

## FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

### AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE CEPAS AUTÓCTONAS DEL VIRUS DE ALAS DEFORMADAS QUE AFECTAN A ABEJAS MELÍFERAS

Bais, Bárbara Belén

Reynaldi, Francisco José (Dir.)

Laboratorio de Virología (LAVIR). Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

[barbarabais13@gmail.com](mailto:barbarabais13@gmail.com)

**PALABRAS CLAVE:** Abejas, Virus de las Alas Deformadas, Aislamiento.

### ISOLATION AND GENOMIC CHARACTERIZATION OF AUTOCHTHONOUS STRAINS OF DEFORMED WINGS VIRUS THAT AFFECT HONEY BEES

**KEYWORDS:** Bees, Deformed Wing Virus, Isolation.

### Resumen gráfico



## Resumen

El objetivo general es aislar cepas de DWV de nuestra región y caracterizarlas genotípica y desarrollar una técnica que permita la replicación viral in vitro y obtener alta carga viral para comenzar a estudiar los patrones de infección que tienen las variantes de DWV en larvas y abejas adultas. Consiste en recolectar 20 muestras aleatorias de nuestra región (Partido de La Plata, provincia de Buenos Aires), cada muestra consta de 50 abejas adultas. Las mismas serán conservadas a -70°C hasta su procesamiento en la Cátedra de Virología (FCV, UNLP).

Luego se procederá a realizar los siguientes pasos:

### 1- Aislamiento de cepas autóctonas del DWV en abejas melíferas

Para la detección de DWV se partirá de 15 abejas tomadas al azar de cada muestra, las que serán homogeneizadas en un mortero con 2ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril. Luego se realizará la extracción de ARN utilizando 1 ml de TRIzol (Invitrogen) y cloroformo, haciendo la precipitación con isopropanol y lavados con etanol 70°. Se procederá a la síntesis de ADNc.

La reacción se llevará a cabo utilizando una RT-PCR multiplex. Los homogenatos con identificación positiva para DWV serán clarificados por centrifugación, se esterilizarán por filtración y serán almacenados a -70°C para ser utilizados posteriormente para el aislamiento del virus.

2- Purificación viral: Los homogenatos con identificación positiva para DWV serán concentrados por centrifugación posteriormente purificados por centrifugación en gradiente de sacarosa (20-60%). Cada una de las fracciones obtenidas será analizada por absorbancia y aquella que contenga las partículas virales será nuevamente concentrada por ultracentrifugación.

3- Caracterización genómica de los virus aislados: a) Secuenciación, las cepas aisladas serán secuenciadas en su totalidad con el fin de estudiar su posible variabilidad regional. b) Análisis filogenético de las cepas aisladas, las secuencias a emplear serán editadas y alineadas utilizando los programas Bio-Edit (versión 7.05) y ClustalX (versión 1.92) respectivamente.

### 4. Estandarización de un método de replicación viral in vitro:

Se trabajará en la obtención de cultivos primarios de células de abeja a partir de huevos o larvas de uno a dos días de edad. Para la propagación viral en células, se empleará, la primera vez, el sobrenadante obtenido de los homogenatos con identificación positiva para DWV y, de allí en adelante, un protocolo estándar de infección utilizando un inóculo con 108 copias virales/ml, stock con el que cuenta nuestro laboratorio. La multiplicación viral será analizada por observación directa de los sobrenadantes con MET y por RT-PCR con primers específicos para DWV. En caso de no tener éxito, la propagación viral se realizará en pupas de abeja, recolectadas de colmenares sanos.

## Multimedia

<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/114250>