centrifugaron nuevamente a 20.000 xg (14.000 rpm) durante 3 min.
12. Luego para eliminar los residuos del buffer AW2 se colocaron las columnas en un nuevo tubo colector y se centrifugaron durante 1 min a máxima velocidad.
13. Después se colocaron las columnas en un tubo para microcentrifuga de 1,5 mL, se añadió 200 µL del Buffer de elución AE y se dejaron a temperatura ambiente durante 1 min y se centrifugaron las columnas a 6.000 g (8.000 rpm) durante 1 min.
14. Finalmente, se retiraron las columnas y el ADN extraído en el filtrado fue almacenado en un congelador a -20 °C.

4.4. Técnica de la PCR

4.4.1. Mezcla de reacción y selección de iniciadores

Con el fin de estandarizar una técnica específica para *P. larvae* y *M. plutonius* se llevaron a cabo varias PCR. Para las reacciones de amplificación se utilizaron los reactivos: Máxima Hot Start Green Master Mix (2X) (Thermo Scientific, USA), agua libre de DNAsas-RNAasas, muestra de ADN y cebadores forward (FWD) y reverse (REV). Además, se preparó para cada reacción un control negativo (C- ó CN) y un control positivo (C+ ó CP). La secuencia de los iniciadores utilizados en la amplificación de un fragmento de la región 16 rRNA corresponde a: MP1 y MP3 para *M. plutonius* (Djordjevic *et al.*, 1998; McKee *et al.*, 2003) y AFB-F y AFB-R para *P. larvae* (Dobbelaere *et al.*, 2001) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Secuencia de nucleótidos de los iniciadores utilizados en la amplificación de AFB y EFB.

Referencia	Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño en pares de bases (pb)	Especificidad
Djordjevic <i>et al.</i> , 1998.	MP1 MP3	5'-CTTTGAACGCCTTAGAGA-3' 5'-TTAACCTCGCGGTCT TGCGTCTCTC- 3'	276	<i>M. plutonius</i>
Dobbelare <i>et al.</i> , 2001.	AFB-F AFB-R	5'-CTTGTGTTTCTTTTCG GGAGACGCC- 3' 5'-TCTTAGAGTGCCACCTC TGCG-3'	1106	<i>P. larvae</i>

4.4.2. Condiciones de la PCR

Para amplificar el ADN de las bacterias se utilizó un termociclador modelo Vereti® thermal cyler (Applied Biosystem, USA). Para establecer las condiciones y ciclos de amplificación se utilizó inicialmente el programa de ciclaje establecido por la OIE (2008^{1a-1b}) para ambos patógenos (Anexo 3 y 4). No obstante, en ensayos posteriores se modificó el perfil térmico y el programa de ciclaje para ambas enfermedades (Cuadro 2).

Cuadro 2. Programa de ciclaje utilizado en la amplificación de *M. plutonius* y *P. larvae*.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	10 min	1
Desnaturalización	95°C	15 seg	
Alineamiento	58°C	30 seg	30
Extensión	72°C	45 min	
Extensión final	72°C	5 min	1
Almacenamiento	4°C	∞

4.5. Visualización de los amplicones

Los resultados de la amplificación se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Para verificar la calidad de los productos de la PCR de EFB, se preparó un gel de agarosa al 2% el cual fue teñido con 3 μ L de gel red (Biotium Inc, USA). Para la corrida se utilizó Buffer TBE (Tris-Borato-EDTA)1X, ph 8.3, se adicionó 2 μ L de la muestra y 0.6 μ L del marcador molecular de 50 pb (M50 ó MW50). El tamaño esperado del fragmento fue de 272 pb.

Los productos de la PCR de AFB se corrieron en un gel de agarosa al 1% teñido con 3 μ L de gel red. Para la corrida se utilizó el mismo Buffer empleado para EFB con la misma cantidad de muestra y un marcador molecular de 100 pb (M100 ó MW100). El tamaño esperado del fragmento fue de 1106 pb. Cada corrida se realizó con una corriente eléctrica de 60 amperios durante 60 min, después de la corrida, los geles se visualizaron en un transiluminador de luz UV marca Uvitec HD2-20M (Reino Unido) por medio del cual se tomó un registro fotográfico de cada gel procesado.

4.6. Estandarización, validación y optimización de la PCR

Con el fin de estandarizar las PCRs se realizaron diversos ensayos de amplificación con un volumen final de reacción de 12.5 μ L. Estos ensayos correspondieron a: temperatura de alineamiento, volumen de primers o iniciadores, volumen de muestra y límite de detección.

4.7. Temperatura de alineamiento, concentración idónea de iniciadores y volumen de muestra

Se realizó un ensayo de gradiente con el fin de determinar la mejor temperatura de alineamiento para los dos agentes bacterianos en un rango de 56°C a 60°C y con intervalos de 1°C. Cada reacción se preparó por duplicado y se utilizaron los controles previamente preparados (fuerte y débil).

Una vez determinada la mejor temperatura de alineamiento, se estableció la concentración idónea de iniciadores, para lo anterior se realizó una PCR por duplicado para ambas enfermedades donde se utilizó una concentración de iniciadores de 0.1 μM , 0.3 μM , 0.5 μM , 0.7 μM y 0.9 μM además de los controles fuerte, débil y negativo.

Por último, se realizó un ensayo para establecer el volumen de muestra para el cual se utilizó una cantidad de 2 μL , 3 μL y 4 μL junto con los controles (fuerte y débil). Cabe mencionar que en cada uno de los ensayos se incluyó la dilución menor a la observada, con la finalidad de establecer si había mejora en la sensibilidad de la PCR.

4.8. Límite de detección

Para finalizar con la optimización del método, se realizó un ensayo en el cual se determinó el límite de detección en el que se observa amplificación. Lo anterior se estableció mediante los estándares de turbidez de McFarland. El procedimiento se describe a continuación:

4.8.1. Estándares de turbidez de McFarland

Para estimar el número de bacterias por mililitro (mL) o la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) de EFB y AFB se procedió a preparar los estándares de turbidez de McFarland en una escala de 0.5 a 10. Los estándares de McFarland son utilizados como referencia para ajustar la turbidez de suspensiones bacterianas.

Para obtener la turbidez y las UFC/mL se utilizó como referencia el cálculo que corresponde a suspensiones bacterianas realizadas en *Escherichia coli* (valor teórico) (Cuadro 3), mientras que la turbidez se midió con el uso de un espectrofotómetro Biophemeter (eppendorf) a 625 nm (Chapín y Lauderdale, 2003).

Cuadro 3. Composición de la turbidez estándar McFarland y las correspondientes densidades de bacterias (UFC/mL).

Vol (mL)			
Número Estándar	BaCl₂*2H₂O (1.175%)	H₂SO₄ (1%)	Número de bacterias/mL UFC (10⁸) que representa*
0.5	0.5	99.5	1.5x10 ⁸
1	1.0	99.0	3x10 ⁸
2	2.0	98.0	6x10 ⁸
3	3.0	97.0	9x10 ⁸
4	4.0	96.0	12x10 ⁸
5	5.0	95.0	15x10 ⁸
6	6.0	94.0	18x10 ⁸
7	7.0	93.0	21x10 ⁸
8	8.0	92.0	24x10 ⁸
9	9.0	91.0	27x10 ⁸
10	10.0	90.0	30x10 ⁸

*El número de bacterias/mL o UFC (10⁸) que representa el cuadro se basa en un valor aproximado para *E. coli*.

La preparación de la escala se realizó en base a los siguientes procedimientos:

Preparación de reactivos

Ácido Sulfúrico 1 %

1. En un balón aforado de 100 mL se adicionó 90 mL de agua destilada.
2. Seguidamente con un pipeta volumétrica se añadió 1.0 mL de H₂SO₄ al balón o matraz y luego se aforó con 9 mL de agua destilada.
3. Por último se almacenó hasta por un año la mezcla en una botella con tapón de rosca a 25°C.

Cloruro de Bario 1,175%

1. Se pesaron 1.175 gr de $\text{BaCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ y se colocó en un balón aforado de 100 mL.
2. Luego se le adicionó 50 mL de agua desionizada y se mezcló bien para disolver.
3. Seguidamente se llevó la mezcla a 100 mL con agua desionizada.
4. Al finalizar se almacenó hasta por un año en una botella de vidrio con tapón de rosca a 25°C.

4.8.2. Patrón de turbidez McFarland de 0.5-10

1. En un matraz aforado de 100 mL se agregó 85 mL de ácido sulfúrico (1%).
2. Posteriormente con una pipeta volumétrica se agregó 0.5 mL de cloruro de bario (1.175%), el cual se adicionó gota a gota al ácido sulfúrico (1%). La solución se mantuvo en agitación constante y se ajustó el volumen a 100 mL con H_2SO_4 (1%).
3. Luego se prepararon todos los estándares restantes. Todas las soluciones se colocaron en un tubo cónico de 15 mL.
4. Una vez elaborados los estándares de la escala y con el fin de estimar el número de bacterias/mL o UFC, se procedió a medir la densidad óptica (DO) o la absorbancia de cada estándar en un espectrofotómetro Biophemeter (Eppendorf) a una longitud de onda de 625 nm. Los resultados de turbidez fueron anotados en una tabla de Excel.
5. Se etiquetaron todos los estándares y se aseguró que la identificación no interfiriera con las lecturas en el espectrofotómetro.
6. Además, los tubos se cubrieron con papel aluminio y se dibujó una línea para marcar el menisco en cada uno de ellos. Esta marca se utilizó como guía para evaluar la evaporación del líquido.
7. Finalmente, los tubos se sellaron con parafina y se guardaron en oscuridad a temperatura ambiente hasta por tres meses.
8. Con los valores teóricos y la densidad óptica obtenidas se creó una recta patrón en el programa Microsoft Excel 2010, con el fin de estimar la concentración de bacterias/ mL en UFC/mL.

4.8.3. Límite de detección para *M. plutonius* y *P. larvae*

Una vez preparados los estándares de turbidez de McFarland con una concentración de UFC/mL conocida (Cuadro 3), se determinaron los valores de absorción para cada uno de ellos y luego se preparó una suspensión bacteriana. Posteriormente, se midió la densidad óptica de dicha suspensión y con ello se estableció la concentración de bacterias expresadas en UFC/mL. El procedimiento se describe a continuación:

1. Se tomaron colonias de las placas de ambas bacterias y a partir de un cultivo puro fresco en fase exponencial se realizaron varias azadas.
2. Seguidamente se preparó una suspensión bacteriana en 10 mL con solución salina (0.85%) y se agitó.
3. Luego se comparó la turbidez de la suspensión bacteriana con los patrones de McFarland preparados.
4. La turbidez se comprobó al sostener los tubos contra un fondo blanco con líneas negras horizontales de contraste. La distorsión de las líneas negras indicó una turbidez similar en los tubos.
5. Si la suspensión se encontraba demasiado turbia se añadió el diluyente (solución salina 0.85%) y si la suspensión no estaba lo suficientemente turbia se agregaron más colonias con un aza.
6. Posteriormente se midió la absorbancia o densidad óptica (DO) de la suspensión bacteriana en un espectrofotómetro Biophemeter (eppendorf) a 625 nm.
7. Con el valor de absorbancia obtenido y con la recta patrón creada se estableció la concentración de UFC/mL de la suspensión con el programa Microsoft Excel 2010.
8. Una vez calculada la cantidad de UFC/mL en la muestra se prepararon diluciones decimales hasta 10^{-10} en solución salina estéril. Seguidamente, a cada dilución se le realizó una extracción de ADN.
9. Luego se realizó una PCR por duplicado para cada dilución y con ello se estableció el límite de detección para EFB y AFB.
10. Por último, de los productos de la PCR se seleccionó la dilución que presentó la banda de mayor intensidad (fuerte) y la banda de menor intensidad (débil) la cual

representa la dilución mínima en la que se observó amplificación, con el propósito de ser usados como controles en la validación de las PCRs.

4.9. Especificidad de los primers

Para evaluar la especificidad de los iniciadores MP1 -MP3 y AFB-F/AFB-R, se realizó una PCR con 9 diferentes cepas bacterianas gram positivas: *Micrococcus* (ATCC 884), *Listeria* (ATCC 19114), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Staphylococcus xylosus* (ATCC 700404), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 6305), *Streptococcus ruisotozooepidemicus* (ATCC 700 400), *Arcanobacterium pyogenes* (ATCC19411), *Corynebacterium renale* (ATCC 19412).

Las cepas fueron suministradas por el Laboratorio de Bacteriología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la UNA. A cada microorganismo se le realizó la extracción de ADN y una PCR con las condiciones de estandarización previamente utilizadas. Del mismo modo, se preparó un control positivo y un control negativo con agua libre de nucleasas. El resultado se visualizó en una corrida electroforética en gel de agarosa.

4.10. Reproducibilidad de las PCRs

Para la reproducibilidad se prepararon diluciones decimales de una misma muestra positiva y se seleccionó entre ellas la dilución donde se observó menor y mayor intensidad en las bandas (débil y fuerte). Cada dilución se preparó por duplicado. Seguidamente, con las diluciones preparadas y las condiciones de estandarización pre establecidas, se realizó una PCR para ambas enfermedades por dos diferentes operarios. Posteriormente, los resultados se verificaron en el gel de agarosa.

4.11. Repetibilidad de las PCRs

La repetibilidad se comprobó mediante la elaboración de una PCR realizada en diferentes días y por un mismo operador bajo las mismas condiciones de manipulación, instrumentos y reactivos, procedimientos y condiciones de medición utilizadas en la reproducibilidad.

4.12. Análisis en muestras de campo

Para determinar la presencia de EFB y AFB en muestras de campo se realizó un análisis de larvas de abejas con sintomatología obtenidas de panales de diferentes apiarios. Las muestras fueron recolectadas entre los meses de agosto- setiembre y enviadas por el personal del laboratorio del Programa Apícola del SENASA. Una vez ingresados los panales dentro del laboratorio, con el uso de unas pinzas de punta fina estériles se realizó la extracción de 13 larvas, y en condiciones asépticas se depositaron en un tubo de 1.5 mL. Inmediatamente a los tubos se les agregó 200 μ L de agua estéril y con la ayuda de un pistilo se realizó un macerado.

Después del macerado se realizaron siete siembras en los medios de cultivo, para lo anterior se colocó en una pipeta con punta estéril y filtro, 15 μ L de la muestra en el medio MYPGP y 15 μ L en el medio J. Las cajas de petri fueron incubadas en los frascos para anaerobiosis herméticamente sellados y con las mismas condiciones de incubación que se utilizaron para el cultivo de los controles positivos. Asimismo, se preparó un cultivo con un control positivo y otro negativo.

Posterior a la incubación, se evidenció el crecimiento de colonias en las placas las cuales a su vez se compararon con los controles. Seguidamente, de las placas en donde se observó crecimiento de colonias, se tomaron dos o tres de las mismas (con morfología similar), se les realizó una tinción de Gram y además una descripción morfológica con base al Manual de Enfermedades Terrestres de la OIE (2008).

Por último, las muestras de larvas procesadas se conservaron en un congelador a -80°C . Además, todas las colonias que consideraron como sospechosas en el medio de cultivo, se sembraron primero en caldo cerebro infusión corazón (ICC) y luego se depositaron en un tubo estéril de 1.5 mL para ser conservadas a la misma temperatura.

4.13. Detección molecular de *P. larvae* y *M. plutonius* en muestras de campo

Para comprobar la funcionalidad de la técnica y determinar la presencia de AFB y EFB, se realizó una extracción de ADN y una PCR a las muestras de larvas procesadas anteriormente con el uso de los procedimientos estandarizados. De la misma manera, a todas las placas donde se evidenció el crecimiento de colonias sospechosas se les realizó una extracción de ADN y una PCR. A todas las muestras se les realizó una dilución 10^{-1} y en cada PCR se utilizó un control positivo, un control negativo y un control de extracción.

4.14. Extracción, purificación y secuenciación de los productos de la PCR

Para comprobar que el ADN de los productos amplificados corresponde a las especies de referencia *P. larvae* y *M. plutonius*, se purificaron las bandas 272 pb y 1106 pb mediante el kit comercial QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Así mismo, se secuenciaron ambas cadenas de los amplicones generados con el uso de los mismos iniciadores para cada una de las cepas estudiadas.

La secuenciación se realizó con el analizador genético ABI 3130 (Life Technologies, USA). El análisis de las secuencias se llevó a cabo mediante el programa Bio Edit (Biological Sequence Alignment Editor) y los resultados de secuenciación se compararon con las secuencias depositadas en Gen Bank mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Los procedimientos se describen a continuación:

1. Con el uso de un escalpelo limpio y filoso se cortó el segmento de gel de agarosa con el fragmento de ADN.
2. Las bandas cortadas se depositaron en un tubo de 1.5 mL y se pesaron. Luego se agregó a los tubos 300 μ L del buffer QG.
3. Seguidamente se incubaron los viales a 50°C durante 10 min o hasta que el segmento de gel se disolviera por completo o virara a una coloración amarilla.
4. Durante la incubación se agitaron los viales cada 2-3 min con el fin de disolver el gel rápidamente.

5. Después de la incubación se añadió 100 µL de isopropanol y se mezcló el contenido en un vortex. Posteriormente, el material se colocó en una columna y se centrifugó en una centrífuga por un 1 min a 17.900 g (13 000 rpm)
6. Finalizado el tiempo de centrifugación, se descartó el líquido que quedó en el tubo colector y en una nueva columna se adicionó 500 µL del reactivo QG. Luego la nueva columna se volvió a centrifugar a la misma velocidad y tiempo.
7. Seguidamente se volvió a descartar el líquido filtrado y luego se realizó un lavado. Para lo anterior, se adicionó 750 µL del buffer PE, se centrifugó el material por 1 min a 17.900 g (13 000 rpm).
8. Luego se descartó el líquido sobrenadante y se colocó de nuevo la columna en el mismo tubo colector.
9. Con el fin de descartar todo el contenido del Buffer PE de la columna, se realizaron dos centrifugaciones más con el mismo tiempo y con la misma velocidad programada en el paso 6.
10. En seguida se situó la columna en un nuevo tubo de 1,5 mL y para eluir el ADN se añadió 50 µL del buffer EB (10 Mm Tris-CL, pH 8.5) en el centro de la membrana de la columna. La mezcla se dejó reposar por 5 min a temperatura de ambiente y luego se centrifugó a 13. 000 g (rpm) por 1 min.
11. Por último, se tomó el líquido recolectado en el tubo y se volvió a depositar nuevamente en el centro de la membrana de la columna, se dejó reposar de nuevo por 5 min y luego se centrifugó a la misma velocidad y tiempo programado en el paso anterior.
12. Una vez realizada la extracción se realizó una PCR de secuenciación con el uso del Kit Big Dye® terminator v 3.1 sequencing standart kit y los siguientes reactivos: 4,92 µL de agua, 2 µL de solución Ready Reaction Premix, 3 µL de solución tampón Sequencing Buffer, 0,008 µL de primers reverse y foward en reacciones separadas y 10 µL de la muestra.
13. El programa de ciclaje se programó con un ciclo a 96°C durante 2 min y luego 30 ciclos que corresponden a los siguientes tiempos: 10 seg a 96°C, 5 seg a 50°C y 4 min a 60°C. Al terminar la temperatura se mantuvo a 4°C ∞.

14. Posterior a la PCR de secuenciación se realizó una reacción de purificación mediante el uso del Kit Big Dye® x Terminator™ purification (Life Technologies), para ello se adicionó a la muestra 5 µL de resina y 22,5 del reactivo SAM y 5 µL de la muestra. Todo lo anterior se agitó durante 30 min en vortex a velocidad media.
15. Al finalizar se tomaron 10 µL del sobrenadante de la muestra y se colocaron en la placa de corrida la cual se centrifugó por 30 s.
16. Concluido el paso anterior se programó el secuenciador con su respectiva información y se inició la secuenciación.

4.15. Documentación de los procedimientos técnicos

Para desarrollar ambas PCRs como una técnica rutinaria de diagnóstico de las enfermedades se elaboraron y documentaron los procedimientos técnicos (Anexos 5, 6, 7, 8 y 9). Además, se incluyó el costo tanto de la prueba de la PCR como para el cultivo bacteriológico (Anexo 10), el cual mediante un código establecido por el SENASA indica el costo de cada ensayo.

V. RESULTADOS

5.1. Establecimiento de controles de referencia positivos

Medio J

Después del cuarto día de incubación del primer cultivo se observó en la mayoría de las placas poco crecimiento de la bacteria. Debido a lo anterior, se procedió a cultivar nuevamente la bacteria a partir del caldo ICC inoculado, y en vez de agregar 15 μL de la muestra se adicionó 500 μL de la misma.

Luego de cultivar con 500 μL de la muestra se logró observar al cuarto día de incubación varias colonias pequeñas, circulares-puntiformes, de borde liso y margen entero, color blanco opaco-perlado que al reflejarse a la luz parecen ser brillantes, de aspecto húmedo, translucidas, catalasa negativa y no productoras de esporas (Figura 1). Seguidamente, después de realizar la tinción de gram y al colocar la lámina en el microscopio a 100 X, se observaron numerosos cocos y algunos estafilococos lanceolados gram positivos individualmente o en grupos, pares o en cadenas cortas (Figura 2).



Figura 1. Aislado de *M. plutonius*, inoculado en medio J y utilizado como control positivo.

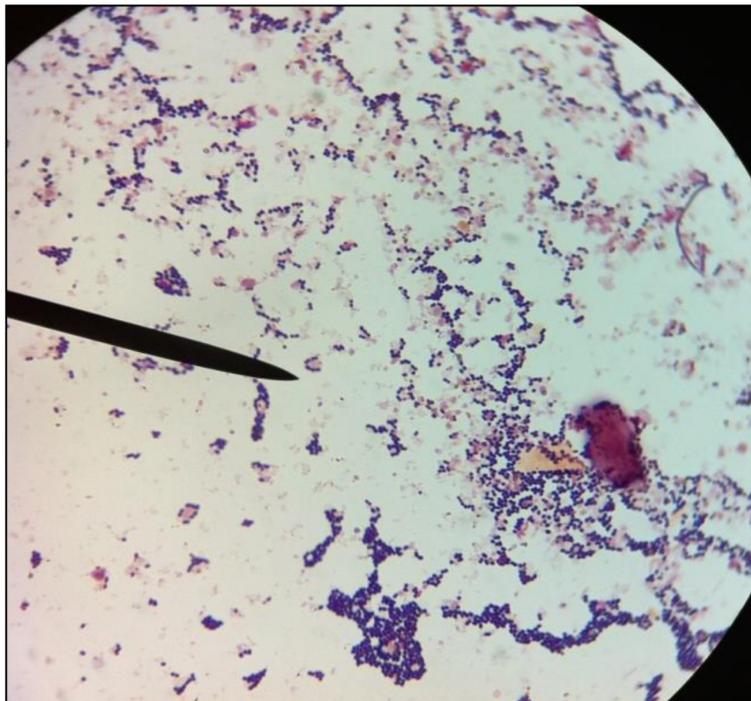


Figura 2. Cocos gram positivos de *Melissococcus plutonius*: La causante de la Loque Europea.

Medio MYPGP

En el caso de AFB, entre el tercer y cuarto día de incubación se observaron colonias pequeñas, de coloración blanquecina- beige, borde casi siempre rugoso, planas o elevadas, al reflejarse a la luz son de apariencia mate, opacas, margen ondulado- estrellado y catalasa negativa (Figura 3). Después de realizar la tinción de gram, se observaron al microscopio a 100 X, bacilos gram positivos con extremos redondeados-curvos, aislados o en cadenas (Figura 4).

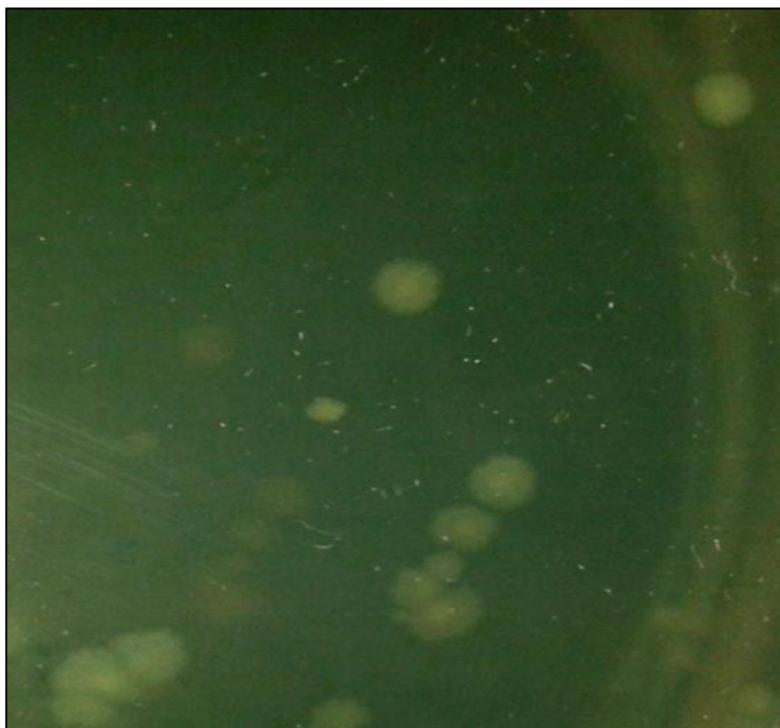


Figura 3. Aislado de *P. larvae*, inoculado en medio MYPGP y utilizado como control positivo.

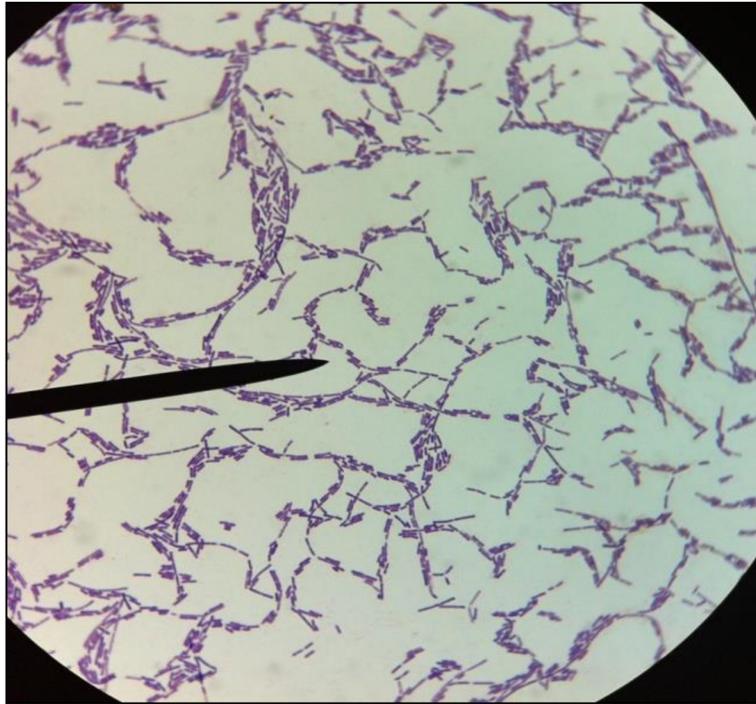


Figura 4. Bacilos gram positivos de *Paenibacillus larvae*: La causante de la Loque Americana.

5.2. Técnica de la PCR

Después de extraer el ADN de las bacterias de acuerdo al protocolo utilizado se procedió a realizar la PCR y seguidamente, se verificaron los productos por medio de la electroforesis en gel de agarosa la cual mostró la amplificación de las bandas 272 pb y 1106 pb.

5.3. Estandarización, optimización y validación de la PCR

5.3.1. Temperatura de alineamiento

En referente a la temperatura de alineamiento se observó que los mejores resultados tanto para EFB como para AFB se obtuvieron a una temperatura de 58°C la cual generó una banda clara y definida (Figuras 5 y 6).

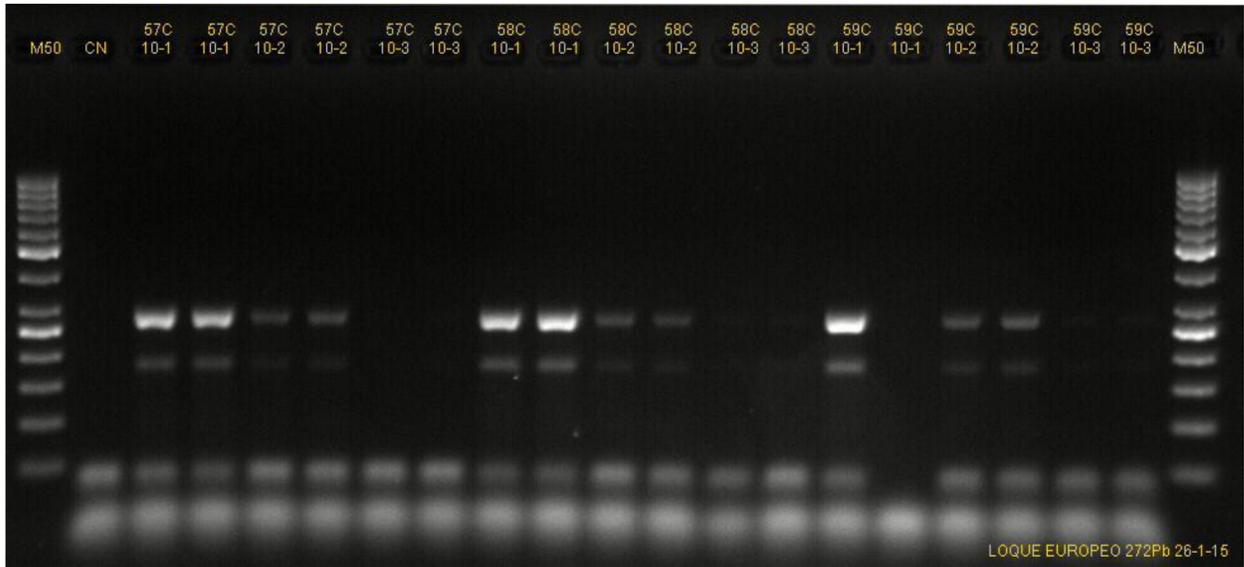


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Ensayo para determinar la mejor temperatura de alineamiento para la optimización de la PCR de EFB.

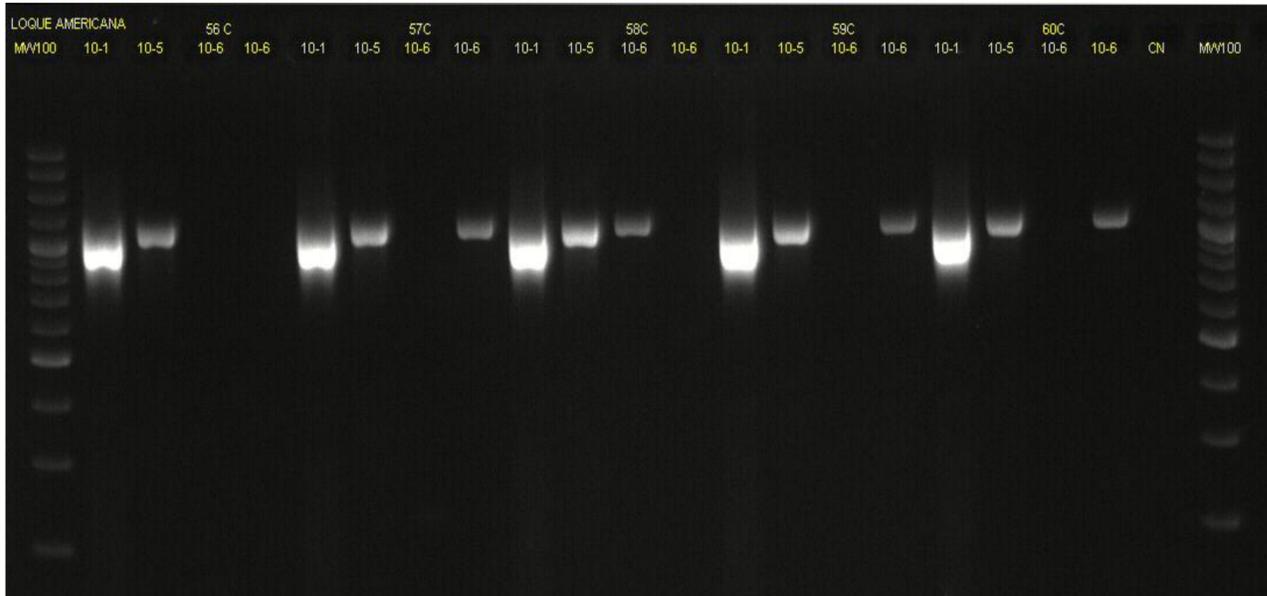


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Ensayo para determinar la mejor temperatura de alineamiento para la optimización de la PCR de AFB.

5.3.2. Concentración de iniciadores

Con respecto a la concentración óptima de iniciadores se comprobó que con una cantidad de 0.5 μM de primers y a una temperatura de 58°C se obtuvieron las mejores amplificaciones en las diluciones 10^{-1} y 10^{-3} para *M. plutonius* y 10^{-5} y 10^{-6} para *P. larvae* (Figuras 7 y 8).

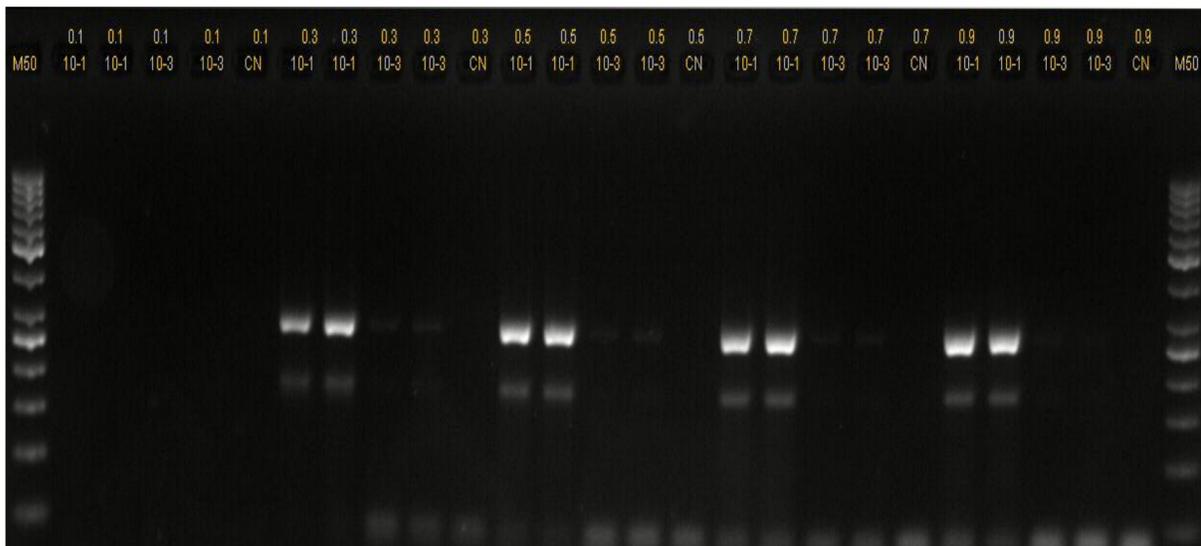


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Resultados de las diferentes concentraciones de iniciadores para la optimización de la PCR de EFB.

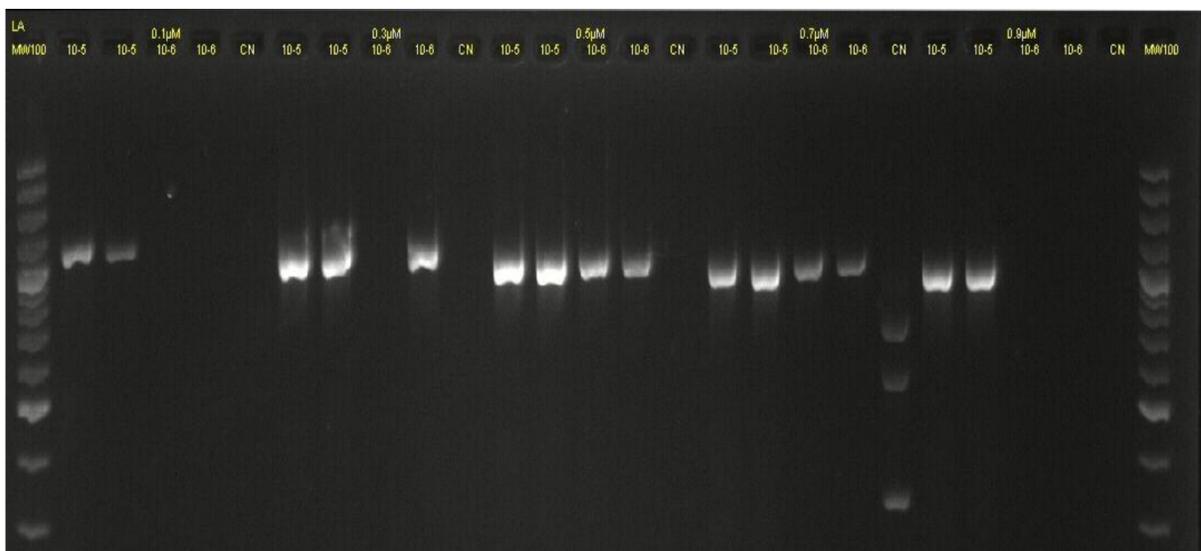


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Resultados de las diferentes concentraciones de iniciadores para la optimización de la PCR de AFB.

5.3.3. Volumen de muestra

En cuanto al volumen de muestra y con las mismas condiciones anteriores de temperatura se determinó que para EFB la mejor amplificación se obtuvo con un volumen de muestra de 3 μL (Figura 9), mientras que para AFB este resultado mejoró con un volumen de 2 μL (Figura 10). Cabe mencionar que debido a los resultados obtenidos en la PCR para límite de detección de AFB se preparó una dilución de 10^{-7} .

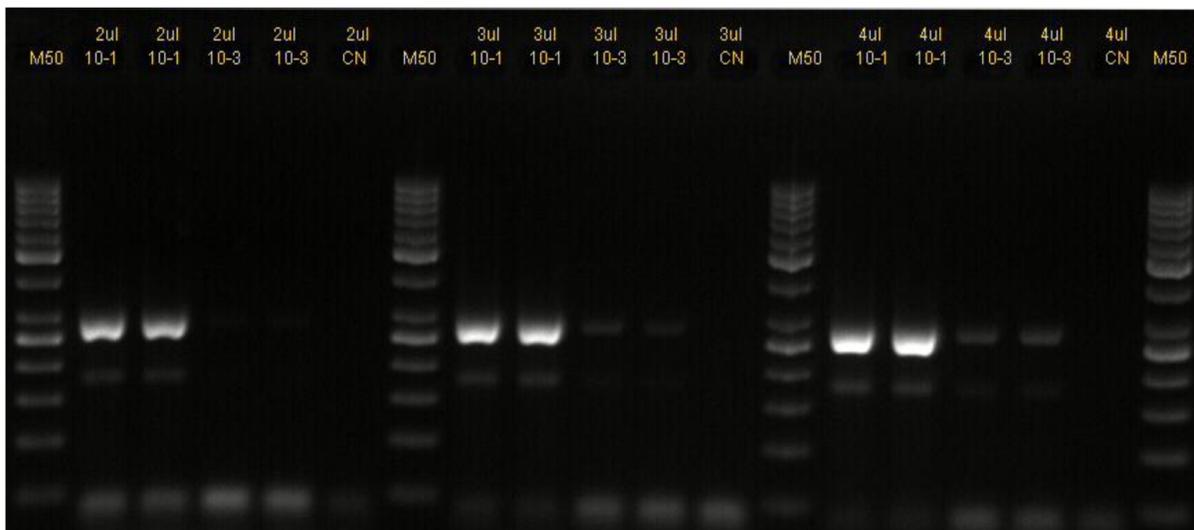


Figura 9. Gel de electroforesis al 2%. Resultado del ensayo de volumen de muestra para la optimización de la PCR en la detección de EFB.

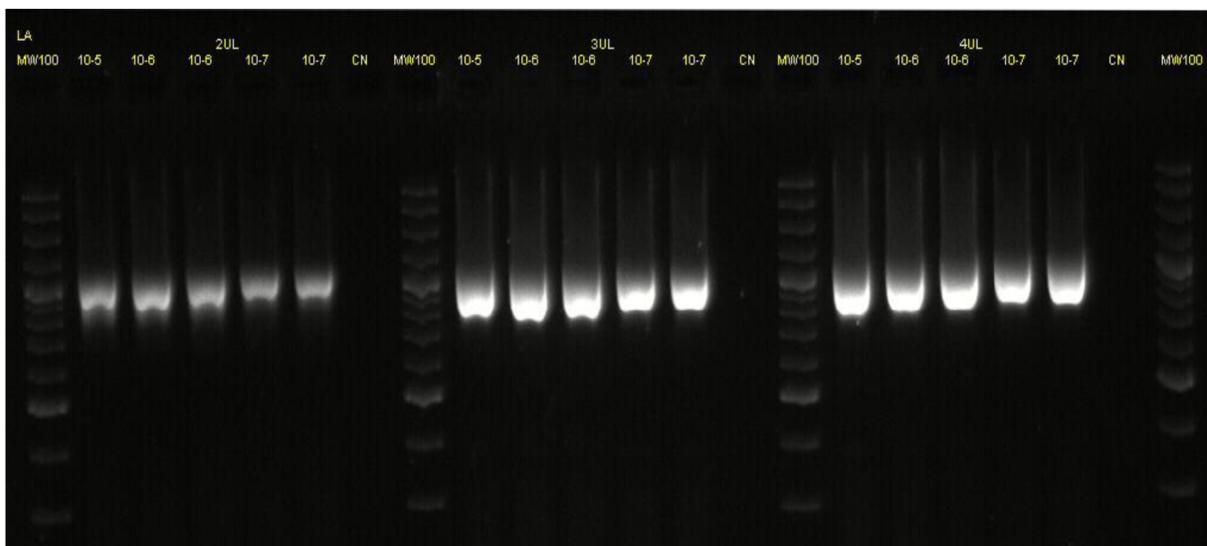


Figura 10. Gel de electroforesis al 1%. Resultado del ensayo de volumen de muestra para la optimización de la PCR en la detección de AFB.

5.3.4. Estándares de turbidez de McFarland

Al ajustar y comparar la turbidez de una suspensión bacteriana con los rangos establecidos en los estándares de McFarland, se determinó que el valor de densidad óptica correspondió a 0.631 para EFB y 0.702 para AFB. Estos valores se aproximan al valor de UFC/mL del estándar 2 en la escala McFarland (Cuadro 4). Además, se estimó que la cantidad inicial de UFC/mL para EFB fue de $5,72 \times 10^8$, mientras que para AFB este valor correspondió a $6,2145 \times 10^8$ UFC/mL (Figuras 11 y 12).

Cuadro 4. Escala de turbidez de McFarland, densidad óptica del recuento de bacterias aproximadas para *E. coli* y densidad óptica medida para Loque Europea y Loque Americana.

Escala de McFarland	Densidad del recuento de bacterias aproximadas para <i>E. coli</i> (10^8)*	Densidad experimental para <i>M. plutonius</i>	Densidad experimental para <i>P. larvae</i>
0.5	1.5×10^8	0,136	0.192
1	3×10^8	0,300	0,366
2	6×10^8	0,628	0,688
3	9×10^8	1,033	1,057
4	12×10^8	1,275	1,326
5	15×10^8	1,649	1,474
6	18×10^8	1,884	1,757
7	21×10^8	2,182	2,131
8	24×10^8	2,486	2,377
9	27×10^8	2,544	2,507
10	30×10^8	2,758	2,892

*El número de bacterias/mL o UFC (10^8) está calculado en un valor aproximado para *E. coli*.

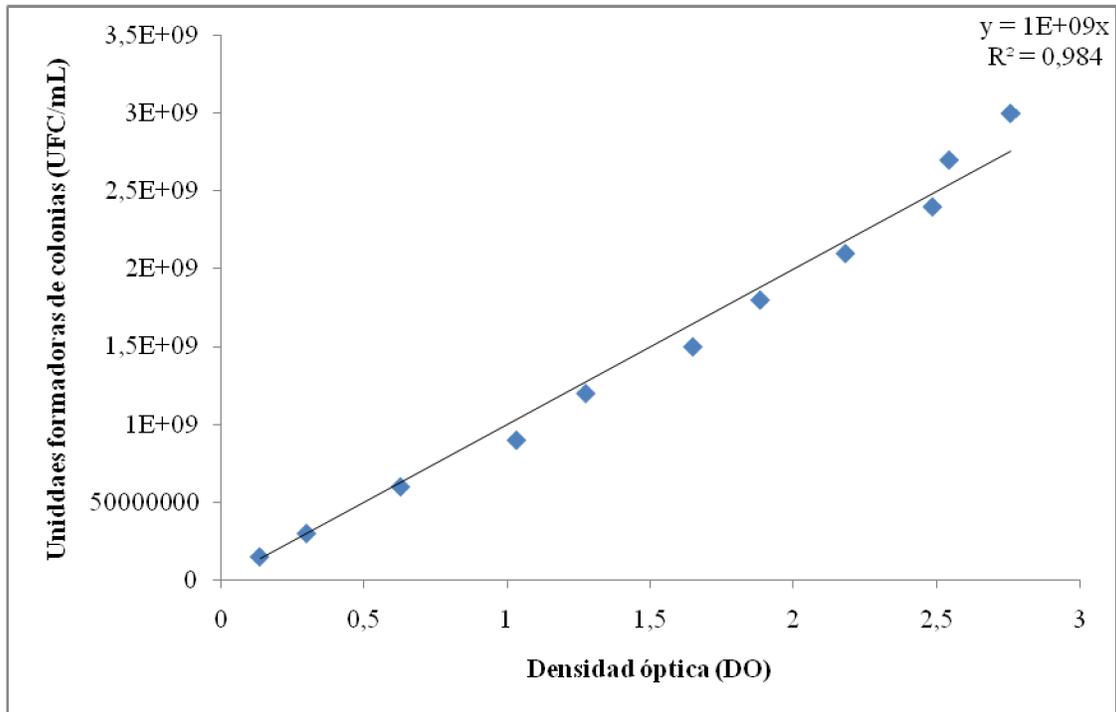


Figura 11. Curva de calibración que establece el número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) de EFB a partir de cada uno de los estándares preparados con la escala de McFarland y los valores de densidad óptica (DO). El valor de R indica la relación entre la densidad óptica medida y el valor de UFC/mL de los estándares de McFarland preparados.

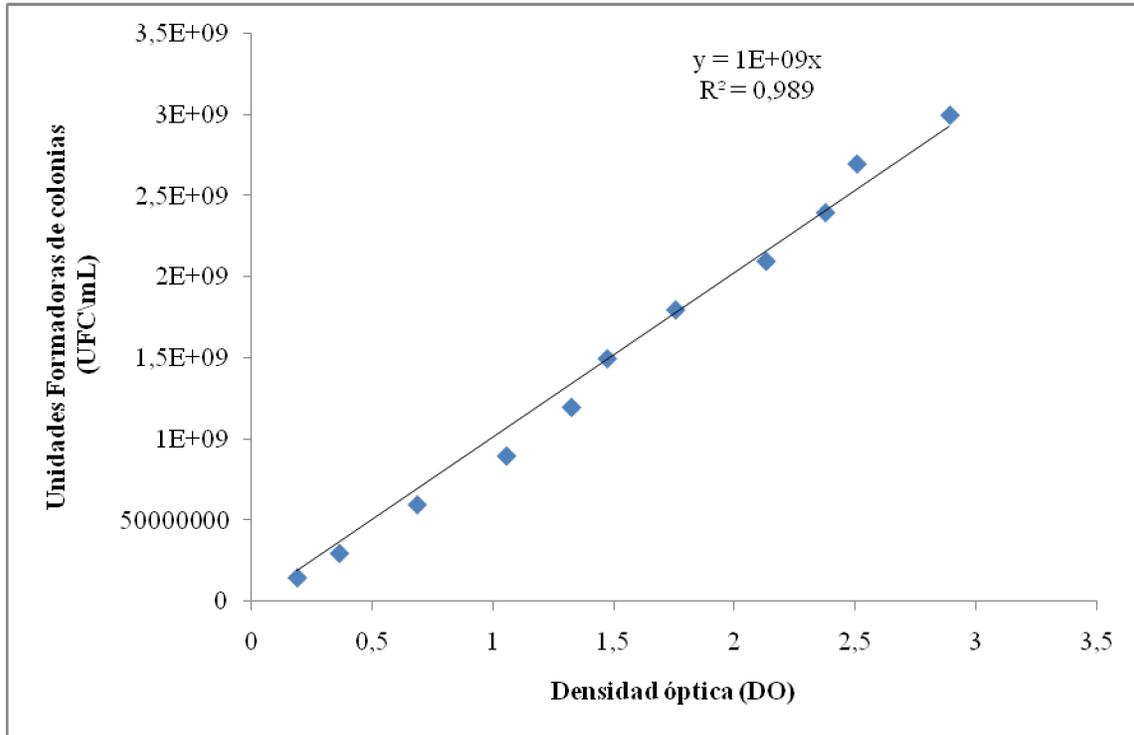


Figura 12. Curva de calibración que establece el número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) de AFB a partir de cada uno de los estándares preparados con la escala de McFarland y los valores de densidad óptica (DO). El valor de R indica la relación entre la densidad óptica medida y el valor de UFC/mL de los estándares de McFarland preparados.

5.3.5. Límite de detección de *M. plutonius* y *P. larvae*

Con respecto al límite de detección se observó que en la PCR realizada para EFB se logró amplificar el ADN de la bacteria hasta una dilución de 10^{-5} (Figura 13). A partir de estos resultados se estimó que para EFB la cantidad mínima de copias de genomas bacterianos que puede detectarse y distinguirse en la PCR corresponde a $5,72 \times 10^3$ UFC/mL (Cuadro 5). En cuanto a AFB, luego de realizar la PCR se estableció el límite de detección hasta la dilución 10^{-7} (Figura 14). Lo anterior indica que la cantidad mínima de copias de genomas bacterianos que puede amplificarse y distinguirse en la PCR de AFB corresponde a $6,2145 \times 10^1$ UFC/mL (Cuadro 6).

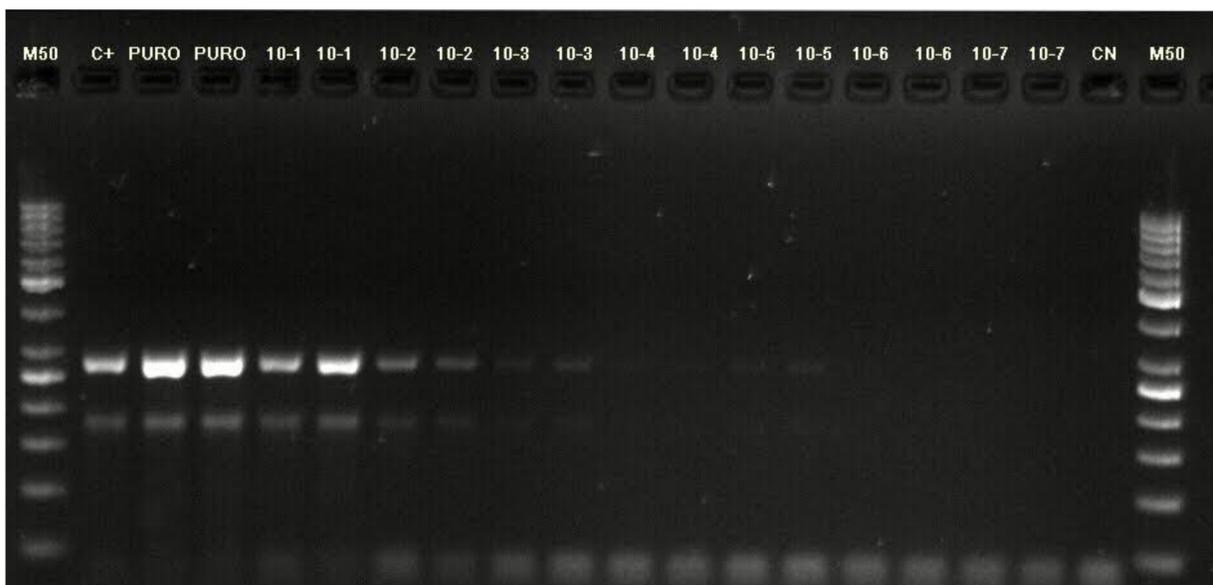


Figura 13. Resultados del ensayo de determinación del límite de detección para EFB, mediante la visualización de un gel de agarosa al 2%.

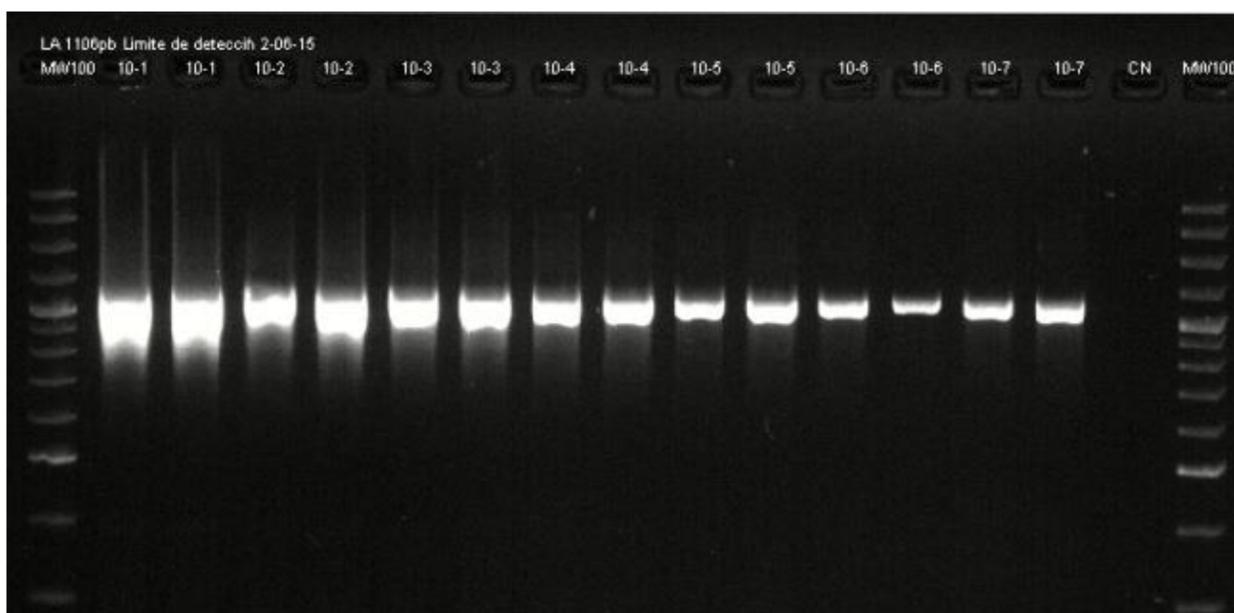


Figura 14. Resultados del ensayo de determinación del límite de detección para AFB₁, mediante la visualización de un gel de agarosa al 1%.

Cuadro 5. Diluciones decimales (1:10) y sensibilidad analítica estimada en la PCR de EFB.

Número	Diluciones decimales (1:10)	UFC/mL para Loque Europeo	Límite de detección
1	0,10	$5,72 \times 10^8$	Positivo
2	0,01	$5,72 \times 10^7$	Positivo
3	0,001	$5,72 \times 10^6$	Positivo
4	0,0001	$5,72 \times 10^5$	Positivo
5	0,00001	$5,72 \times 10^4$	Positivo
6	0,000001	$5,72 \times 10^3$	Positivo
7	0,0000001	$5,72 \times 10^2$	Negativo
8	0,00000001	$5,72 \times 10^1$	Negativo
8	0,000000001	$5,72 \times 10^0$	Negativo

Cuadro 6. Diluciones decimales (1:10) y sensibilidad analítica estimada en la PCR de AFB.

Número	Diluciones decimales (1:10)	UFC/mL para Loque Americana	Límite de detección
		6,2145X10 ⁸	Positivo
1	0,10	6,2145X10 ⁷	Positivo
2	0,01	6,2145X10 ⁶	Positivo
3	0,001	6,2145X10 ⁵	Positivo
4	0,0001	6,2145X10 ⁴	Positivo
5	0,00001	6,2145X10 ³	Positivo
6	0,000001	6,2145X10 ²	Positivo
7	0,0000001	6,2145X10 ¹	Positivo
8	0,00000001	6,2145X10 ⁰	Negativo

5.3.6. Especificidad de los primers

Para la PCR de EFB no se observaron bandas que correspondieran a las bacterias analizadas, de manera que se verifica la especificidad de la reacción para *M. plutonius* (Figura 15). Sin embargo, para la PCR de AFB se evidenciaron bandas inespecíficas de cuatro bacterias: 1- *Micrococcus* ATCC 884, 2- *Listeria* ATCC 19114, 3- *Streptococcus ruisotozooepidemicus* ATCC700 400, 4- *Corynebacterium renale* ATCC 19412) (Figura 16).

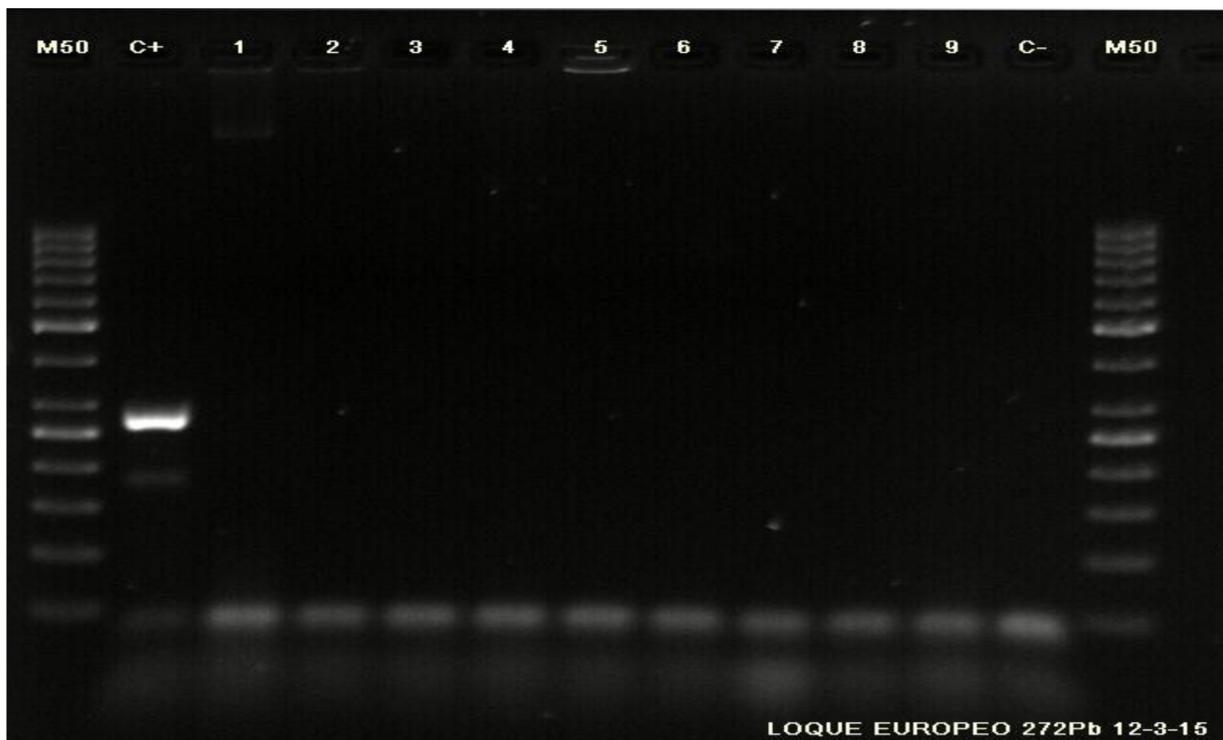


Figura 15. Determinación de la especificidad de los iniciadores utilizados para EFB mediante el empleo del ADN de nueve microorganismos. C + Control positivo; 1) *Micrococcus* ATCC 884; 2) *Listeria* ATCC 19114; 3) *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615; 4) *Staphylococcus xylosus* ATCC 700404; 5) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; 6) *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305; 7) *Streptococcus ruisotozooepidemicus* ATCC 700 400; 8) *Arcanobacterium pyogenes* ATCC19411 y 9) *Corynebacterium renale* ATCC 19412.

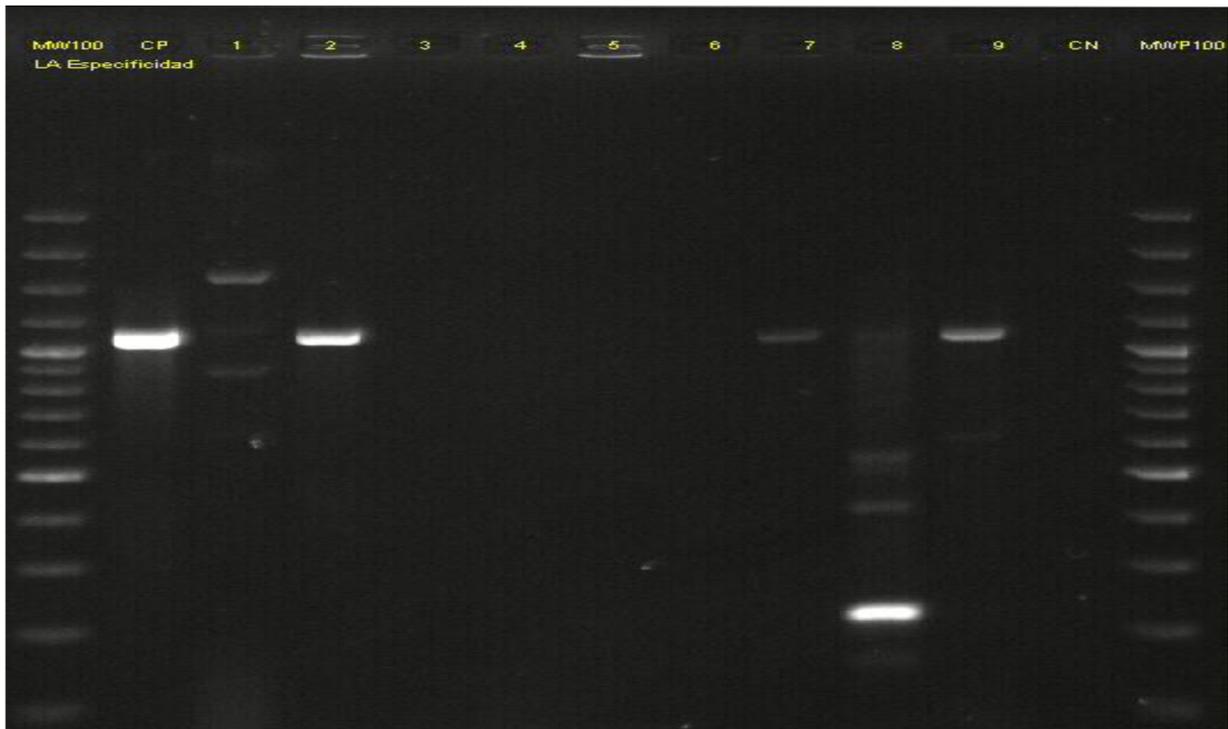


Figura 16. Determinación de la especificidad de los iniciadores utilizados para AFB mediante el empleo del ADN de nueve microorganismos. C + Control positivo; 1) *Micrococcus* ATCC 884; 2) *Listeria* ATCC 19114; 3) *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615; 4) *Staphylococcus xylosus* ATCC 700404; 5) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 6- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305, 7- *Streptococcus ruisotozooepidemicus* ATCC 700 400; 8) *Arcanobacterium pyogenes* ATCC19411 y 9) *Corynebacterium renale* ATCC 19412.

Debido a lo anterior, con el fin de mejorar la especificidad de la PCR para AFB se realizó una nueva amplificación con una temperatura de alineamiento en un rango desde los 58°C hasta los 61°C (Figura 17 y 18). El gel de agarosa mostró que los iniciadores empleados para *P. larvae* son específicos en la identificación de la bacteria a los 61°C. Adicionalmente se realizó un ensayo para comprobar la sensibilidad de la PCR para AFB ya obtenida anteriormente en la prueba para límite de detección. En el gel de agarosa se observó que el límite de detección se mantuvo en la dilución 10^{-7} a una temperatura de anillamiento de 61°C (Figura 19).

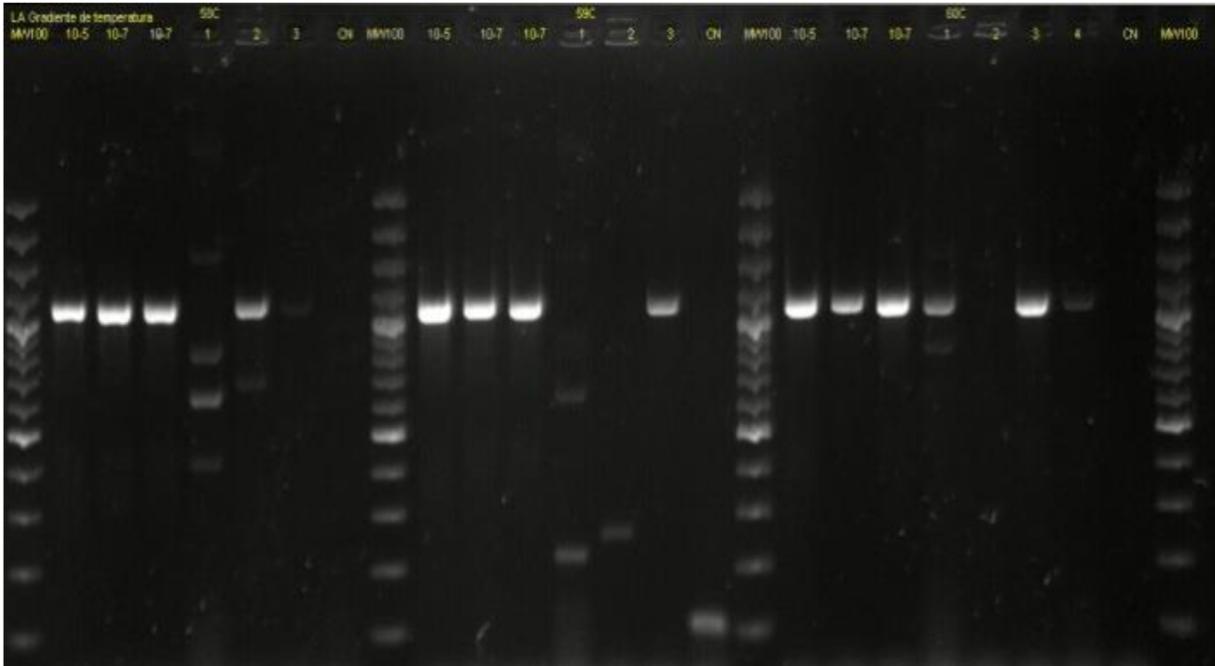


Figura 17. Evaluación de la nueva temperatura de anillamiento desde 58°C hasta 60°C. Determinación de la especificidad de los iniciadores utilizados para AFB mediante el empleo del ADN de cuatro microorganismos 1) *Micrococcus* ATCC 884; 2) *Listeria* ATCC 19114; 3) *Streptococcus ruisotozoepidemicus* ATCC 700 400; 4) *Corynebacterium renale* ATCC 19412.

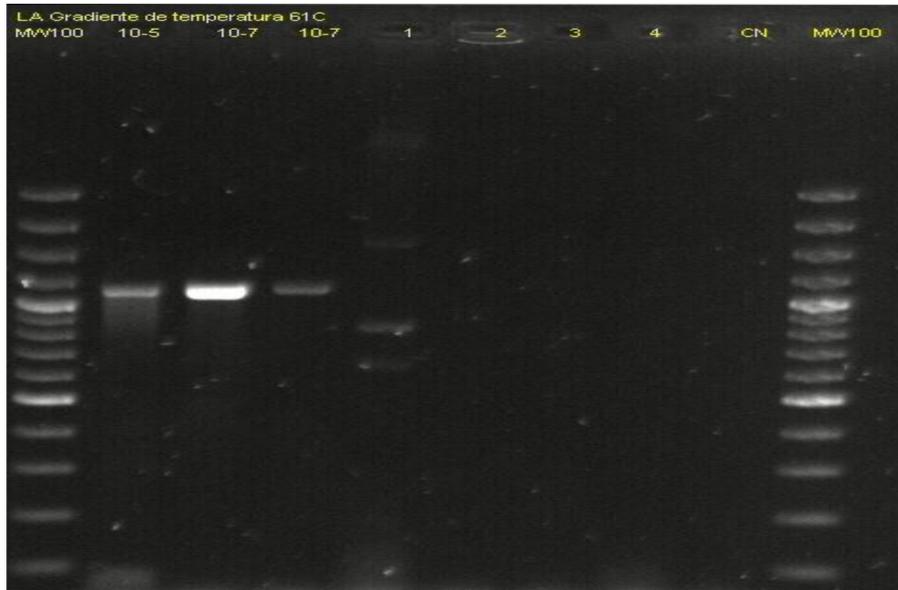


Figura 18. Evaluación de la temperatura de anillamiento a 61°C. Determinación de la especificidad de los iniciadores utilizados para AFB mediante el empleo del ADN de cuatro microorganismos 1- *Micrococcus* ATCC 884, 2- *Listeria* ATCC 19114, 3- *Streptococcus ruisotozooepidemicus* ATCC700 400, 4- *Corynebacterium renale* ATCC 19412.

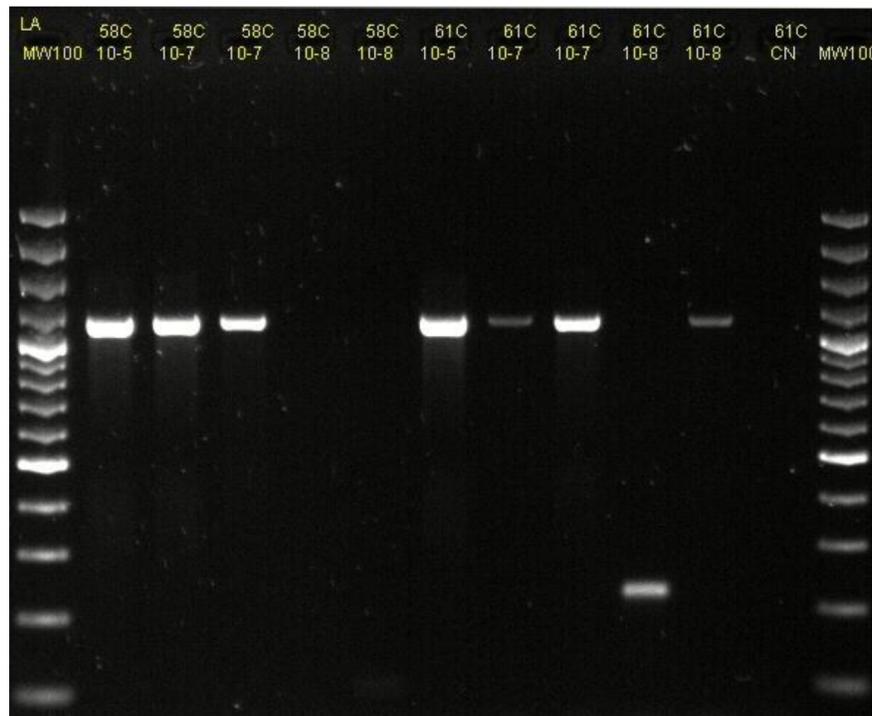


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Prueba de límite de detección a una temperatura de alineamiento de 58°C y 61°C mediante la PCR para la detección de AFB.

5.3.7. Reproducibilidad de las PCRs

Al analizar el ADN de las diluciones decimales de una misma muestra positiva por dos distintos operarios, con las condiciones establecidas de ciclaje, temperatura de alineamiento, volumen de ADN, iniciadores y el uso de diluciones 10^{-2} y 10^{-3} para EFB y 10^{-5} , 10^{-7} y 10^{-8} para AFB, se observó en todos los casos la amplificación de las bandas correspondientes a 272 pb y 1106 pb (Figuras. 20, 21, 22 y 23).

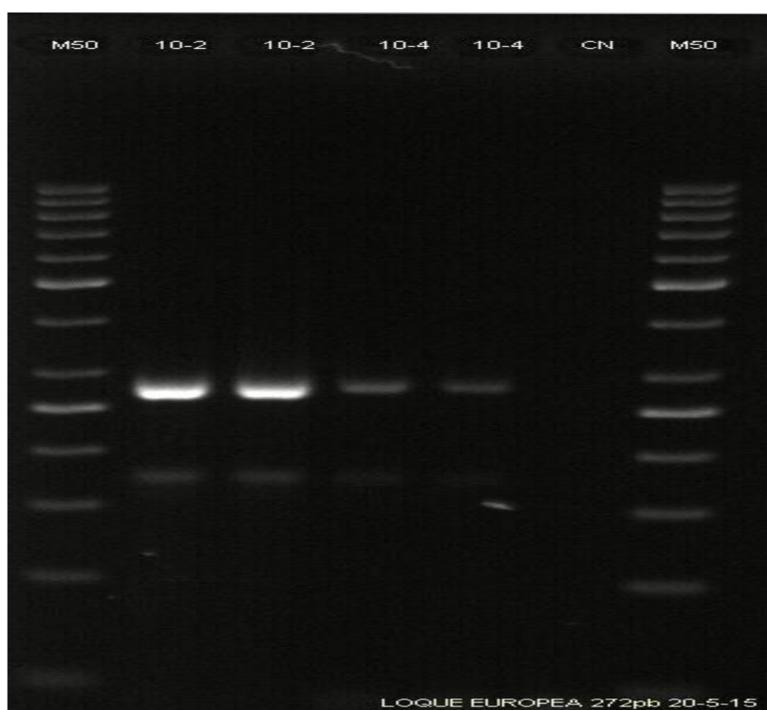


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Reproducibilidad de la PCR estandarizada y optimizada para la detección de EFB efectuada por un primer operario.

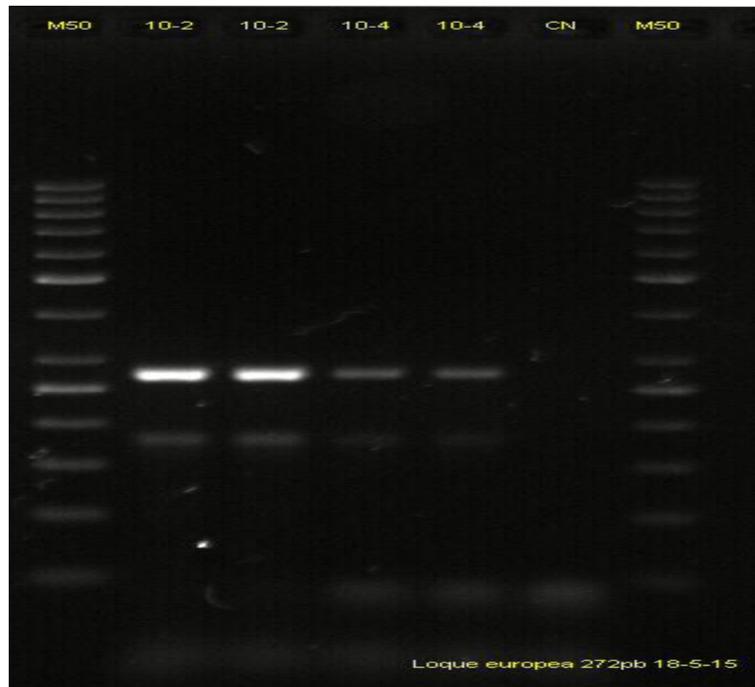


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Reproducibilidad de la PCR estandarizada y optimizada para la detección de EFB efectuada por un segundo operario.



Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Reproducibilidad de la PCR estandarizada y optimizada para la detección de AFB efectuada por un primer operario.

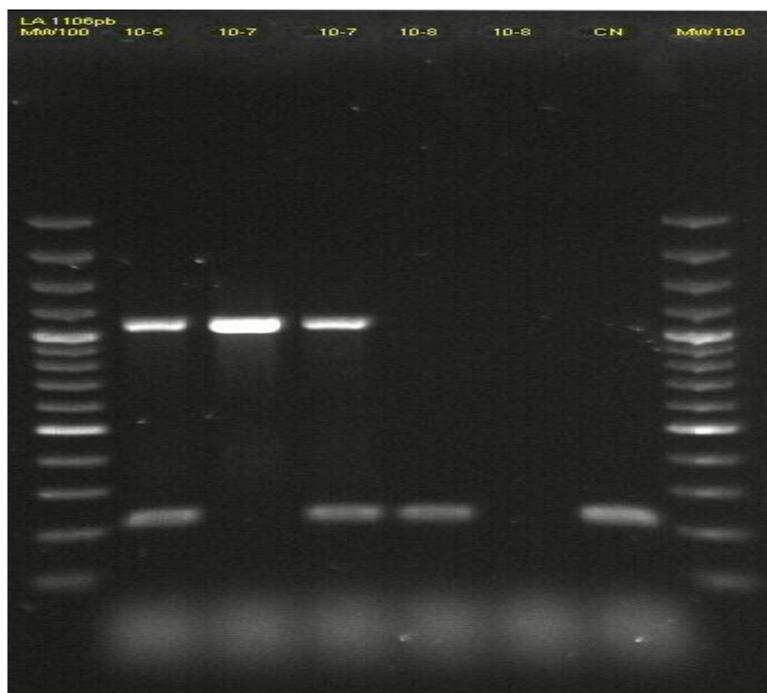


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Reproducibilidad de la PCR estandarizada y optimizada para la detección de AFB efectuada por un segundo operario.

5.3.8. Repetibilidad de las PCRs

Bajo las mismas condiciones de manipulación, instrumentos y reactivos, procedimientos y condiciones de medición utilizadas en la reproducibilidad de las PCRs estandarizadas y optimizadas, en todas las ocasiones se observaron las bandas 272 pb y 1106 pb (Figuras 24, 25, 26 y 27).



Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Repetibilidad de la PCR estandarizada y optimizada para la detección de EFB realizada por un único operario.

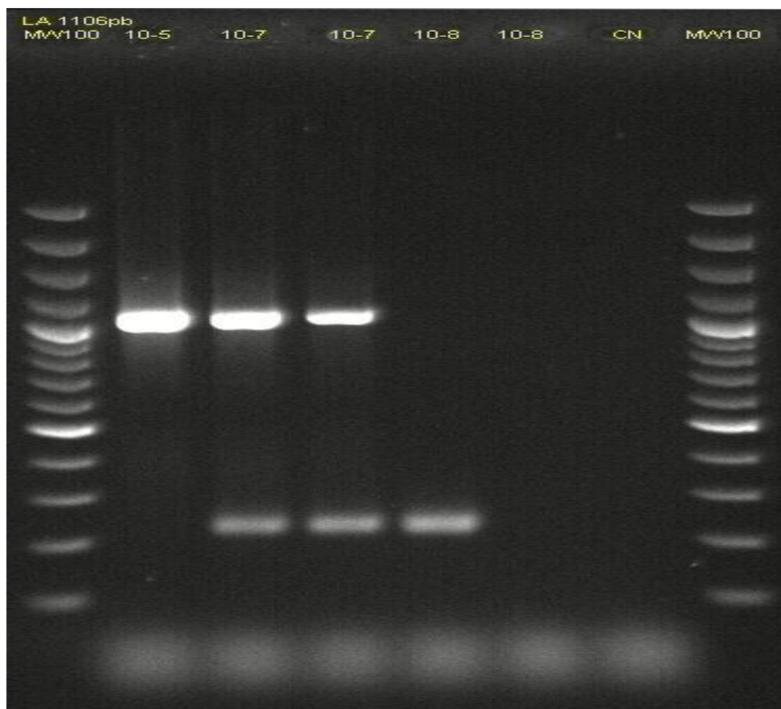


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Repetibilidad de la PCR estandarizada y optimizada para la detección de AFB realizada por un único operario.

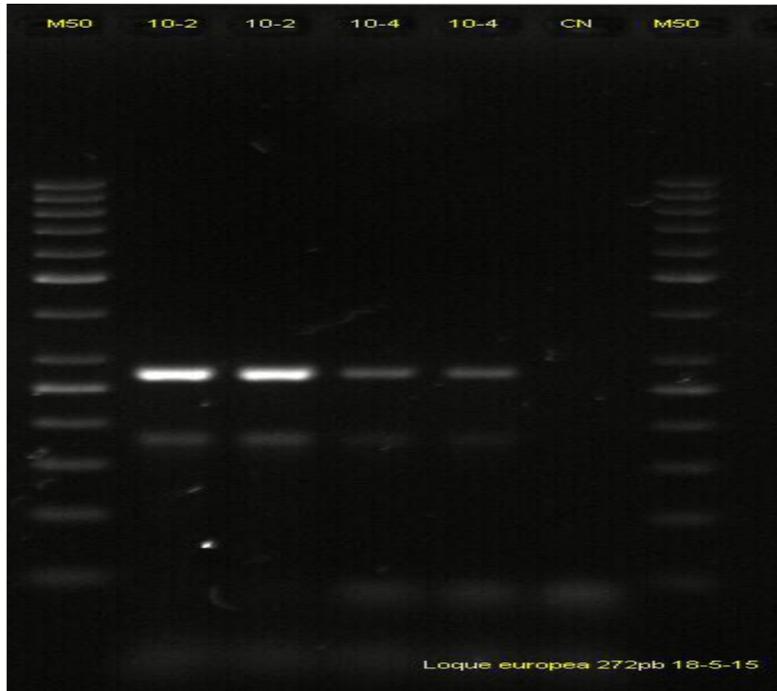


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Repetibilidad de la PCR estandarizada y optimizada para la detección de EFB realizada por un único operario.



Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Repetibilidad de la PCR estandarizada y optimizada para la detección de AFB realizada por un único operario.

5.4. Análisis en muestras de campo

En cuanto a los resultados obtenidos una vez transcurrido el tiempo de incubación establecido para ambas enfermedades, se observó que en las placas cultivadas con el medio J que favorece el crecimiento de EFB, no hubo crecimiento de ninguna colonia sospechosa en ninguna de las placas, mientras que en el caso del cultivo en el medio MYPGP realizado para AFB, se evidenció el crecimiento de dos colonias pero que al ser comparadas con el control positivo no mostraron similitud con el mismo.

5.4.1. Detección molecular de *P. larvae* y *M. plutonius* en muestras de campo

En cuanto a la PCR realizada para ambas enfermedades, en el caso de EFB el gel de agarosa confirmó una banda de 272 pb, la cual evidencia el resultado de 3 muestras positivas (Figuras 28 y 29). En referente al diagnóstico de AFB, como la mayoría de las larvas presentó una alta compatibilidad de sintomatología asociada con la enfermedad de EFB, con el objetivo de comprobar la ausencia de *P. larvae*, se realizó una PCR con ocho muestras de las cuales dos fueron específicamente las colonias halladas en las placas con el medio de cultivo y el resto correspondieron a las larvas utilizadas en la PCR de EFB.

No obstante, al no observarse ninguna amplificación de la banda 1106 pb tanto en las muestras de larvas como las de las colonias en el medio de cultivo, se evidenció la ausencia de esta bacteria que causa la enfermedad (Figura 30).

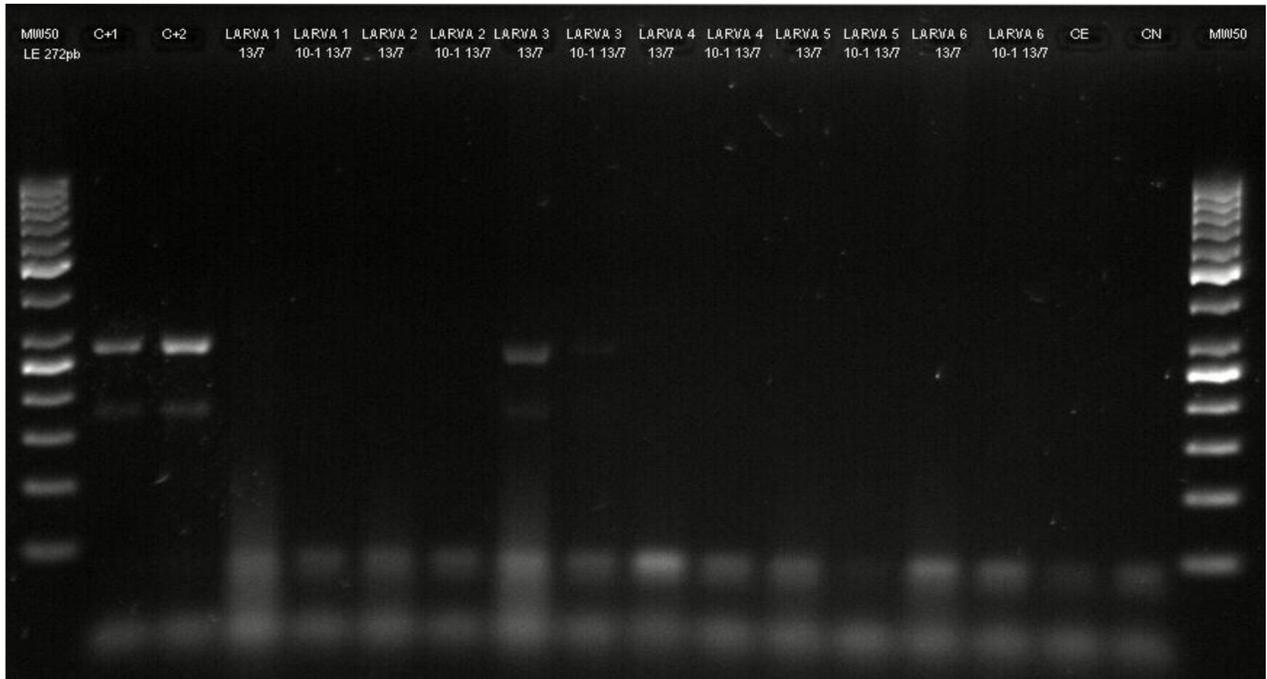


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. ADN de larvas con sintomatología sospechosa de EFB.



Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Amplificación de la banda 272 pb procedentes de muestras de larvas con sintomatología sospechosa a EFB.



Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. No se observa amplificación del ADN en las muestras de larvas con sintomatología de AFB.

5.5. Secuenciación de los productos de la PCR

Al secuenciar el control positivo de *P. larvae* y *M. plutonius* se observó un 100% de identidad con respecto a *Melisococcus plutonius* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: DAT 585 y 100% de identidad con respecto a *Paenibacillus larvae* strain PL87 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. Así mismo, las muestras positivas obtenidas en la PCR para larvas con sintomatología se obtuvo un 100% de homología con *Melisococcus plutonius* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: DAT557 (National Center for Biotechnology Information). La secuencia comparada correspondió a los productos amplificados por la PCR con tamaños de 1106 pb y 272 pb.

5.6. Documentación de los procedimientos técnicos

Se elaboraron los documentos DV-LSE - PT-002-IN-001 instructivo para el cultivo de bacterias- para Loque, Estándar de turbidez de McFarland, procedimiento para la preparación del medio de J para el cultivo de Loque europeo y medio MYPGP para el cultivo de Loque Americana, PCR para la detección de Loque Europea (*Melissococcus plutonius*), PCR para la detección de Loque Europea (*P. larvae*) (Anexos 6, 7, 8 y 9).

VI. DISCUSIÓN

Las abejas son susceptibles a una amplia variedad de enfermedades y amenazas ambientales las cuales han aumentado en intensidad en la última década (Genersch, 2010). El presente trabajo se enfocó en dos agentes patógenos que afectan a la cría de abejas y se desarrolló una estandarización de la PCR capaz de detectar ambos patógenos en cultivos puros y larvas con sintomatología, mediante el empleo de ADN genómico previamente purificado a través de cepas de referencia e iniciadores definidos, con el fin de realizar una pronta aplicación de este método para la detección de ambos patógenos y el desarrollo de estudios similares.

Generalmente, el diagnóstico de AFB y EFB se realiza por medio de una serie de procedimientos basados fundamentalmente en la detección de los signos clínicos de la enfermedad y el exámen microscópico directo. Sin embargo, el medio tradicional para la identificación de estos patógenos es a través del aislamiento del microorganismo a partir de muestras clínicas, los cuales pueden fácilmente distinguirse de todas las demás bacterias asociadas con las abejas debido a sus exigentes condiciones (OIE, 2008_{1a-2a}).

En referente a los medios MYPGP para el cultivo de *P. larvae* y J para el cultivo de *M. plutonius*, ambos permitieron el crecimiento de las cepas utilizadas como control positivo en todas las siembras realizadas. Lo anterior se debe a que se utilizó el ambiente bioquímico (componentes del medio) y biofísico (pH, temperatura, condiciones microaeróbicas, 5-10% de CO₂) indispensable para el crecimiento y mantenimiento de estas bacterias (Dingmann y Stahly, 1983; Bailey, 1984; Gende *et al*, 2008; Okumura *et al*, 2011; Takamatsu *et al.*, 2013 y Forsgren *et al.*, 2015). Asimismo, la identificación y descripción morfológica y microscópica coincidió con la establecida por la OIE (2008_{1a-2a}).

Con respecto a la técnica de la PCR empleada para AFB y EFB, en este estudio el primer paso para la identificación de microorganismos mediante técnicas moleculares consistió en el aislamiento del material genético proveniente de cepas y de larvas, razón por la cual se procuró contar con un método de protocolo eficiente para la obtención de ADN de alta pureza, integridad y calidad. Dicho protocolo demostró ser idóneo para extraer ácido nucleico de excelente calidad cuando se emplea tanto para bacterias como para restos larvales.

En lo que se refiere a la estandarización y optimización de la PCR, en este trabajo luego de varias modificaciones del protocolo base (OIE, 2008), se necesitó una serie de ensayos donde las condiciones experimentales a partir de dicho protocolo tuvieron que adecuarse a las condiciones propias del laboratorio hasta optimizar la amplificación. Dichas condiciones se establecieron tras realizar una serie de modificaciones en la temperatura de alineamiento, concentración idónea de iniciadores y volumen de ADN.

En cuanto a la temperatura de alineamiento Rochelle *et al* (1997), Guevara (2004), Espinosa (2007) y Yin *et al* (2012) mencionan que el alineamiento específico de ambos primers se produce a una temperatura determinada la cual es clave para una amplificación exitosa, y que además depende de la composición, tamaño y concentración de los primers.

Usualmente, las temperaturas de alineamiento en el rango de 55 a 72° C generan buenos resultados (Sambrook y Russell, 2001). Por lo tanto, las temperaturas de alineamiento empleadas en los ensayos elaborados en este trabajo y la finalmente optimizada (58°C y 61°C) para cada uno de los primers utilizados, se encuentran dentro de lo recomendado para una óptima amplificación.

Asimismo, los primers utilizados en este trabajo para la detección de EFB, corroboraron los resultados expuestos por Djordjevic *et al* (1998), McKee *et al* (2003), Goodman *et al* (2004), Formato *et al* (2009), Arai *et al* (2013) y Ansari *et al* (2016) al amplificar de forma clara, nítida y definida el fragmento 276 pb. Para AFB, se obtuvo un producto de 1106 pb, el cual coincide con el obtenido por Dobbelaere *et al* (2001), Oliveira *et al* (2015), Chemurot *et al* (2016) en sus estudios.

Cabe mencionar que tras realizar las modificaciones en el protocolo establecido por la OIE (2008_{1a-2a}) la cantidad de ADN (2µl y 3 µl), la temperatura de alineamiento (58°C), concentración de primers (0.5 µM) y el volumen de reacción (12.5 µl) de la PCR estandarizada y optimizada en este estudio difieren con los resultados expuestos por Godman *et al* (2004), Formato *et al* (2009), Arai *et al* (2013), Oliviera *et al* (2015), Chemurot *et al* (2016), Ansari *et al* (2016).

Estas diferencias son causadas posiblemente por las distintas condiciones en las que se realizó el ensayo (marcas de reactivos, equipos usados, localización y operarios). Por otra parte, los resultados obtenidos se encuentran dentro de los parámetros recomendados. Rose *et al* (2003) y Rodríguez y Barrera (2004) indican que las concentraciones óptimas de primers se encuentran entre 0.1 y 0.5 μM . Leninger (1975) y Rodríguez y Barrera (2004) mencionan que la muestra debe de contener al menos una cadena intacta de ADN que abarque la región amplificada, es decir una longitud promedio de unos cientos de pares de bases.

Para finalizar con la optimización de la PCR se disminuyó el volumen de reacción, con lo que se comprobó que a pesar de que se redujo la cantidad de los reactivos y el volumen de ADN establecido, la PCR no se vio afectada al lograrse una buena amplificación y detección de los patógenos en estudio. Además, la reducción del volumen de reacción también permitió una disminución significativa de costos lo cual garantiza que la reacción planteada es eficiente y manejable si se desea realizar a gran escala el diagnóstico de EFB y AFB por medio de la PCR.

Al realizar la PCR para determinar la especificidad del par de primers seleccionados ante la positividad de diferentes especies de bacterias aerobias gram positivas, solamente para EFB se obtuvo un 100% de especificidad. En cuanto a AFB, ésta se obtuvo tras varios ajustes en la temperatura de alineamiento donde se logró un 100% de especificidad sin afectar la sensibilidad.

Generalmente, Innis *et al* (1990) no recomiendan utilizar temperaturas muy altas debido a que pueden causar un mal alineamiento entre los primers y amplificar poco ADN, ni tampoco emplear temperaturas muy bajas para evitar la amplificación de ADN inespecífico. Sin embargo, Bolívar *et al* (2014) indican que entre más largo sea un primer este es aún más específico, por lo que requiere de una temperatura de disociación y anillamiento más alta.

Asimismo, además de la temperatura empleada en la fase de hibridación, la especificidad de la PCR depende también de la cantidad de iones divalentes que se incorporan en la reacción y la secuencia de los cebadores (Innis *et al*, 1990). Por lo tanto, de acuerdo con las consideraciones mencionadas, es esencial ensayar con diferentes temperaturas para con ello

establecer la temperatura de alineamiento óptima y con ello obtener una alta especificidad en la amplificación de los productos.

Es importante señalar que para el ensayo de especificidad no se utilizaron bacterias con características y condiciones similares a *P. larvae* y *M. plutonius*, esto se debe a que primeramente no se contaban con 9 tipos de bacterias gram positivas relacionadas con estos patógenos por ser poco comunes, y además porque las condiciones que exigen para el crecimiento, el aislamiento y la identificación son aún más difíciles que las especies de bacterias que se utilizaron.

Se determinó que el método estandarizado y optimizado fue altamente reproducible. Del mismo modo, la repetibilidad presentó características similares en los ensayos para ambas enfermedades. Por lo tanto, se puede deducir que la PCR empleada para el diagnóstico de EFB y AFB es fiable y puede realizarse de manera recurrente sin cambios en los resultados esperados en el laboratorio empleado.

Al analizar la curva de calibración graficada (Figuras 11 y 12) se puede observar que los estándares de McFarland preparados en este trabajo obtuvieron una buena correlación entre las UFC/mL y la densidad óptica ($R^2 = 0,988$) con una eficiencia de 98,18%. De manera que, no solamente se evidencia el éxito del ensayo sino que además, alude la importancia de utilizar este tipo de curvas, las cuales son útiles a la hora de cuantificar muestras desconocidas o difíciles de cuantificar, siempre que el valor a ser cuantificado se encuentre dentro del rango lineal (óptimo) de la curva.

Para concluir con la estandarización y optimización del método, se realizó un ensayo para determinar el límite de detección de la reacción con el cual se estableció la cantidad mínima de ADN detectable. Se evidenció que la reacción estandarizada y optimizada permite detectar hasta $6,2145 \times 10^1$ UFC/mL de *P. larvae* y $5,72 \times 10^3$ UFC/mL de *M. plutonius*. Además, al comparar los resultados de sensibilidad obtenidos para ambas enfermedades, se observó que la PCR de *P. larvae* es mucho más sensible que la determinada para *M. plutonius*.

No fue posible comparar los datos de sensibilidad obtenidos en este trabajo con los de otros estudios debido a que este valor no es reportado. No obstante, se debe de considerar que el límite de detección es establecido por el laboratorio en donde se realiza la técnica de la PCR y la diferencia en los resultados posiblemente se debe a las condiciones de trabajo

(destreza o capacitación del analista, funcionamiento y calibración de equipos, localización, calidad del ADN y primers, instalaciones adecuadas) y a las modificaciones realizadas en la reacción.

En la detección de *P. larvae* y *M. plutonius* a partir de larvas sospechosas provenientes de panales, los resultados no fueron los esperados debido a que en esta prueba no se obtuvo ningún aislamiento de las bacterias esperadas. Este resultado puede atribuirse a que posiblemente la concentración bacteriana en estas muestras es mucho menor que la que habitualmente presenta una cepa de referencia o por una baja viabilidad de las bacterias en la muestra.

Al contrario de los resultados obtenidos mediante el método de cultivo, luego de realizar la PCR se obtuvo que el ensayo permitiera detectar la presencia de EFB al amplificar en tres de las muestras el fragmento de 272 pb con éxito. Estos resultados permiten demostrar que la técnica de la PCR es una prueba muy sensible y específica para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades como AFB y EFB.

Dobbelaere *et al* (2001) y Lauro (2003) reconocen que la PCR es un método eficaz que supera los inconvenientes de tiempo que presentan los métodos de aislamiento y cultivo para *M. plutonius* y *P. larvae*. Govan (1998) y Piccini (2002) indican que la PCR es una técnica que permite detectar en forma rápida la EFB y AFB presentes en muestras sintomáticas y asintomáticas.

Por su parte, Djordjevic *et al* (1998) menciona que los resultados por algunas técnicas convencionales son poco fiables debido a que existe la posibilidad de que generen falsos positivos según la experiencia del operador. Por otro lado, Forsgren *et al* (2013) afirman que al ser las técnicas tradicionales (tales como las basadas en cultivos) métodos poco sensibles y específicos, presentan dificultades cuando la población de patógenos es baja, ya que aumentan la posibilidad de no detectar el agente causal.

Por otro lado, a pesar de que la sensibilidad posiblemente puede variar según el tipo de muestra analizada, el método de trabajo adecuado del analista, el método y la fuente de extracción del ADN, método de conservación y mantenimiento de la muestra entre otros, lo importante es que este estudio es válido para las matrices evaluadas (cepas y larvas), de manera que si se quisiese aplicar lo descrito en este trabajo en otro tipo de muestra, es

necesario un estudio previo de factores limitantes posibles y llevar a cabo una prueba o ensayo para adecuar la técnica a cada tipo de muestra.

Con respecto a la secuenciación de los productos obtenidos, se corroboró que el método de la PCR detecta el gen 16S rRNA para ambas especies, lo cual garantiza también la especificidad del método estandarizado. Generalmente, la secuenciación del 16S rRNA es el método de elección para determinar relaciones taxonómicas por arriba del nivel de género. Además, debido a que la molécula de 16S ARNr contiene regiones altamente variables, usualmente es posible el encontrar regiones de 20 a 30 bases que son completamente exclusivas de una sola especie de bacterias (Sanger *et al.*, 1977; Sambrook y Russel, 2001).

Por último, en referente a los costos de ambas pruebas cabe recalcar que no se realizó un estudio detallado de los mismos, primero porque en el SENASA existe un tarifario específico para el diagnóstico de enfermedades y su respectiva prueba, pero además porque este trabajo no se centra esencialmente en este detalle. No obstante, es necesario recalcar que se necesita de una alta inversión para la adquisición de equipos y para una adecuada estructura de las diversas áreas del laboratorio.

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1. Conclusiones

- La extracción de los ácidos nucleicos requiere medidas estrictas de manejo, por lo que es necesario contar con materiales y reactivos exclusivos para este propósito. Adicionalmente, todos los materiales deben ser esterilizados y estar libres de nucleasas.
- Mediante el método de la PCR se logró obtener buenos resultados a partir de cultivos puros, en los métodos estandarizados y optimizados para la detección de AFB y EFB.
- Para la estandarización y optimización en este estudio se empleó un esquema basado en la mejor temperatura de alineamiento. Ésta junto a la determinación de la mejor concentración de primers y volumen de muestra, fueron los factores de mayor incidencia dentro de la reacción que permitieron obtener amplicones claros, definidos y con buenos rendimientos.
- La detección de *P. larvae* y *M. plutonius* se consiguió exitosamente mediante la utilización de primers específicos, los cuales permitieron la amplificación de un fragmento del genoma de las bacterias correspondiente a 1106 pb y 272 pb.
- La detección de AFB y EFB por medio de larvas con sintomatología mostró ser poco eficiente por medio del método de cultivo, sin embargo, mediante la PCR se pudo detectar una cantidad mínima de $6,2145 \times 10^1$ UFC/mL de *P. larvae* y $5,72 \times 10^3$ UFC/mL de *M. plutonius* a partir de cultivos puros, y cuando este proviene de cepas de referencia.
- En cuanto a la sensibilidad, una desventaja que tienen los cultivos convencionales se debe a que la viabilidad de las bacterias depende del método de recolección, transporte, manipulación o conservación de la muestra. En el caso de la PCR no se requiere de bacterias vivas en la muestra para diagnosticar su presencia.

- Al comparar cualitativamente el tiempo del método de PCR con el cultivo convencional, se demostró una mayor eficiencia de la PCR en cuanto a tiempo de procesamiento de muestra (colonias sospechosa y muestras de campo) y obtención de resultados (2-3 días máximo) en relación con la técnica de cultivo (5-6 días).
- El desarrollo de este trabajo obtuvo como resultado una técnica de la PCR estandarizada y validada para la detección de AFB y EFB la cual mostró ser reproducible, específica y sensible, en la que se obtuvo ADN genómico de elevada calidad, cantidad y pureza.
- El diagnóstico correcto de AFB y EFB es muy importante dado que ambas enfermedades se controlan de distinta forma. Las ventajas de la PCR sobre los métodos convencionales son fundamentalmente su sensibilidad y especificidad lo que permite detectar muestras positivas en la PCR que han sido reportadas como negativas al analizarse con los métodos convencionales microbiológicos.

7.2. Recomendaciones

- Con este estudio se logró detectar e identificar los microorganismos que causan la enfermedad causada por AFB y EFB de forma rápida, sensible y reproducible, aunque no por ello se deben descartar los métodos tradicionales de diagnóstico, sino que deben de realizarse en conjunto.
- Cabe recalcar que en este estudio no se realizó una cuantificación de la concentración de ADN, por lo tanto, se recomienda después de la extracción realizar la cuantificación de las muestras de ADN y el análisis de las moléculas obtenidas para asegurar la calidad y la cantidad de las mismas antes de secuenciar.
- Es recomendable en investigaciones próximas aumentar el número de muestras clínicas a estudiar, así como realizar el ensayo en otro tipo de muestras tales como miel, polen, abejas obreras y adultas.
- Se recomienda emplear los protocolos estandarizados y optimizados en este trabajo en un estudio de campo que permita a futuro implementar dichas metodologías para la prestación de servicios destinados a la detección de ambas enfermedades.

- Es necesario establecer un programa de monitoreo para ambas enfermedades con la finalidad de identificar unidades de producción infectadas y a partir de ello establecer las medidas para mejorar el estatus sanitario de las diferentes regiones del país.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Alegría-Martínez, D.M. (1986). Aislamiento e identificación de *Melissococcus pluton* y bacterias secundarias, a partir de larvas de abejas (*Apis mellifera* ligustica). Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Veracruz. 48 pp.

Alippi, A.M. (1991). A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honeybee, *Apis mellifera*, in Argentina. *Journal of Apicultural Research*, 30 (2): 75-80.

Alippi, A.M. (1992a). Characterization of *Bacillus larvae* White, the causative agent of AFB of honeybees. First record of its occurrence in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 24: 67-72.

Alippi, A.M. (1992b). Detección de *Bacillus larvae* en poblaciones mixtas de esporas bacterianas a partir de restos larvales. *Microbiología SEM*, 8:115-118.

Alippi, A.M. (1995). Loque Americana: Problemática actual en Argentina. *Vida Apícola*, 73:49-53.

Alippi, A.M. (1996a). Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium. *Microbiología SEM*, 11 (1995): 343-350.

Alippi, A.M. & L. Núñez. (1991). La loque americana en Argentina. *Vida Apícola*, 49: 20-24.

Allen, M.F. & B.V. Ball. (1993). The cultural characteristics and serological relationships of isolates of *Melissococcus pluton*. *Journal of Apicultural Research*, 32: 80–88.

Ansari, M. J., Al-Ghamdi, A., Nuru, A., Mohamed-Ahmed, A., Ayaad, T.H., Al-Qarni, A., Alattal, Y. & N. Al-Waili. (2016). Survey and molecular detection of *Melissococcus plutonius*, the

causative agent of European Foulbrood in honeybees in Arabia Saudi. *Journal of Biological Sciences*, 24: (1) 1-9. doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.10.012.

Arai, R., Tominaga, K., Wu, M., Okura, M., Ito, K., Okamura, N., Onishi, H., Osaki, M., Sugimura, Y., Yoshiyama, M. & D. Takamatsu. (2012). Diversity of *Melissococcus plutonius* from Honeybee Larvae in Japan and Experimental Reproduction of European Foulbrood with Cultured Atypical Isolates. *PLoS ONE*, 7 (3): 1-10. doi: 10.1371/journal.pone.0033708.

Arai, R., Miyoshi-Akiyama, T., Okumura, K., Morinaga, Y., Wu, M., Sugimura, Y., Yoshiyama, M., Okura, M., Kirikae, T. & D. Takamatsu. (2013). Development of Duplex PCR Assay for Detection and Differentiation of Typical and Atypical *Melissococcus plutonius* strains, *Journal of Veterinary Medicine Sciences*, 76 (4): 491–498. doi: 10.1292/jvms.13-0386.

Bailey, L. & Collins, M.D. (1982). Reclassification of *Streptococcus pluton* (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton* nom. rev; Comb. nov. *Journal of Applied Bacteriology*, 53: 215–217.

Bailey, L. (1960). The epizootiology of European foulbrood of the larval honeybee, *Apis mellifera* Linnaeus. *Journal of Insect Pathology*, 2, 67–83.

Bailey, L. (1984). A strain of *Melissococcus pluton* cultivable on chemically defined media. *FEMS Microbiology Letters*, 25: 139–141.

Bailey, L. & B.V. Ball. (1991). *Honey Bee Pathology*. Academic Press, London, UK, and New York, USA.

Belak, S. & Thoren, P. (2001). Molecular diagnosis of animal diseases. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 1: 434–444.

Blanco, G. (1990). Loque Americana en las abejas melíferas de Costa Rica. *Ciencias Veterinarias*, 12:2-3.

Boecking, O. & E. Genersch. (2008). Varroosis: The Ongoing Crisis in Bee Keeping. *Journal für Verbraucher schutz und Lebens mittel sicherheit*, 3: 221-228.

Bolívar, A.M., Rojas. A. & P. García-Lugol. (2014). PCR and PCR-Multiplex: critical parameters and standardization protocol. *Avances en Biomedicina*, 3(1): 25-33.

BID/OIRSA. (1990). *Enfermedades de la cría y de las abejas adultas*. En: Programa regional para el manejo y control de la abeja africanizada (Ed). Enfermedades y Plagas de la Abeja Melífera Occidental (147 pp). San Salvador, El Salvador.

Burkhardt H.J. (2000). Standardization and quality control of PCR analyses. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 38, 87-91.

Calderón, R.A. & A. Ortiz. (2000). Principales enfermedades que afectan a las abejas melíferas. *Notas Apícolas Costarricenses*, 6:1-24.

Calderón, R.A. & L.A Sánchez. (2011). Diagnóstico de enfermedades en colmenas de abejas africanizadas en Costa Rica: prevalencia y distribución de setiembre a noviembre del 2007. *Agronomía Costarricense*, 35 (2): 49-60.

Corvalán, A., Aguayo, F., Lévicán, J. & I. Corvalán. (2003). Biología Molecular en Infectología. Parte II: Diagnóstico molecular de agentes infecciosos. Molecular Biology in infectious diseases- Part II: Molecular diagnosis of infectious agents. *Revista Chilena de Infectología*, 20: 26-38.

Chapin, K.C. & T. Lauderdale. (2003). Reagents, stains, and media: bacteriology. In: P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. P faller, & R. H. Tenenbaum (Eds). Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. (358p). ASM Press, Washington, D.C.

Chemurot, M., Brunain, M., Akol, A.M., Descamps, T. & D. de Graaf. (2016). First detection of *Paenibacillus larvae* the causative agent of American Foulbrood in a Ugandan honeybee colony. *Springer Plus*, 5:1090. doi 10.1186/s40064-016-2767-3.

- Dingmann, D.W. & D. P. Stahly. (1983). Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Applied and Environmental Microbiology*, 46 (4), 860–869.
- Djordjevic, S.P., Noone, K., Smith, L. & M.A.Z. Hornitzky. (1998). Development of a semi nested PCR assay for the specific detection of *Melissococcus pluton*. *Journal of Apicultural Research*, 37, 165–174.
- Dobbelaere, W., DE Graaf, D.C., Peeters, J. E. & Jacobs. F.J. (2001). Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR. *Apidologie*, 32, 363–370.
- Dressler, R.L. (1982). Biology of the orchid bees (*Euglossini*). *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 13: 373-394.
- Espinosa, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: Eguiarte L, Souza V, Aguirre X editores. *Ecología molecular*. México: INE, CONABIO y UNAM, p.520-36.
- FAO. (2015). Productos apícolas: nutren y generan ingresos - abejas productoras de miel, apicultura y productos apícolas en nuestras vidas cotidianas. Disponible en (http://www.fao.org/fsnforum/sites/default/files/files/118_Beekeeping/SUMMARY_ES_Beekeeping.pdf) (Consultado el 4 de enero del 2015).
- Formato, G., Giacomelli, A., Nisi. A., Bassi. S., Pongolini. S., Carra. E. & S. Saccares. (2009). Sanitization of European Foulbrood through different beekeeping practices. *Apimondia*. Instituto Zooprofilattico perimentale delle Regioni Lazio e Toscana (Italy). 15-20 p.
- Forsgren, E. (2010). European foulbrood in honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103 (1):5-9.

Forsgren, E., Budge, G.E., Charrière, J.D. & M. A.Z. Hornitzky. (2013). Standard methods for European Foulbrood Research. *Journal of Apicultural Research*, 52 (1): 1-14. doi: 10.3896/IBRA.1.52.1.12.

Forsgren, E., Budge, G.E., Charrière, J.D. & M A. Z Hornitzky. (2015). Standard methods for European Foulbrood research. *Journal of Apicultural Research*, 52: (1), 1-14. doi: 10.3896/IBRA.1.52.1.12.

Genersch, E. (2010). American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal Invertebrate Pathology*, 103: 10–19.

Gende, L.B., Eguaras, M.J. & R. Fritz. (2008). Evaluation of culture media for *Paenibacillus larvae* applied to studies of antimicrobial activity. *Revista Argentina de Microbiología*, 40: 147-150.

Gilliam, M. & J. Vandenberg. (1997). *Honeybee Pest, Predators and diseases*. In: Morse, R.A. & R. Nowogrodzki (Eds). Cornell University Press (718 pp). Ithaca, NY, USA.

Goodman, R., McKee, B. & Kaczynski, P. (2004). European Foulbrood: Investigating control measures. Rural Industries Research and Development Corporation. All rights reserved. Publication No 04/092 RIRDC Project No DAV 157A. 122 p.

Govan, V.A., Brozel, V., Allsopp, M.H. & Davison, S. (1998). A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 1983–1985.

Gramacho, K. & L. Gonçalves. (2009). Sequential hygienic behavior in Carniolan honey bees (*Apis mellifera carnica*). *Genetic. Molecular Research*, 8 (2): 655-663.

Guevara, P. (2004). Identificación y Diagnóstico Molecular de Microorganismos. En: Manual de laboratorio. Proyecto Iniciativa Científica del Milenio. Red de Innovación Tecnológica IDMM editores. Venezuela. 1-102 p.

Hansen, H. & C.J. Brodsgaard (1999). American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World*, 80(1): 5–23.

Haynes, W.C. (1972). The catalase tests an aid in the identification of *Bacillus larvae*. *American Bee Journal*, 112: 130–131.

Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Janssen, P., Kersters, K., De Vos, P., Logan, N.A., Ali, N. & R.C.W. Kerkeley. (1996). Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash *et al.* 1993, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash *et al.* 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46: 270-279.

Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. White T. J. (1990). PCR Protocols. Academic Press Inc. Estados Unidos.

Kearns, C., D. Inouye. & N. Waser. (1998). Endangered mutualisms: The conservation of plant pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29:83-112.

Lauro, F.M., M. Favaretto., L. Covolo., M. Rassa. & G. Bertoloni. (2003). Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 195–201.

Leninger A. L. (1975). Biochemistry. Worth Publishers, New York, EE.UU. Murray M. G. y W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8: 4321-4326.

Lesser, R. (2001). Manual de Apicultura Moderna. Editorial Universitaria. Chile. 224p.

Louie, M., Louie, L. & A.E. Simor (2000). The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *Canadian Medical Association Journal*, 163: 301–309.

Lloyd, J. (1986). Simplified laboratory diagnosis of American Foulbrood disease. *Journal of Apicultural Research*, 25 (1): 55-57.

Machová, M. (1993). Resistance of *Bacillus larvae* in bees wax. *Apidologie*, 24: 25-31.

McKee, B.A., Djordjevic, S.P., Goodman, R. D. & M.A. Hornitzky. (2003). The detection of *Melissococcus pluton* in honey bees (*Apis mellifera*) and their products using a hemi-nested PCR. *Apidologie*, 34, 19–27.

Michael, A.S. (1957). Droplet method for observation of living unstained bacteria. *Journal of Bacteriology*, 74: 831–832.

OIE (2006). Validación y control de calidad de los métodos de reacción en cadena de la polimerasa utilizados para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. En: Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. OIE; Paris, Francia, pp 25-32 (Capítulo 1.1.3):

OIE (2008_{1a}). European foulbrood of the honey bees. In: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees), sixth ed., vol. 1. OIE, Paris, France, pp. 405–409 (Chapter 9.3).

OIE (2008_{2a}). American Foulbrood. In: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees), vol. 1 (Sixth Edition). OIE; Paris, France. 395-404 pp (Chapter 2.2.2).

OIE (2011_{1b}). European Foulbrood. In: OIE Terrestrial animal health code, vol. 2 (20 th Ed.). OIE; France. 507-508 pp (Chapter 9.3).

OIE (2011_{2b}). American Foulbrood. In: OIE Terrestrial Animal Health Code, vol. 2 (Twentieth Edition). OIE; Paris, France.504-506 pp (Chapter 9.2).

Okumura, K., Arai, R., Okura, M., Kirikae, T., Takamatsu, D., Makoto, O. & Miyoshi-Akiyama, A. (2011). Complete genome sequence of *Melissococcus plutonius* ATCC 35311. *Journal of Bacteriology*, 193:4029–4030. doi:10.1128/JB.05151-11.

Oliveira, A., Leite, M., Leon -Kluskens, D., Santos, S., Melo, L. & J. Azeredo. (2015). The First *Paenibacillus larvae* Bacteriophage Endolysin (PlyPl23) with High Potential to Control American Foulbrood. *PLoS ONE* 10 (7): 1-16. doi: 10.1371/journal.pone.

Piccini, C., D'Alessandro, B., Antunez, K. & P. Zunino. (2002). Detection of *Paenibacillus larvae* subsp. Larva spores in naturally infected bee larvae and artificially contaminated honey by PCR. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18: 761–765.

Ritter, W. (2003). Early detection of American Foulbrood by honey and wax analysis. *Apiacta*, 38, 125–130.

Rochelle, P.A., De Leó, R., Stewart., M.H. & Wolfe, R.L. (1997). Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. *Applied Environmental Microbiology*, 63:106-14.

Rodríguez, I. & Barrera, H. (2004). La Reacción en Cadena de la Polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, 7: 323-35.

Rose, T., Henikoff, J. & S. Henikoff. (2003). CODEHOP (Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Research*, 31(13): 3763-3766.

Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sanger, F., Nicklen, S. & A. R. Coulson. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74:5463–5467.

Sota, M. & M. Bacci. (2005). Enfermedades de las abejas. Dirección Nacional de Sanidad Animal. Buenos Aires. 12p.

Takamatsu, D., Arai, R., Miyoshi-Akiyama, T., Okumura, K., Okura, M., Kirikae, T., Kojima, A. & O. Makoto. (2013). Identification of mutations involved in the requirement of potassium for growth of typical *Melissococcus plutonius* strains. *Applied Environment Microbiology*, 79: 3882–3886. doi: [10.1128/AEM.00598-13](https://doi.org/10.1128/AEM.00598-13)

Yin, S., Yang, S., Shang, Y., Cai, X. & X. Liu. (2012). Development and optimization of multiplex-PCR for simultaneous detection of porcine pseudo-rabies virus, porcine parvovirus and porcine circovirus type 2. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 10 (2): 169-75.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Cantidades e ingredientes para la elaboración del medio de cultivo J para el cultivo de Loque Europea según la OIE, 2008.

Reactivos	1 Litro	250 ml	100 ml
Extracto de levadura	10 gr	2.5 gr	1 gr
Cisteína	1 gr	0.25 gr	0.1 gr
Glucosa	10 gr	2.5 gr	1 gr
Almidón soluble	10 gr	2.5 gr	1 gr
KH ₂ PO ₄ (1molar)	100 gr	25gr	10 gr
Agar	20 gr	5 gr	2 gr

Anexo 2. Cantidades e ingredientes para la elaboración del medio de cultivo MYPGP para el cultivo de Loque Americana según la OIE, 2008.

Reactivos	1 litro	250 ml	100 ml
Triptona	5 gr	1.25 gr	0.5 gr
Extracto de levadura	15 gr	3.75 gr	1.5 gr
KH ₂ PO ₄	3 gr	0.75 gr	0.3 gr
Agar	20 gr	5 gr	2 gr
**Glucosa filtrada al 10%	20ml	5ml	2ml

Anexo 3. Programa de ciclaje inicial utilizado en ensayos anteriores para la amplificación de *M. plutonius*.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	1 min	1
Desnaturalización	93°C	1 min	
Alineamiento	55°C	30 s	30
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	5 min	1
Almacenamiento	4°C	∞

Anexo 4. Programa de ciclaje inicial utilizado en ensayos anteriores para la amplificación de *P. larvae*.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	1-15 m	1
Desnaturalización	93°C	1 m	30
Alineamiento	55°C	30 s	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	5 min	1
Almacenamiento	4°C	∞

ANEXO 5

**Preparación del medio de J para el aislamiento de
Melissococcus plutonius y medio MYPGP para
*Paenibacillus larvae***

	LANASEVE	Rige a partir de:	Código:
	Preparación del medio de J para el aislamiento de <i>Melissococcus plutonius</i> y medio MYPGP para <i>Paenibacillus larvae</i>	Versión	Página- 1 - de 4
Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:	

1. Procedimiento para la preparación del medio de J para el cultivo de *Melissococcus plutonius* (Loque Europea)

Materiales y reactivos

- Extracto de levadura
- Cisteína.
- Glucosa.
- Almidón soluble.
- Fosfato de potasio KH_2PO_4 (1 molar).
- Agar.
- Agua estéril.
- Placas estériles.
- Erlenmeyer de 500 ml (con agitador magnético).
- Autoclave.
- pH- metro.
- Balanza.
- Balanza analítica.
- Cámara de flujo laminar.

2. Descripción del Procedimiento:

Todo el procedimiento y manipulación del medio deberá seguirse guardando las normas de esterilidad adecuadas según la normativa indicada en el documento de Buenas prácticas de Laboratorio DV-LSE-PE-002. Prepare la cantidad de medio de acuerdo a la cantidad de placas que se vayan a utilizar (Anexo 1).

	LANASEVE	Rige a partir de:	Código:
	Preparación del medio de J para el aislamiento de <i>Melissococcus plutonius</i> y medio MYPGP para <i>Paenibacillus larvae</i>	Versión	Página- 2 - de 4
Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:	

Preparación del medio para 250ml:

- 2.1 Preparar el medio siguiendo la receta descrita en el anexo 1 en una cámara de flujo laminar.
- 2.2 Ajustar el pH de la mezcla a 6.6. Tapar el beaker con papel aluminio y seguir disolviendo hasta que el medio comience a hervir.
- 2.3 Autoclavar el medio a 116°-121°C por 20 minutos.
- 2.4 Verter aproximadamente entre 15-20 ml del medio en las placas petri estériles.
- 2.5 Dejar enfriar a temperatura de ambiente hasta que el medio se solidifique.
- 2.6 Colocar las placas en bolsas plásticas debidamente identificadas, las mismas pueden almacenarse en un refrigerador con una temperatura entre 7-8 °C por aproximadamente un mes.

3. Procedimiento para la preparación del medio de MYPGP para el cultivo de *Paenibacillus larvae* (Loque Americana)

Reactivos y Materiales

- Triptona
- Extracto de levadura.
- Fosfato de potasio KH₂PO₄.
- Agar
- Glucosa filtrada al 10%.
- Erlenmeyer de 500 ml (con agitador magnético).
- Autoclave.
- pH-metro.
- Balanza
- Balanza analítica.
- Jeringas de 5 ml.
- Filtros estériles para jeringa.
- Cámara de flujo laminar.

	LANASEVE	Rige a partir de:	Código:
	Preparación del medio de J para el aislamiento de <i>Melissococcus plutonius</i> y medio MYPGP para <i>Paenibacillus larvae</i>	Versión	Página- 3 - de 4
Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:	

- Beaker de 50 ml.
- Probeta de 10 ml

4. Descripción del Procedimiento:

Todo el procedimiento y manipulación del medio deberá seguirse guardando las normas de esterilidad adecuadas según la normativa indicada en el documento de Buenas prácticas de Laboratorio DV-LSE-PE-002. Prepare la cantidad de medio de acuerdo a la cantidad de placas que se vaya a utilizar (Anexo 2).

Preparación del medio para 250ml:

- 4.1 Preparar el medio siguiendo la receta descrita en el anexo 1m en una cámara de flujo laminar.
- 4.2 Ajustar el pH de la mezcla a 7.3-7.5. Tapar el beaker con papel aluminio y seguir disolviendo hasta que el medio comience a hervir.
- 4.3 Autoclavar el medio a 121°C por 20 minutos.
- 4.4 Enfriar hasta que el medio alcance una temperatura aproximada de 50°C y 45°C agregar 5 ml de glucosa filtrada.
- 4.5 La glucosa filtrada se prepara dentro de la cámara de flujo laminar adicionando y mezclando en un beaker 10 ml de agua estéril y 1 gramo de glucosa. Se coloca el filtro estéril en la jeringa de 5 ml.
- 4.6 Verter dentro de la cámara de flujo laminar aproximadamente entre 15-20 ml del medio en las placas petri estériles
- 4.7 Dejar enfriar a temperatura de ambiente hasta que el medio se solidifique.
- 4.8 Colocar las placas en bolsas plásticas debidamente identificadas y guardarlas en un refrigerador a una temperatura entre 7-8 °C por aproximadamente un mes.

	LANASEVE	Rige a partir de:	Código:
	Preparación del medio de J para el aislamiento de <i>Melissococcus plutonius</i> y medio MYPGP para <i>Paenibacillus larvae</i>	Versión	Página- 4 - de 4
Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:	

5. Anexos

Anexo 1. Preparación del medio de cultivo para el aislamiento de *Melissococcus plutonius* (Loque Europea) (medio J).

Reactivos	1 litro	250 ml	100 ml
Extracto de levadura	10 gr	2.5 gr	1 gr
Cisteína	1 gr	0.25 gr	0.1 gr
Glucosa	10 gr	2.5 gr	1 gr
Almidón soluble	10 gr	2.5 gr	1 gr
KH ₂ PO ₄ (1molar)	100 gr	25gr	10 gr
Agar	20 gr	5 gr	2 gr

Anexo 2. Preparación del medio de cultivo para el aislamiento de *Paenibacillus larvae* (Loque Americana) (medio MYPGP).

Reactivos	1 litro	250 ml	100 ml
Triptona	5 gr	1.25 gr	0.5 gr
Extracto de levadura	15 gr	3.75 gr	1.5 gr
KH ₂ PO ₄	3 gr	0.75 gr	0.3 gr
Agar	20 gr	5 gr	2 gr
**Glucosa filtrada al 10%	20ml	5ml	2ml

ANEXO 6

**Aislamiento de *Melissococcus plutonius* y
*Paenibacillus larvae***

	LANASEVE	Rige a partir de:	Código: DV-LSE - PT-002-IN-001
	Aislamiento de <i>Melissococcus plutonius</i> y <i>Paenibacillus larvae</i>	Versión1	Página- 1 - de 7
Elaborado por: Analista de Laboratorio	Revisado por: Jefe de área de Laboratorio		Aprobado por: Jefe de Sección

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Cultivo anaeróbico de bacterias

1. Cultivo para el agente causal de la Loque Europea (*Melissococcus plutonius*) en medio J

- 1) Tomar larvas con sintomatología o intestinos medios de larvas muertas con una pinza estéril.
- 2) Macerar las larvas sospechosas (o intestinos) en agua estéril y con la ayuda de una aguja bacteriológica tomar una asada y rayar la placa debidamente identificada.
- 3) Cultivar en las placas un control positivo con la cepa de referencia en paralelo con las muestras sospechosas, un control negativo (una placa sin rayar para garantizar que el medio funcione correctamente).
- 4) Introducir las placas en jarras para anaerobiosis y colocar dentro de ella (s) un sobre de Anaero Gen (Oxoid) 2.5 L para mantener una atmósfera aproximadamente 5-10% de CO₂.
- 5) Incubar a 35°C ± 2°C por 4-5 días.
- 6) Examinar las placas después del tiempo de incubación.
- 7) Lectura de las placas:
 - ✓ Si no hay crecimiento en las placas reportar como ausencia de crecimiento.
 - ✓ Colonias que aparecen antes de los días de incubación establecido pueden deberse a contaminación o algunas bacterias asociadas con la Loque Europea.
 - ✓ Si hay crecimiento, se debe observar la presencia de colonias pequeñas, de color blanco opaco, transparentes, perladas y sin producción de esporas (Anexo 1).
- 8) Se recomienda realizar una tinción de Gram y la PCR (KC.05) para verificar la presencia de *M. plutonius*. La presencia de numerosos estafilococos, lanceolados, de aproximadamente 0,5-10 µm de tamaño, que se presentan individualmente o en grupos, en pares o cadenas cortas. Esta bacteria es en cierto modo pleomórfica *in vitro*, apareciendo con frecuencia en forma de bacilo (Anexo 2 y 3).

	LANASEVE	Rige a partir de:	Código: DV-LSE - PT-002-IN-001
	Aislamiento de <i>Melissococcus plutonius</i> y <i>Paenibacillus larvae</i>	Versión1	Página- 2 - de 7
Elaborado por: Analista de Laboratorio		Revisado por: Jefe de área de Laboratorio	Aprobado por: Jefe de Sección

2. Cultivo para el agente causal de la Loque Americana (*Paenibacillus larvae*) en medio MYPGP

- 1) Antes de realizar el cultivo se toman las larvas con sintomatología y se colocan en 90ml de agua peptonada estéril, se hierve durante 10 minutos a una temperatura de 70°C para garantizar la presencia de esporas de *P. larvae*. Se deja enfriar.
- 2) Posteriormente se toma una asada de esta muestra y se raya en las placas con medio MYPGP, con su respectivo control positivo y negativo.
- 3) Introducir las placas en jarras para anaerobiosis y colocar dentro de ella (s) un sobre de CO₂ Gen (Oxoid) para mantener las condiciones adecuadas de anaerobiosis. Puede utilizar una candela.
- 4) Incubar a 35°C ± 2°C por 3-4 días. A partir del cuarto día se puede observar el crecimiento de bacterias y después del 5^{to} día la presencia de esporas.
- 5) Lectura de las placas:
 - ✓ Si no hay crecimiento en las placas reportar como ausencia de crecimiento.
 - ✓ Colonias que aparecen antes de los días de incubación pueden deberse a contaminación.
 - ✓ Si hay crecimiento, las colonias son pequeñas, regulares, rugosas, planas o elevadas, de color entre blanquecino-beige, productoras de esporas y catalasa negativa (Anexo 4).
- 6) Se recomienda realizar una tinción de Gram y la PCR (KC.05) para verificar la presencia de *P. larvae*. A nivel microscópico se observan bacilos Gram positivos con extremos redondeados, rectos o curvos, de tamaño variado, presentándose en cadenas o filamentos (Anexo 5).

3. Referencias

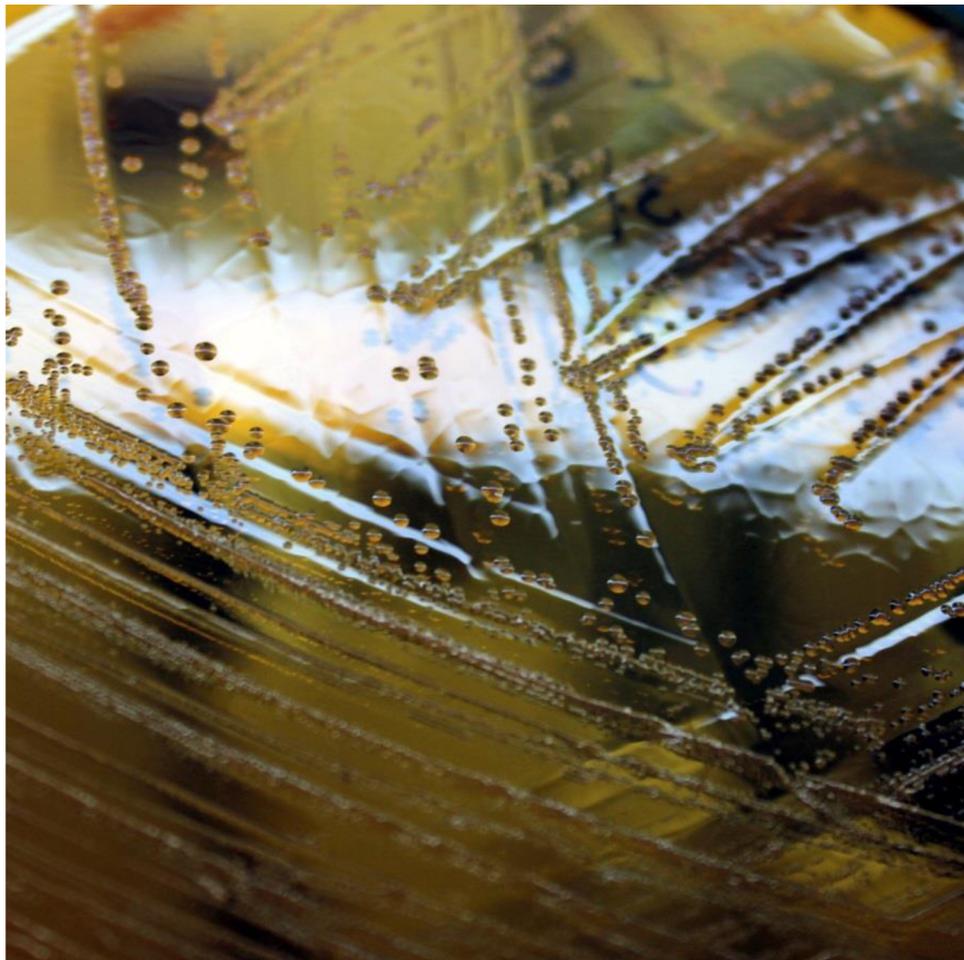
Bailey L. (1984). A strain of *Melissococcus pluton* cultivable on chemically defined media. *FEMS Microbiol.Lett.*,25, 139–141.

Bailey L. &Ball, B.V. (1991). Honey Bee Pathology. Academic Press, London, UK, and New York, USA.

OIE. (2008). *Loque Americana de las abejas melíferas*. Manual de la OIE sobre animales terrestres.1-11 pág.

	LANASEVE	Rige a partir de:	Código: DV-LSE - PT-002-IN-001
	Aislamiento de <i>Melissococcus plutonius</i> y <i>Paenibacillus larvae</i>	Versión1	Página- 3 - de 7
Elaborado por: Analista de Laboratorio	Revisado por: Jefe de área de Laboratorio		Aprobado por: Jefe de Sección

4. Anexos

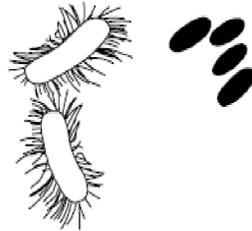


Anexo 1. Aislado de *M. plutonius*, inoculado en medio J y utilizado como control positivo.

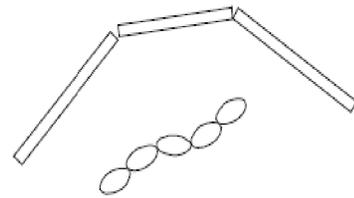
	LANASEVE	Rige a partir de:	Código: DV-LSE - PT-002-IN-001
	Aislamiento de <i>Melissococcus plutonius</i> y <i>Paenibacillus larvae</i>	Versión1	Página- 4 - de 7
Elaborado por: Analista de Laboratorio	Revisado por: Jefe de área de Laboratorio		Aprobado por: Jefe de Sección



a



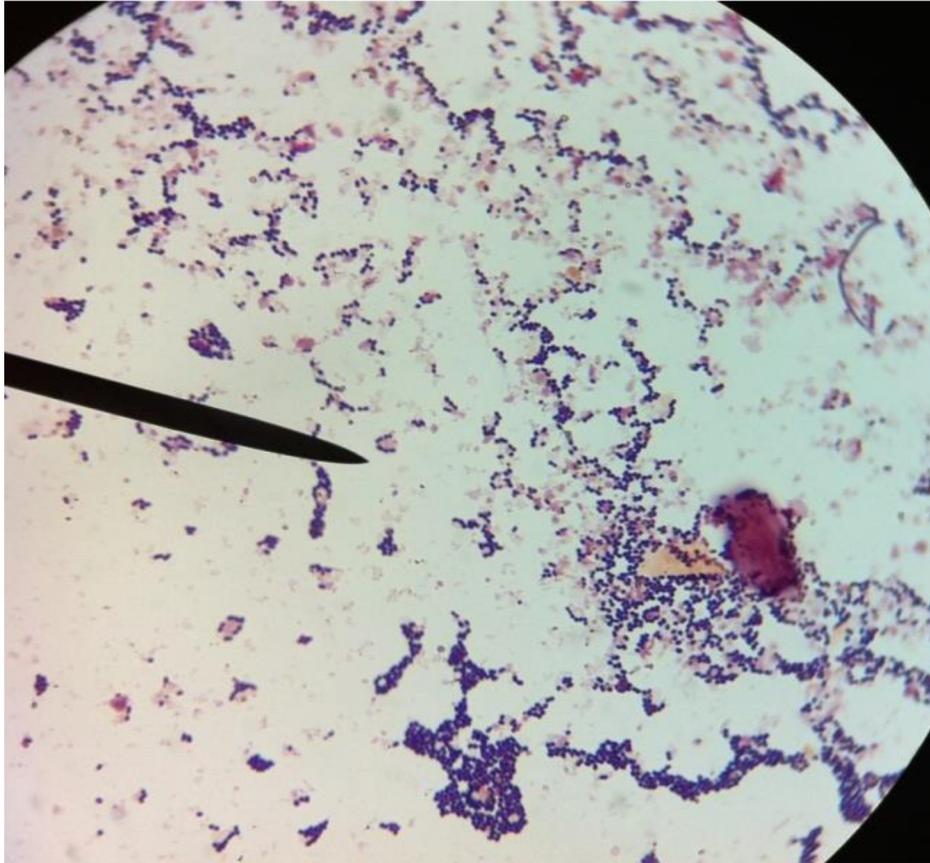
b



c

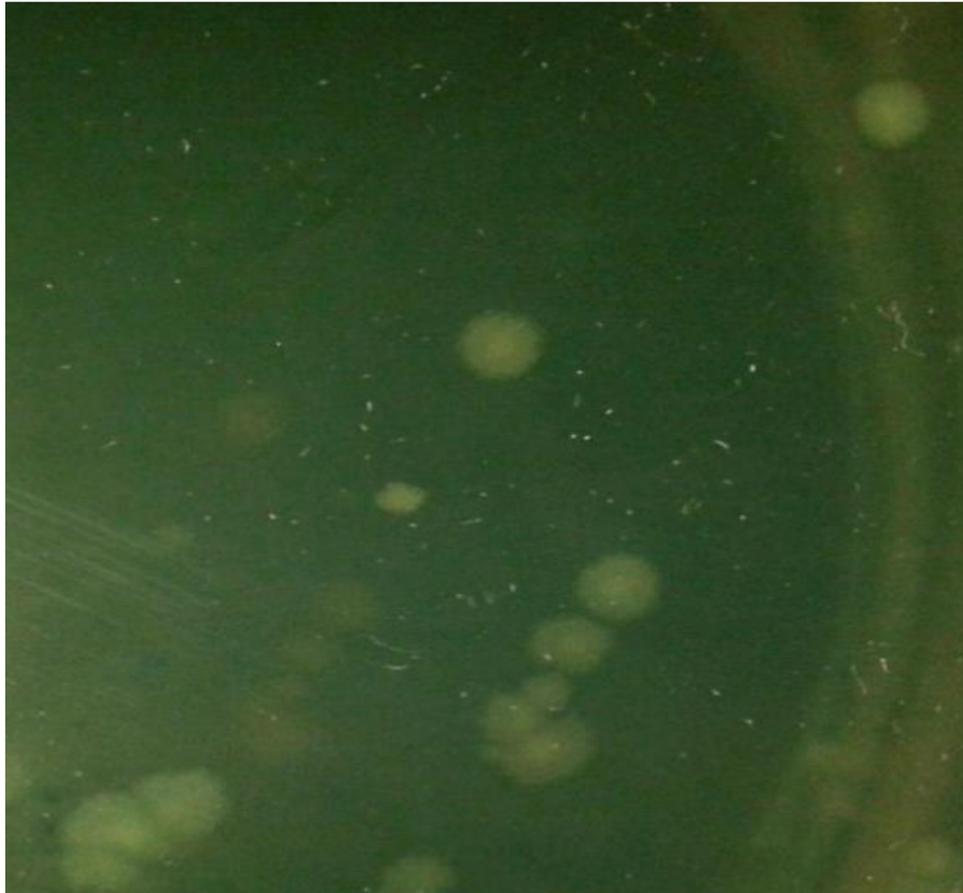
Anexo 2. Morfología de *M. plutonius* y de bacterias asociadas con este patógeno. a). ***Melissococcus plutonius***: Causante de la Loque europea. Se presenta individualmente, en cadenas longitudinales o en grupos. Morfológicamente se parece a *Enterococcus faecalis*, un invasor secundario frecuente. b). ***Paenibacillus alvei***: Bacilos vegetativos 2.0—7.0 × 0.8—1.2 μm con flagelos; esporulación con esporas adyacentes. Los bacilos y las esporas son más largos que los de *Paenibacillus larvae* (ver Loque americana). c). ***Bacterium eurydice***: Bacilos delgados y rectangulares in vivo que pueden formar cadenas de estafilococos in vitro en algunos medios.

	LANASEVE	Rige a partir de:	Código: DV-LSE - PT-002-IN-001
	Aislamiento de <i>Melissococcus plutonius</i> y <i>Paenibacillus larvae</i>	Versión1	Página- 5 - de 7
Elaborado por: Analista de Laboratorio	Revisado por: Jefe de área de Laboratorio		Aprobado por: Jefe de Sección



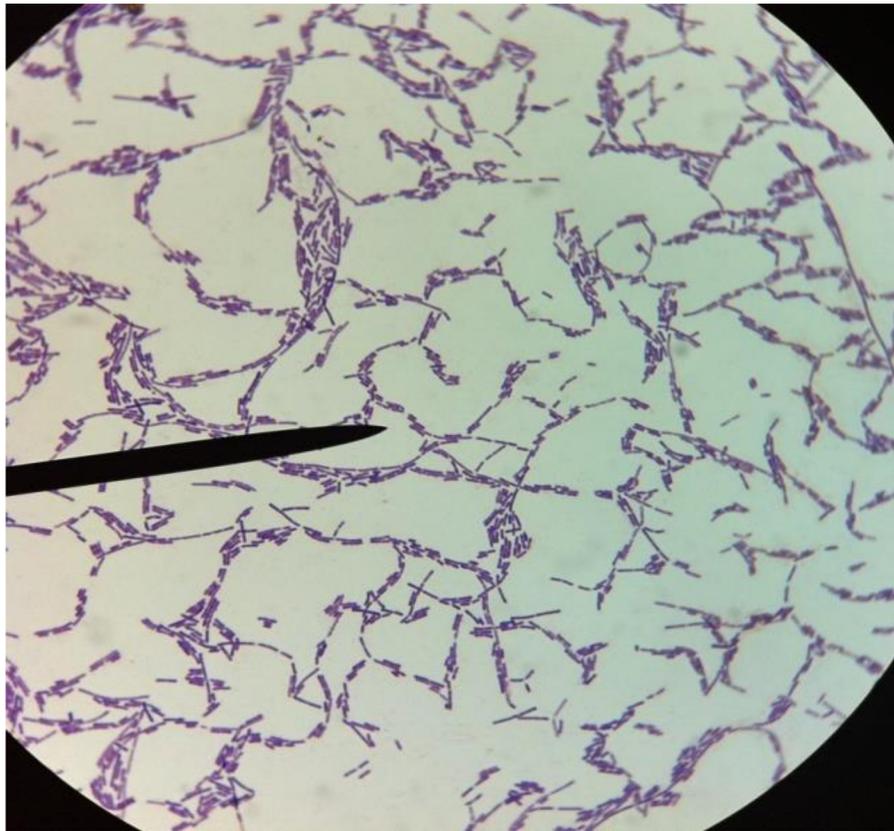
Anexo 3. Cocos gram positivos de *Melissococcus plutonius*: La causante de la Loque Europea.

	LANASEVE	Rige a partir de:	Código: DV-LSE - PT-002-IN-001
	Aislamiento de <i>Melissococcus plutonius</i> y <i>Paenibacillus larvae</i>	Versión1	Página- 6 - de 7
Elaborado por: Analista de Laboratorio	Revisado por: Jefe de área de Laboratorio		Aprobado por: Jefe de Sección



Anexo 4. Loque Americana en medio MYPGP.

	LANASEVE	Rige a partir de:	Código: DV-LSE - PT-002-IN-001
	Aislamiento de <i>Melissococcus plutonius</i> y <i>Paenibacillus larvae</i>	Versión1	Página- 7 - de 7
Elaborado por: Analista de Laboratorio	Revisado por: Jefe de área de Laboratorio		Aprobado por: Jefe de Sección



Anexo 5. Bacilos gram positivos de *Paenibacillus larvae*: La causante de la Loque Americana.

ANEXO 7

PCR para la detección de Loque Europea

Melissococcus plutonius

	LANASEVE	Rige a partir de:	Código:
	PCR para la detección de Loque Europea <i>Melissococcus plutonius</i>	Versión	Página 1 de 4
Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:	

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

PREPARACION DE LA MUESTRA

Larvas

Tomar larvas enfermas con una pinza estéril.

Colocarlas en un vial de 5 ml y macerar con un pistilo en 200 µl de agua estéril.

Congelar a -20°C.

Líquidos y suspensiones.

Se toman 200 µl de la suspensión.

Extracción del ácido nucleíco

Se utiliza el protocolo del kit de extracción QIAamp DNA Mini Kit para bacterias gram positivas:

1. Centrifugar los viales durante 10 min a 5.000 g (7.500 rpm).
2. Descartar el sobrenadante y utilizar el pelet.
3. Preparar una solución enzimática con lisozima (20 mg/ml lisozima, 20 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 2 Mm de EDTA; 1,2% de Triton).
4. Adicionar al pelet 180 µL de la solución enzimática y agitar con un vórtex.
5. Incubar las muestras durante 30 min a 37°C.
6. Añadir a cada tubo 20 µL de proteínasa K y 200 µL del búfer AL. Agitar las muestras e inmediatamente realizar dos incubaciones, la primera a 56 °C durante 30 min y la segunda a 95 °C durante 15 min.
7. Centrifugar las muestras durante 30 s. Luego añadir 200 µL de etanol (96-100%), agitar por 5 s y nuevamente centrifugar de forma breve para remover las gotas del interior de la tapa.
8. Utilizar columnas con filtro QIAamp Mini spin de 2 mL y tubos colectores. A cada columna adicionar la mezcla del paso anterior y luego centrifugar en una centrifuga a 6000 g (8000 rpm) durante 1 min.

	LANASEVE	Rige a partir de:	Código:
	PCR para la detección de Loque Europea <i>Melissococcus plutonius</i>	Versión	Página 1 de 4
Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:	

9. Colocarlas columnas en un tubo colector limpio, desechar el tubo colector anterior, y añadir 500 µL del Buffer AW1.
10. Centrifugar las muestras a 6000 g (8000 rpm) durante 1 min.
11. Volver a transferir las columnas a un nuevo tubo colector y añadir 500 mL del buffer AW2.
12. Centrifugar nuevamente a 20.000 xg (14.000 rpm) durante 3 min.
13. Eliminar los residuos del buffer AW2 colocar las columnas en un nuevo tubo colector y centrifugar durante 1 min a máxima velocidad.
14. Colocar las columnas en un tubo para microcentrifuga de 1,5 mL, añadir 200 µL del Buffer de elución AE y dejar a temperatura ambiente durante 1 min y centrifugar las columnas a 6.000 g (8.000 rpm) durante 1 min.
15. Retirar las columnas y almacenar el ADN extraído en el filtrado en un congelador a -20 °C.

Controles

Deben incluirse controles de extracción control positivo, control negativo y control de extracción.

Primers:

Iniciador en sentido 5' - CTT TGA ACG CCT TAG AGA -3'

Iniciador anti-sentido 5' - TTA ACC TCG CGG TCT TGC GTC TCT C-3'

Preparación de la muestra:

Para la preparación de la mezcla de los reactivos se utiliza el registro DV-LSE-PT-003-RE-003, de acuerdo a las siguientes cantidades en la estación de PCR A.

Colocar los 3 µl de muestra de ADN en la estación de PCR identificada con una B. Antes de dispensar la muestra debe de homogenizarse con un vortex, una vez agregada la muestra el vial debe centrifugarse.

	LANASEVE	Rige a partir de:	Código:
	PCR para la detección de Loque Europea <i>Melissococcus plutonius</i>	Versión	Página 1 de 4
Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:	

Reactivo	Conc. Stock	Conc. trab.	Volumen 13.5µl
			10.5µl + 3µl ADN
Agua	--	--	3,21
Maxima HotStart Green Master Mix	2X	1X	6,75
Primer PIF FWW	25 µM	0,5 µM	0,27
Primer PIF REV	25 µM	0,5 µM	0,27
Muestra ADN	--	--	3

Encender el termociclador.

Programa protocolo de ciclado PCR *Melissococcus plutonius*:

Programa(s): Loque europea	
95 °C	10 min
95 °C	15seg
*58 °C	30 seg
72 °C	45 seg
72 °C	5 min
4 °C	∞

} Ciclos

Realización de la electroforesis en gel de agarosa y visualización de los amplicones generados.

1. Preparar la cámara de electroforesis depositando los peines de acuerdo al número de muestras que se desea correr en el gel de agarosa.
2. Utilizando el buffer TBE 1 X prepare un gel de agarosa al 2 %. Para ello coloque en un Erlenmeyer de 250 ml, 45 ml de agua destilada y 5 ml de buffer TBE 10 X, posteriormente agregue 1 g de agarosa.
3. Lleve la mezcla a un horno de microondas y programe el encendido del horno por aproximadamente 1 minuto para calentar la solución hasta observar que toda la agarosa esté completamente disuelta.
4. Permitir que la solución esté a una temperatura aproximada de 40°C a 45°C agregue 3 µl de gel red para geles de 50 ml y deposite en la cámara de electroforesis. coloque los peines (SCG-1427, 1mm) y espere a su solidificación y desprenda el peine del gel solidificado.

	LANASEVE	Rige a partir de:	Código:
	PCR para la detección de Loque Europea <i>Melissococcus plutonius</i>	Versión	Página 1 de 4
Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:	

5. Agregue el buffer TBE 1X al tanque de la cámara de electroforesis hasta que la cantidad de buffer cubra completamente el gel.
6. Tome 2 µL de la mezcla de reacción y deposítelo en el respectivo pozo del gel de agarosa.
7. Por último, tome 0.6 µl del marcador de peso molecular de 50pb y deposítelo en el primer pozo del gel de electroforesis.
8. Tapar la cámara de electroforesis y conectar a la fuente de poder. La electroforesis del gel se realiza a un voltaje constante de ~ 100-110 volts.
9. Correr el gel por 60 min.
10. Apagar la fuente de poder, destape la cámara y saque el gel, eliminando los residuos de solución.
11. Para visualizar los amplicones generados en la reacción de PCR, deposite el gel en el foto- documentador de geles, use DV-LSE-PT-001-IN-003 Instructivo del Documentador de Geles y LANASEVE-PG-005-RE-006 control de uso de los equipos.
12. El Tamaño del fragmento es de 272 pb.

ANEXO 8

PCR para la detección de Loque Americana

Paenibacillus larvae

	LANASEVE	Rige a partir de:	Código:
	PCR para la detección de Loque Americana <i>Paenibacillus larvae</i>	Versión	Página- 1 -de 4
Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:	

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

PREPARACION DE LA MUESTRA

Larvas

Tomar larvas enfermas con una pinza estéril.

Colocarlas en un vial de 5 ml y macerar con un pistilo en 200 µl de agua estéril.

Congelar a -20°C.

Líquidos y suspensiones.

Se toman 200 µl de la suspensión.

Extracción del ácido nucleico

Se utiliza el protocolo del kit de extracción QIAamp DNA Mini Kit para bacterias gram positivas:

1. Centrifugar los viales durante 10 min a 5.000 g (7.500 rpm).
2. Descartar el sobrenadante y utilizar el pelet.
3. Preparar una solución enzimática con lisozima (20 mg/ml lisozima, 20 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 2 Mm de EDTA; 1,2% de Triton).
4. Adicionar al pelet 180 µL de la solución enzimática y agitar con un vórtex.
5. Incubar las muestras durante 30 min a 37°C.
6. Añadir a cada tubo 20 µL de proteínasa K y 200 µL del búfer AL. Agitar las muestras e inmediatamente realizar dos incubaciones, la primera a 56 °C durante 30 min y la segunda a 95 °C durante 15 min.
7. Centrifugar las muestras durante 30 s. Luego añadir 200 µL de etanol (96-100%), agitar por 5 s y nuevamente centrifugar de forma breve para remover las gotas del interior de la tapa.
8. Utilizar columnas con filtro QIAamp Mini spin de 2 mL y tubos colectores. A cada columna adicionar la mezcla del paso anterior y luego centrifugar en una centrifuga a 6000 g (8000 rpm) durante 1 min.

	LANASEVE	Rige a partir de:	Código:
	PCR para la detección de Loque Americana <i>Paenibacillus larvae</i>	Versión	Página- 2 -de 4
Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:	

9. Colocar las columnas en un tubo colector limpio, desechar el tubo colector anterior, y añadir 500 µL del Buffer AW1.
10. Centrifugar las muestras a 6000 g (8000 rpm) durante 1 min.
11. Volver a transferir las columnas a un nuevo tubo colector y añadir 500 mL del buffer AW2.
12. Centrifugar nuevamente a 20.000 xg (14.000 rpm) durante 3 min.
13. Eliminar los residuos del buffer AW2 colocar las columnas en un nuevo tubo colector y centrifugar durante 1 min a máxima velocidad.
14. Colocar las columnas en un tubo para microcentrifuga de 1,5 mL, añadir 200 µL del Buffer de elución AE y dejar a temperatura ambiente durante 1 min y centrifugar las columnas a 6.000 g (8.000 rpm) durante 1 min.
15. Retiraron las columnas y almacenar el ADN extraído en el filtrado en un congelador a -20 °C.

Controles

Deben incluirse controles de extracción control positivo, control negativo y control de extracción.

Primers:

Iniciador en sentido 5´ - CTT GTG TTT CTT TCG GGA GAC GCC A-3

Iniciador anti-sentido 5´ - TCT TAG AGT GCC CAC CTC TGC G-3.

Preparación de la muestra:

La preparación de la mezcla de los reactivos se realiza en la campana de flujo laminar A y se utiliza el registro DV-LSE-PT-003-RE-003, de acuerdo a las siguientes cantidades:

Colocar los 2 µl de muestra de ADN extraído en la campana B y centrifugar. Encender el termociclador.

	LANASEVE	Rige a partir de:	Código:
	PCR para la detección de Loque Americana <i>Paenibacillus larvae</i>	Versión	Página- 3 -de 4
Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:	

Reactivo	Conc. Stock	Conc. trab.	Volumen 12,5µl
			10,5µl + 2µl ADN
Agua	--	--	3,75
Maxima HotStart Green Master Mix	2X	1X	6,25
Primer Pif_FWW	25 µM	0,5 µM	0,25
Primer Pif_BEV	25 µM	0,5 µM	0,25
Muestra ADN	--	--	2

Programa protocolo de ciclado PCR:

Programa(s): Loque Americana	
95 °C	10 min
95 °C	15seg
61 °C	30 seg
72 °C	45 seg
72 °C	5 min
4 °C	∞

Realización de la electroforesis en gel de agarosa y visualización de los amplicones generados

1. Preparar la cámara de electroforesis depositando los peines de acuerdo al número de muestras que se desea correr en el gel de agarosa.
2. Utilizando el buffer TBE 1 X prepare un gel de agarosa al 1 %. Para ello coloque en un Erlenmeyer de 250 ml, 45 ml de agua destilada y 5 ml de buffer TBE 10 X, posteriormente agregue 1 g de agarosa.
3. Lleve la mezcla a un horno de microondas y programe el encendido del horno por aproximadamente 1 minuto para calentar la solución hasta observar que toda la agarosa esté completamente disuelta.
4. Permitir que la solución esté a una temperatura aproximada de 40°C a 45°C agregue 3 µl de gel red para geles de 50 ml y deposite en la cámara de electroforesis. coloque los peines (SCG-1427, 1mm) y espere a su solidificación y desprenda el peine del gel solidificado.
5. Agregue el buffer TBE 1X al tanque de la cámara de electroforesis hasta que la cantidad de buffer cubra completamente el gel.
6. Tome 2 µL de la mezcla de reacción y deposítelo en el respectivo pozo del gel de agarosa.

	LANASEVE	Rige a partir de:	Código:
	PCR para la detección de Loque Americana <i>Paenibacillus larvae</i>	Versión	Página- 4 -de 4
Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:	

7. Por último, tome 0.6 µl del marcador de peso molecular de 100 pb y deposítelo en el primer pozo del gel de electroforesis.
8. Tapar la cámara de electroforesis y conectar a la fuente de poder. La electroforesis del gel se realiza a un voltaje constante de ~ 100-110 volts.
9. Correr el gel por 60 min.
10. Apagar la fuente de poder, destape la cámara y saque el gel, eliminando los residuos de solución.
11. Para visualizar los amplicones generados en la reacción de PCR, deposite el gel en el fotodocumentador de geles, use DV-LSE-PT-001-IN-003 Instructivo del Documentador de Geles y LANASEVE-PG-005-RE-006 control de uso de los equipos.
12. El Tamaño del fragmento es de 1106 pb.

ANEXO 9

Estándar de turbidez McFarland y límite de detección

	LANASEVE	Rige a partir de:	Código:
	Estándar de turbidez McFarland y límite de detección	Versión	Página - 1 - de 9
Elaborado por: Analista	Revisado por:	Aprobado por:	

1. Objetivo

Disponer los procedimientos por escrito acerca de la elaboración de los patrones de turbidez de McFarland con el fin de determinar la concentración de bacterias a través de diluciones bacterianas, especialmente de Loque Europea y Loque Americana.

2. Alcance

Aplica para todo el personal del laboratorio de Bioseguridad.

3. Definiciones

Recuento bacteriano: señala la magnitud de la población bacteriana mediante diversas técnicas como: conteo en caja de petri, conteo por filtración, método del número más probable (NMP), determinación directa por microscopio, método de turbidez, determinación del peso seco en las células.

Turbidez : falta de transparencia de líquido debido a la presencia de partículas en suspensión

4. Referencias

- Kimberley A. Whitman et al "Finfish and shellfish bacteriology manual: techniques and procedures" First Edition. United States. Wiley-Blackwell, 2004.
- Tortora, Gerard J (2004). *Microbiology "An Introduction"* (8va edición). Pearson Prentice Hall.

7. Abreviaturas y/o Siglas

UFC: unidades formadoras de colonias

8. Marco Teórico

Los estándares de turbidez de McFarland se utilizan como referencia en suspensiones bacteriológicas para cuantificar el número de bacterias por mililitro o UFC. La finalidad es establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana y con ello detectar la concentración de diluciones bacterianas. La escala se basa en la capacidad de precipitación del cloruro de bario en presencia de ácido sulfúrico. El estándar de McFarland más utilizado es al 0.5% y corresponde aproximadamente a una suspensión homogénea de 1.5×10^8 células bacterianas por ml.

	LANASEVE	Rige a partir de:	Código:
	Estándar de turbidez McFarland y límite de detección	Versión	Página - 2 - de 9
Elaborado por: Analista		Revisado por:	Aprobado por:

9. Materiales y reactivos

- Placas con colonias de Loque Europea y Loque Americana.
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1%.
- Cloruro de bario (BaCl₂) 1,175%.
- Tubos de vidrio con tapón de rosca autoclavados.
- Solución salina esteril 0,5%.
- Papel parafilm.
- Micropipetas 100-1000 µl.
- Pipeta volumétrica de 100 ml.
- Pipeteador automático.
- Agitador magnético o vortex.
- Pipetas de 10 ml.
- Balón aforado.
- Pipetas volumétricas de 1.0 ml.

10. Procedimiento

10.1 Preparación de reactivos.

Ácido Sulfúrico 1 %

- Adicionar aproximadamente 90 ml de agua desionizada en un balón aforado de 100 ml.
- Añadir 1,0 ml de H₂SO₄ al balón o matraz utilizando una pipeta volumétrica y ajustar el volumen a 100 ml.

Almacenar en una botella con tapón de rosca a 25°C por un año.

Cloruro de Bario 1,175%

- Pesar 1,175 gramos de BaCl₂ + 2H₂O y colocar en un balón aforado de 100 ml.
- Adicionar aproximadamente 50 ml de agua desionizada y mezclar bien para disolver.
- Llevar la mezcla a 100 ml con agua desionizada.
- Almacenar en una botella de vidrio con tapón de rosca a 25°C por un año.

	LANASEVE	Rige a partir de:	Código:
	Estándar de turbidez McFarland y límite de detección	Versión	Página - 3 - de 9
Elaborado por: Analista	Revisado por:	Aprobado por:	

10.2 Procedimiento para la preparación de un Standart McFarland de 0.5

- 10.2.1. Añadir aproximadamente 85 ml de ácido sulfúrico (1%) a un matraz aforado de 100 ml.
- 10.2.2. Con una pipeta volumétrica o una micropipeta añadir 0,5 ml de cloruro de bario (1,175%) gota a gota el ácido sulfúrico 1% y agitar constantemente.
- 10.2.3. Llevar el volumen a 100 ml con H₂SO₄ (1%).
- 10.2.4. Mezclar durante aproximadamente 3-5 minutos, hasta que la mezcla quede homogénea y libre de grumos. Utilizar un agitador magnético.
- 10.2.5. Continuar preparando los estándares restantes mediante las indicaciones descritas en el anexo 1. Las soluciones se preparan en un tubo cónico de 15 ml.
- 10.2.6. Medir la densidad óptica (DO) o absorbancia de cada estándar en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm. Anotar los resultados de turbidez.
- 10.2.7. Etiquetar todos los tubos y asegurarse de que el etiquetado no interfiera con las lecturas del espectrofotómetro.
- 10.2.8. Cubrir los tubos firmemente con papel aluminio.
- 10.2.9. Dibujar una línea para marcar el menisco en cada tubo. La marca se utiliza como guía para comprobar posteriormente la evaporación del líquido.
- 10.2.10. Sellar los tubos con parafina o parafilm.
- 10.2.11. Guardar los tubos preparados en la oscuridad a temperatura de ambiente durante 3 meses o más.
- 10.2.12. Calcular la cantidad de UFC/ml mediante una recta patrón. Utilizar los valores teóricos de UFC/ml del cuadro 1 y la absorbancia medida.

	LANASEVE		Rige a partir de:	Código:
	Estándar de turbidez McFarland y límite de detección		Versión	Página - 4 - de 9
Elaborado por: Analista		Revisado por:	Aprobado por:	

10.3. Control de calidad

10.3.1. Comprobar la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 625 nm y registrar los resultados. El rango aceptable para un estándar McFarland 0,5 es 0,08 a 0,10 DO.

10.3.2. Comprobar visualmente la evidencia de la formación de grumo y/o evaporación. Desechar el estándar con la presencia de estas características.

10.3.3. Comprobar la línea trazada para indicar la posición del menisco durante la preparación. Si se evidencia evaporación significativa descartar el tubo.

10.3.4. Comprobar la densidad óptica de un tubo o norma representativa (que no ha estado en uso) a los tres meses para determinar si la densidad óptica se encuentra todavía dentro de los límites. Realizar una verificación mensual hasta por un año.

10.4. Límite de detección

Una vez preparados los estándares de turbidez de McFarland con una concentración de UFC/mL conocida (Anexo 1), se debe de determinar los valores de absorción para cada uno de ellos y luego preparar una suspensión bacteriana. Posteriormente, se debe medir la densidad óptica de dicha suspensión y con ello establecer la concentración de bacterias expresadas en UFC/mL. El procedimiento se describe a continuación:

10.4.1. Tomar colonias de las placas y a partir de un cultivo puro fresco en fase exponencial realizar varias azadas.

10.4.2. Suspender las bacterias tomadas de las azadas en un tubo de 10 ml con solución salina estéril (0.85%) y homogenizar con un vortex.

10.4.3. Comparar la turbidez de la suspensión elaborada en el paso anterior con los patrones de McFarland preparados anteriormente.

	LANASEVE		Rige a partir de:	Código:
	Estándar de turbidez McFarland y límite de detección		Versión	Página - 5 - de 9
Elaborado por: Analista		Revisado por:	Aprobado por:	

10.4.4. Para comprobar la turbidez los tubos se deben sostener contra un fondo blanco con líneas negras horizontales de contraste. La distorsión de las líneas negras indica una turbidez similar en los tubos.

10.4.5. Si la suspensión se encuentra demasiado turbia se debe añadir solución salina 0.85%. Por el contrario si la suspensión no está lo suficientemente turbia se debe de agregar más colonias con un aza.

10.4.6. Medir la absorbancia o densidad óptica (DO) de la suspensión bacteriana preparada en un espectrofotómetro a 625 nm.

10.4.7. Con el valor de absorbancia obtenido y con la recta patrón creada establecer la concentración de UFC/mL de la suspensión

10.4.8. Una vez calculada la cantidad de UFC/mL en la muestra, preparar diluciones decimales hasta 10^{-10} en solución salina estéril. Seguidamente, a cada dilución se le realizará una extracción de ADN.

10.4.9. Luego realizar una PCR por duplicado para cada dilución y con ello se establecer el límite de detección.

10.4.10. Por último, de los productos de PCR seleccionar la dilución que presenta la banda de mayor intensidad (fuerte) y la banda de menor intensidad (débil) la cual representa la dilución mínima en la que se observó amplificación.

	LANASEVE		Rige a partir de:	Código:
	Estándar de turbidez McFarland y límite de detección		Versión	Página - 6 - de 9
Elaborado por: Analista		Revisado por:	Aprobado por:	

Anexo 1. Composición de la turbidez estándar McFarland y las correspondientes concentraciones de bacterias (UFC/mL).

Número Estándar	Vol (ml)		Número de bacterias/ml UFC (10 ⁸) que representa
	BaCl ₂ *2H ₂ O (1.175%)	H ₂ SO ₄ (1%)	
0.5	0.5	99.5	1.5x10 ⁸
1	1.0	99.0	3x10 ⁸
2	2.0	98.0	6x10 ⁸
3	3.0	97.0	9x10 ⁸
4	4.0	96.0	12x10 ⁸
5	5.0	95.0	15x10 ⁸
6	6.0	94.0	18x10 ⁸
7	7.0	93.0	21x10 ⁸
8	8.0	92.0	24x10 ⁸
9	9.0	91.0	27x10 ⁸
10	10.0	90.0	30x10 ⁸

Anexo 2. Ejemplo para establecer el límite de detección en una muestra

Antes de establecer el límite de detección se deben de preparar los estándares de turbidez de McFarland con una concentración de UFC/mL conocida (Anexo 1). Seguidamente se determinan los valores de absorción para cada uno de ellos. El siguiente cuadro ejemplifica lo anterior.

	LANASEVE	Rige a partir de:	Código:
	Estándar de turbidez McFarland y límite de detección	Versión	Página - 7 - de 9
Elaborado por: Analista	Revisado por:	Aprobado por:	

Estándar	UFC/ml teórico	DO del estándar preparado
0,5	1,5	0,136
1	3	0,3
2	6	0,628
3	9	1,033
4	12	1,275
5	15	1,649
6	18	1,884
7	21	2,182
8	24	2,486
9	27	2,544
10	30	2,758

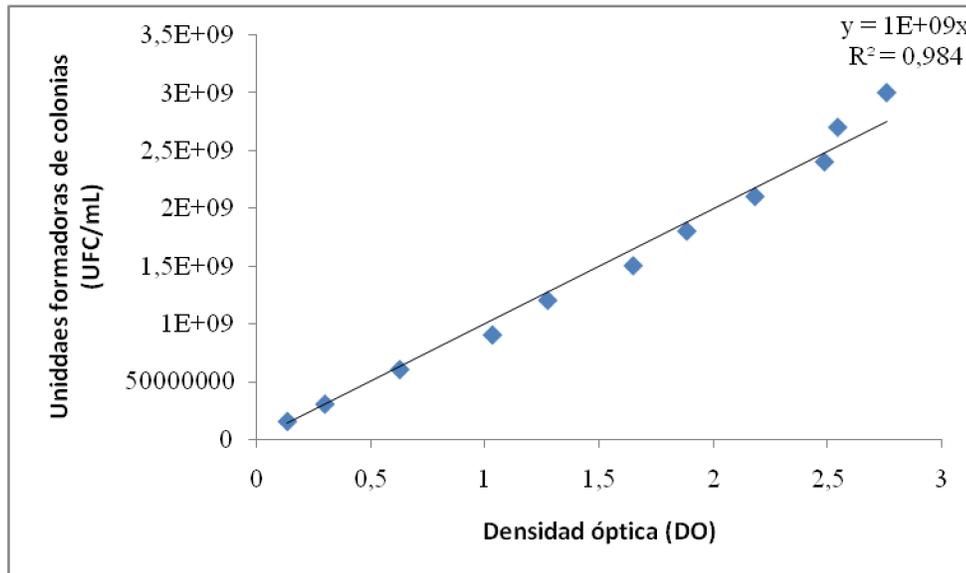
A continuación se prepara una suspensión bacteriana a la cual se le mide también la densidad óptica. Supongamos que la medición de la densidad optica de la suspension bacteriana fue de 0.631. Si observamos el cuadro anterior, podemos notar que la densidad optica de la suspension bacteriana se acerca al estándar 2 de la escala McFarland (DO del estandar preparado = 0,628).

Seguidamente se procede a calcular la concentración de bacterias expresadas en UFC/mL con el valor de absorbancia obtenido y por medio de una recta patrón con la fórmula $y=mx+b$. Para ello se procede a graficar en el programa Microsoft Excel una recta patrón. Para los valores de x estos corresponden a la densidad óptica medida del estándar, mientras que los valores de y corresponden a la UFC/ml teórico.

X	Y
0,136	150000000
0,3	300000000
0,628	600000000
1,033	900000000
1,275	1200000000
1,649	1500000000
1,884	1800000000
2,182	2100000000
2,486	2400000000
2,544	2700000000
2,758	3000000000

	LANASEVE	Rige a partir de:	Código:
	Estándar de turbidez McFarland y límite de detección	Versión	Página - 8 - de 9
Elaborado por: Analista	Revisado por:	Aprobado por:	

A continuación con los valores anteriormente obtenidos se obtiene la recta patrón y la ecuación de la recta.



Una vez obtenida la recta patrón se procede a calcular la cantidad de UFC/ml de la suspensión bacteriana preparada. Para lo anterior se sustituyen los valores en la fórmula obtenida de la recta patrón $y=mx+b$. El valor de x corresponde a la densidad óptica de la suspensión ($DO= 0,631$). Para el cálculo de la intersección (b) en el programa Excel se puede recurrir a la opción Fx (insertar función) y en la opción intersección. eje se introducen los valores de "x" y "y" de la tabla anterior. Para obtener el valor "m" se puede recurrir también a la opción "pendiente" en Fx (insertar función) y se introducen nuevamente los valores de "x" y "y" de la tabla anterior. De acuerdo a lo anterior los valores de cada una de las funciones mencionadas serían:

$$x= 0,631$$

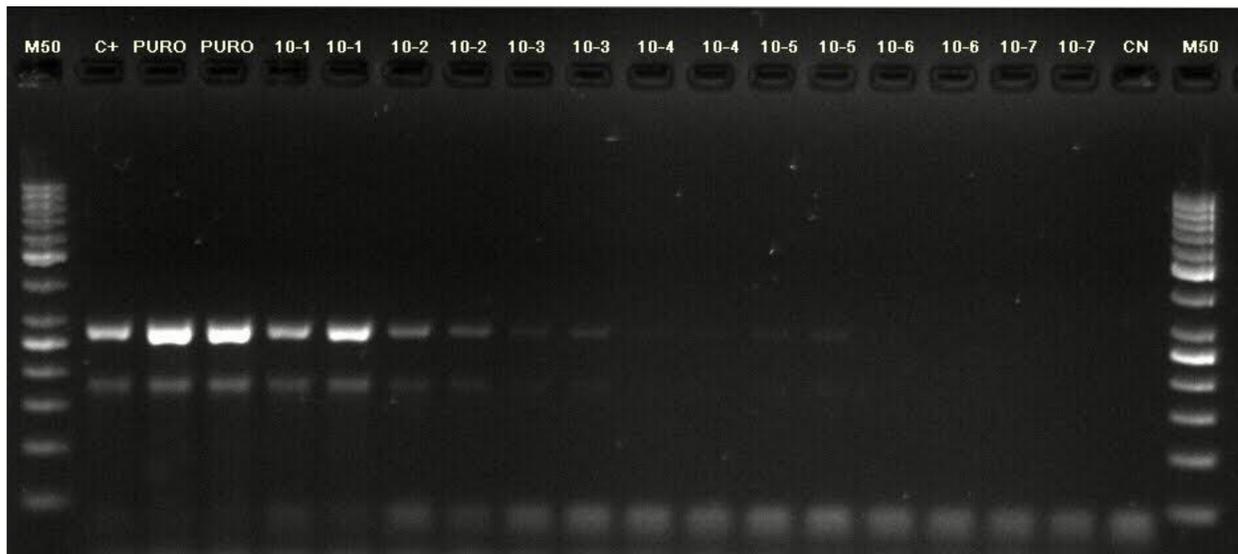
$$m=1042355433$$

$$b= -85431630,23$$

Con los valores anteriormente obtenidos se realiza la ecuación de la recta $y=mx+b$, sustituyendo cada valor ($1042355433 \times 0,631 + 85431630,23= 5,72E+08$) y donde el resultado para "y" sería la cantidad de

	LANASEVE		Rige a partir de:	Código:
	Estándar de turbidez McFarland y límite de detección		Versión	Página - 9 - de 9
Elaborado por: Analista		Revisado por:	Aprobado por:	

UFC/ml presentes en la suspensión bacteriana preparada. A partir de esta suspensión se realizan diluciones seriadas hasta 10^{10} , y tras realizar la PCR se determina el límite de detección. Por ejemplo:



En la figura anterior podemos observar que en la PCR realizada se logró amplificar el ADN de la bacteria hasta una dilución de 10^{-5} UFC/mL. Por lo tanto, a partir de estos resultados se estima la cantidad mínima de copias de genomas bacterianos que puede detectarse y distinguirse en la PCR la cual corresponde con un número de $5,72 \times 10^3$ UFC/mL.

Número	Diluciones decimales (1:10)	UFC/mL para Loque Europeo	Límite de detección
		$5,72 \times 10^8$	Positivo
1	0,10	$5,72 \times 10^7$	Positivo
2	0,01	$5,72 \times 10^6$	Positivo
3	0,001	$5,72 \times 10^5$	Positivo
4	0,0001	$5,72 \times 10^4$	Positivo
5	0,00001	$5,72 \times 10^3$	Positivo
6	0,000001	$5,72 \times 10^2$	Negativo
7	0,0000001	$5,72 \times 10^1$	Negativo
8	0,00000001	$5,72 \times 10^0$	Negativo

Anexo 10. Tarifas actualizadas con base en el decreto ejecutivo 39600-MAG 25/05/2016.

Código de tarifa	Decreto ejecutivo	Condición	Resumen de la descripción para el sistema de facturación	Monto
KH.05	DE-37661-MAG (20/05/2013)	Sin cambio	PCR convencional para detección de ADN - según resolución dg-r- 073-2013	34.908,00
KD.08	DE-37661-MAG (20/05/2013)	Sin cambio	Cultivo bacteriano	13.825,00
