

Estandarización de un método de replicación *in vivo* en larvas de *Apis mellifera* para replicar el virus de la cría ensacada

Salina, MD(1,2); Nuñez, G(2); Bais, BB(1,2); Sguazza, GH(2); Reynaldi, FJ(1,2).

(1) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas; (2) Centro de Microbiología Básica y Aplicada, Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP.

Contacto: marcosdsalina@gmail.com

El virus de la cría ensacada (SBV) afecta principalmente larvas de abejas, en las cuales replica rápidamente impidiendo que pueda llegar a pupar, acumulando fluido entre el cuerpo y la piel lo que forma una especie de "saco" que da origen al nombre de esa enfermedad. Al ser infectada, la larva cambia de color (pardo-amarillento) y finalmente muere. Al ser removida por las obreras, estas se infectan y propagan el virus al alimentar a otras larvas. El objetivo de este trabajo fue estandarizar un método eficaz de replicación viral *in vivo* para SBV. Para el desarrollo de ese trabajo, se utilizaron larvas con signología compatible con SBV, a partir de las cuales se extrajo ARN total, seguido de una RT-PCR múltiple, para confirmar la presencia SBV y la ausencia de otros virus. Para preparar el inoculo, se realizó un macerado el cual se clarificó por centrifugación y posteriormente fue pasado por un filtro de 0,22µm. Como sustrato se utilizaron larvas con menos de 24 hs de vida obtenidas de colonias libres de patógenos, que fueron cloacadas en cúpulas atemperadas a 35°C con 10µl de alimento (50% Jalea real, 6% D-Fructosa, 6% D-Glucosa, 1% extracto de levadura y 37% de agua estéril). Al día siguiente se evaluó la viabilidad y se armaron grupos de 16 larvas: Grupo 1, 2 y 3 a los cuales se le administro 10µl de alimento, con diluciones seriadas de inoculo viral SBV y un grupo control al que se le administró la dieta sin inoculo y se mantuvieron en estufa a 35°C +/- 0,5°C con 90% de humedad relativa (HR). Cada larva se observó y alimentó hasta el día 6, los subsiguientes días solo se observaron y mantuvieron a 32° y 60% HR, simulando la etapa de cría cerrada. Las larvas muertas se congelaron a -70°C hasta su procesamiento. Al finalizar el ensayo se realizó la extracción de ARN total y RT-PCR múltiple de cada grupo a fin de evaluar posibles contaminaciones virales y posteriormente se realizó una q-PCR usando *primers* específicos para SBV y β -actina como gen de . Con los datos obtenidos se determinó una presencia relativa (medida como ??Ct) del virus SBV: 1,6x10⁴, 2,8x10⁵ y 5,79x10³ para el tratamiento 1, 2 y 3 respectivamente. La dilución del inoculo con el cual se alimentó al grupo 1 provocó rápida mortalidad de las pupas, por lo que se obtuvo menor presencia viral relativa al final del ensayo. En contraposición en los grupos 2 y 3 no se observó gran mortalidad, pero para la dilución de inoculo correspondiente al grupo 2 se determinó mayor presencia viral relativa, determinando esta dilución como la más óptima. La estandarización de un método *in vivo* es un pilar fundamental para la replicación del SBV y su posterior estudio, ya que no existen líneas celulares comerciales de . La replicación a partir de larvas menores a 24hs es laboriosa y requiere de

técnica, pero es un método eficaz para aumentar la carga viral, y si bien no se parte de individuos libres de patógenos específicos se minimiza en gran medida las posibles contaminaciones con otros patógenos, sobre todos aquellos de transmisión horizontal.