Diseño y puesta a punto de una PCR en tiempo real para la detección de las variante del virus de las alas deformadas en Apis mellifera

Nuñez, G(1); Salina, DM(1,2); Bais, B(1,2); Reynaldi, JF(1,2); Sguazza, GH(1).

(1) Centro de Microbiología Básica y Aplicada (CEMIBA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (UNLP). La Plata, Prov. Buenos Aires, Argentina; (2) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
Contacto: nuniezguadalupe@gmail.com

Las abejas melíferas (Apis mellifera) son reconocidas como uno de los polinizadores más importante del mundo. Múltiples factores, como la pérdida del ecosistema, la aparición de agentes infecciosos, y la interacción con el ácaro Varroa destructor han ocasionado una constante disminución de su población desde hace más de 20 años. Dentro de los posibles causales de enfermedad el virus de alas deformadas (DWV) ha sido reportado como uno de los factores que producen perdida de colmenas. Hasta el momento se han reportado 4 variantes de este virus (A-B-C-D). En Argentina se han reportado a la fecha las variantes A y B, siendo la variante B la más patogénico según varios autores. No obstante, la variante D solo fue detectada en Egipto por lo que no se tuvo en cuenta en nuestro estudio. El objetivo del trabajo fue diseñar una PCR en tiempo real específica para diferenciar las variantes A, B y C del virus DWV en colonias de abejas melíferas. Entre agosto y diciembre de 2023 se colectaron 52 muestras, al azar, de 6 colmenares de las provincias Buenos Aires, Córdoba y Entre Ríos conteniendo cada una 50 individuos. Para evitar la degradación del ARN fueron preservadas en conservadoras en el campo y posteriormente almacenadas en el laboratorio a -80 °C hasta su procesamiento. A partir de ellas, se realizó un screening por RT-Multiplex PCR previamente diseñada para detectar el ARN viral de los 7 virus más comúnmente detectados en nuestro país incluyendo al DWV. Con el fin de diferenciar las variantes A, B y C del virus DWV se diseñaron primers específicos mediante un alineamiento múltiple de secuencias utilizando el software Clustal X. Estos fueron desarrollados a partir de secuencias de las distintas variantes previamente reportadas en el GenBank. Posteriormente, se realizó el diseño y puesta a punto de una PCR en tiempo real teniendo en cuenta los parámetros críticos para la amplificación (concentración de MgCl2 y primers y distintas temperaturas de annealing). Sola las muestras previamente positivas a DWV fueron analizadas para determinar a que variante correspondían, y subsecuentemente fueron confirmadas por secuenciación. El análisis individual de cada colonia por RT-PCR Multiplex revelo doce resultaron positivos al virus de DWV. Al analizar estas muestras por la PCR en tiempo real se pudo determinar que 5 muestras fueron positivas a DWV-A, 4 a DWV-B y 3 muestras presentaron coinfecciones con las variantes A y B, mientras que la variante C no fue detectada. Se logro desarrollar una PCR en tiempo real que

permite detectar y tipificar de manera sencilla las variantes A, B y C del virus de las alas deformadas. Mediante el uso de esta técnica, se detectó un 23% de incidencia del virus de las alas deformadas, con una proporción similar entre las variantes DWV-A y DWV-B e incluso la presencia de coinfecciones por ambas variantes. En ninguna de las colmenas muestreadas se detectó signología clínica característica de esta enfermedad.