

TESIS DOCTORAL

Evaluación de la diversidad fenotípica y genotípica de cepas de *Paenibacillus larvae* patógenas de abejas melíferas e investigación de los mecanismos moleculares de la resistencia a tetraciclina



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
Centro de Investigaciones de Fitopatología

Adriana Mónica Alippi



**Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
Centro de Investigaciones de Fitopatología**

**Evaluación de la diversidad fenotípica y
genotípica de cepas de *Paenibacillus larvae*
patógenas de abejas melíferas
e investigación de los mecanismos moleculares
de la resistencia a tetraciclina**

Adriana Mónica Alippi

2015

**Director: Prof. Dr. O. Mario Aguilar
Co-director: Prof. Dr. Pedro A. Balatti**

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata bajo la dirección del Dr. O. Mario Aguilar y la Co-dirección del Dr. Pedro A. Balatti.

Una parte del mismo fue desarrollada en el laboratorio del Dr. O. Mario Aguilar del Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM) de la Facultad de Ciencias Exactas de la U.N.L.P.

A la memoria de mi padre quién me mostró por primera vez el maravilloso mundo microscópico que habita una gota de agua alentándome a transformarme en una "cazadora de microbios"

A mi hija Delfina

A mi madre y a mi hermano

Mi reconocimiento:

A la Facultad de Agronomía y a la antigua Cátedra de Fitopatología por haberme brindado el ámbito propicio para mi formación de grado y mis inicios en la investigación Científica.

Al Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI) y a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP por brindarme un espacio de trabajo adecuado para el desarrollo de mi trabajo.

Al Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM) y a la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP por permitirme desarrollar parte de este trabajo en sus laboratorios.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires por su apoyo económico que hizo posible mi dedicación exclusiva a la investigación científica.

A la IFS (International Foundation for Science), al CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), a la ANPCyT (Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica) y a la CIC por el otorgamiento de numerosos subsidios para la compra de equipos e insumos imprescindibles para la realización de mi trabajo.

Mi agradecimiento

Al Dr. O Mario Aguilar por dirigir mi trabajo y brindarme su estímulo permanente.

Al Dr. Pedro Balatti por aceptar co-dirigir esta tesis.

A todos mis compañeros del CIDEFI y de la Cátedra de Fitopatología (los de ayer, los de hoy y los de siempre).

Al Dr. D. Stahly por facilitarme el bacteriófago PPL1c y cepas bacterianas controles para realizar los ensayos del Capítulo III.

A todos los Investigadores que enviaron cepas bacterianas o larvas infectadas, abejas y mieles lo que me permitió conformar una amplia colección con cepas bacterianas de todo el mundo provenientes de fuentes del apiario.

A todos los apicultores y técnicos que enviaron muestras de miel .

A la Dra. Ana Claudia López por las fotografías de los geles de RFLP, su colaboración con muchos gráficos y por su excelente predisposición para ayudarme con cualquier tipo de trabajo.

A la Ing. Marisa De Giusti y al Dr. Francisco Reynaldi por su colaboración en los análisis estadísticos.

A la Ing. Graciela Albo, al Dr. Francisco Reynaldi, y al Sr. Daniel Leniz por ocuparse del apiario experimental y por tantas horas de trabajo dedicadas al mismo.

Al Lic. Ignacio León por su ayuda con los análisis de secuencias de los plásmidos estudiados.

A la Lic. Patricia Sarmiento y al Sr. Rafael Urrejola por la dedicación en la obtención de imágenes de microscopía electrónica de barrido.

Al Sr. Jorge Nedela por la dedicación en la obtención de fotografías de las colonias bacterianas y de las abejas.

Durante el presente trabajo de Tesis fueron publicados los siguientes artículos:

- PPL1c, a virulent mutant bacteriophage useful for identification of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae*. Stahly, D.P., Alippi, A.M., Bakhiet, N. Campana, C.F., Novak, C.C. & Cox, R. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74: 295-296, 1999.
- Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American Foulbrood of honeybees, by using PCR and restriction fragment analysis of genes encoding 16S rRNA. Alippi, A.M., Lopez, A.C., & Aguilar, O.M. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (7): 3655-3660, 2002.
- Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae larvae* and incidence of American Foulbrood in Argentinean honeys from Buenos Aires Province. Alippi A.M., Reynaldi, F.J., López, A.C., De Giusti, M.R. & Aguilar O.M. *Journal of Apicultural Research* 43(3): 135-143, 2004 .
- Under the microscope. Diagnosis of American foulbrood disease in honeybees: A synthesis and proposed analytical protocols. De Graaf, D.C. Alippi, A.M., Brown, M., Evans, J.D.; Feldlaufer, M., Gregorc, A., Hornitzky, M., Pernal, S.,F., Schuch, D.M.T., Titěra, D., Tomkies, V. and Ritter, W. *Letters in Applied Microbiology*, 43: 583-590, 2006. ISSN 0266-8254.
- Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus larvae*, the causal agent of a honey bee larval disease. Alippi, A.M., López A.C., Reynaldi F.J., Grasso, D.H. & Aguilar O.M. *Veterinary Microbiology* 125: 290-303, 2007.
- Evaluación del método epsilométrico Etest para la determinación de la sensibilidad a tetraciclina en *Paenibacillus larvae*, agente causal de la loque americana de las abejas. Alippi, A.M., Reynaldi, F.J. & López A.C. *Revista Argentina de Microbiología* 45(4): 257-261, 2013.
- Review Article: Standard methods for American foulbrood research. de Graaf D.C., Alippi A.M., Antúnez K., Aronstein K.A., Budge G., De Koker D., De Smet L., Dingman D.W., Evans J.D., Foster L.J., Fünfhaus A., Garcia-Gonzalez E., Gregorc A., Human H., Murray K.D., Nguyen B.K., Poppinga L., Spivak M., Van Engelsdorp D., Wilkins S. & Genersch, E. *Journal of Apicultural Research* 52 (1), 2013. DOI 10.3896/IBRA.152.1.11. ISSN 0021-8839.

- Alippi, A.M., León, I. & López, A.C. Identical tetracycline-resistance encoding plasmids from different *Paenibacillus larvae* strains isolated from commercial honeys. *International Microbiology* 17: 49-61, 2014.

INDICE

Indice general	i
Indice de Figuras	vi
Indice de Tablas	viii
Abreviaturas y siglas	ix
Resumen	1
Abstract	7

Capítulo I: Introducción General y Objetivos

1. La miel y su importancia para la Argentina.....	11
2. La abeja.....	11
2.1. La colmena de abejas	12
3. Enfermedades de las abejas	13
3.1. Inmunidad individual.....	14
3.2. Inmunidad social y transmisión de patógenos	14
3.3. Enfermedades de origen bacteriano que afectan a las abejas	15
3.3.1. La loque europea.....	15
3.3.2. La loque americana.....	17
3.3.2.1. Sintomatología	17
3.3.2.2. Patogénesis.....	23
3.3.2.3. Diseminación y transmisión.....	26
3.3.2.4. Etiología.....	28
3.3.2.5. Control	31
4. Biodiversidad microbiana	31
4.1. Diversidad de <i>Paenibacillus larvae</i> y Fundamentos de la elección de este tema de Tesis.....	33
Hipótesis planteadas	36
Objetivos Generales.....	36

CAPITULO II. Aislamiento y caracterización fenotípica de cepas de *Paenibacillus larvae* y otras especies esporuladas presentes en fuentes de apiario

1. Introducción	37
1.1. Aislamiento y cultivo de <i>Paenibacillus larvae</i>	37
1.1. Microbiología de la miel	37
2. Objetivos específicos	39
3. Materiales y Métodos	40
3.1. Observación directa a partir de restos larvales con síntomas mediante tinción y observación por microscopía óptica	40
3.1.1. Tinción simple.....	40
3.1.2. Técnica de "Hanging drop" modificada	40

3.1.3. Coloración negativa con nigrosina.....	41
3.2. Aislamiento y cultivo bacteriano de <i>Paenibacillus larvae</i>	41
3.2.1. Aislamiento y cultivo bacteriano de <i>Paenibacillus larvae</i> a partir de restos larvales	41
3.2.2. Aislamiento y cultivo bacteriano de <i>Paenibacillus larvae</i> a partir de abejas adultas asintomáticas	42
3.2.3. Aislamiento y cultivo bacteriano de <i>Paenibacillus larvae</i> a partir de miel	43
3.3. Obtención de cultivos puros de <i>Paenibacillus larvae</i>	45
3.4. Mantenimiento del <i>stock</i> bacteriano	45
3.5. Aislamiento y cultivo bacteriano de otras especies de <i>Paenibacillus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Brevibacillus</i> y <i>Lysinibacillus</i> presentes en miel y en restos larvales	46
3.6. Caracterización de los aislamientos estudiados	46
3.6.1. Morfología de las células vegetativas y esporas	46
3.6.1.1. Tinción de Gram	46
3.6.1.2. Tinción de esporas: Técnica de Schaeffer-Fulton	47
3.6.2. Dimensiones de esporas y células vegetativas.....	47
3.6.3. Observación por microscopía electrónica de barrido (MEB).....	47
3.6.4. Características fisiológicas y bioquímicas.....	49
3.6.4.1. Enzimas respiratorias	49
3.6.4.1.1. Catalasa	49
3.6.4.1.2. Citocromo oxidasa.....	49
3.6.4.1.3. Reacción de Voges-Proskauer (V-P).....	50
3.6.4.2. Utilización de fuentes de carbono.....	50
3.6.4.3. Utilización de ácidos orgánicos (citrato de sodio).....	51
3.6.4.4. Reducción de nitratos a nitritos.....	51
3.6.5. Pruebas adicionales para identificar otras especies de <i>Paenibacillus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Brevibacillus</i> y <i>Lysinibacillus</i> aisladas de miel.....	52
3.6.5.1. Detección de inclusiones lipídicas.....	52
3.6.5.2. Determinación de la presencia de inclusiones cristalinas	53
3.6.5.3. Producción de lecitinasa	54
3.6.5.4. Actividad tirosinasa.....	54
3.6.5.5. Actividad hemolítica	54
3.6.5.6. Hidrólisis del almidón	55
3.6.5.7. Hidrólisis de gelatina.....	55
3.6.5.8. Producción de indol.....	55
3.6.6. Empleo de pruebas bioquímicas miniaturizadas: Galerías API 50CH y complemento con API 20	56
3.7. Cepario de trabajo de <i>Paenibacillus larvae</i>	56
3.8. Cepario de trabajo de especies de <i>Paenibacillus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Brevibacillus</i> y <i>Lysinibacillus</i> aisladas de mieles o larvas	56
3.9. Cepas provenientes de Colecciones Internacionales	56
3.10. Prevalencia de <i>Paenibacillus larvae</i> en mieles de la Provincia de Buenos Aires.....	57

4. Resultados y Discusión	58
4.1. Observación directa a partir de restos larvales	58
4.2. Caracterización de los aislamientos estudiados	59
4.3. Observaciones por microscopía electrónica de barrido.....	66
4.4. Análisis de la prevalencia de <i>Paenibacillus larvae</i> en mieles	71

CAPITULO III. Tipificación mediante el bacteriófago PPL1c

1.Introducción	76
1.1. Morfología de los viriones	77
1.2. Ciclos de multiplicación de los bacteriófagos	77
1.2.1. Ciclo lítico	78
1.2.2. Ciclo lisisogénico	79
1.3. Tipificación mediante bacteriófagos.....	81
1.4. Bacteriófagos de los géneros <i>Paenibacillus</i> y <i>Bacillus</i>	81
1.4.1. Bacteriófagos de <i>Paenibacillus larvae</i>	83
2. Objetivos específicos	84
3. Materiales y Métodos	84
3.1. Cepas bacterianas y bacteriófagos	84
3.1.1. Medios de cultivo condiciones de cultivo y ensayos de lisis en placa	84
3.1.2. Preparación de soluciones de alto título del bacteriófago PPL1c.....	85
3.1.3. Técnica de <i>spot-test</i> para determinar la susceptibilidad de las cepas bacterianas al fago PPL1c	86
4. Resultados y Discusión	87

CAPITULO IV. Empleo de marcadores moleculares de ADN en el estudio de la variabilidad de *Paenibacillus larvae*

1.Introducción	103
1.1. Marcadores moleculares de ADN: generalidades	103
1.1.1. Secuenciación del ADN	104
1.1.2. Análisis del operón ARNr	104
1.1.3. Electroforesis en geles de campo pulsado (PFGE).....	105
1.1.4. Técnicas que emplean la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	105
1.1.4.1 Amplificación al azar de ADN polimórfico (marcadores RAPD).....	107
1.1.4.2 Amplificación selectiva de fragmentos de restricción (AFLP)	107
1.1.4.3. Polimorfismos por restricción de la longitud de los fragmentos (RFLP).....	108
1.1.4.4. Rep-PCR.....	108
1.2. Marcadores moleculares de ADN en el análisis de la diversidad de <i>P. larvae</i>	109
2. Objetivos específicos	110
3. Materiales y Métodos	110
3.1. Obtención de ADN genómico total mediante extracción con fenol-cloroformo- isoamílico.....	110

3.2. Obtención de ADN genómico total por extracción directa a partir de colonias bacterianas	112
3.3. Condiciones generales de PCR y electroforesis.....	113
3.4. Amplificación de un fragmento de 973 pb del gen 16S ARNr.....	114
3.5. Obtención de perfiles de <i>fingerprints</i> de ADN mediante la amplificación genómica por rep-PCR con primers BOX, ERIC y REP	114
3.6. Análisis por RFLP de un fragmento del gen 16S rRNA amplificado por PCR para la diferenciación de <i>Paenibacillus larvae</i> y otras bacterias esporuladas	116
4. Resultados y Discusión	117
4.1. Obtención de ADN genómico total de <i>Paenibacillus larvae</i> y otras especies esporuladas	117
4.2. Amplificación de un fragmento de 973 pb del gen 16S ARNr.....	118
4.3. Perfiles de rep-PCR <i>fingerprints</i>	119
4.3.1. Perfiles obtenidos con los cebadores BOX y REP	119
4.3.2. Perfiles obtenidos con los cebadores ERIC.....	122
4.3.3. Distribución geográfica de los perfiles obtenidos por rep-PCR.....	136
4.4. Análisis por RFLP de un fragmento del gen 16S rRNA amplificado por PCR.....	139

CAPITULO V. Estudio de las bases genéticas de la resistencia a tetraciclina en las poblaciones de *Paenibacillus larvae*

1.Introducción	146
1.1. Control de Loque americana mediante la aplicación de antibióticos.....	146
1.2. Resistencia a antibióticos en medicina veterinaria	147
1.3. Resistencia a Tetraciclinas	148
1.4. Transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos en bacterias.....	151
1.4.1. Características generales de los plásmidos bacterianos.....	152
1.4.2. Conjugación bacteriana.....	153
1.4.3. Replicación plasmídica.....	155
1.5. Plásmidos de <i>Paenibacillus larvae</i>	156
2. Objetivos específicos	158
3. Materiales y Métodos	158
3.1. Determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas de tetraciclina mediante el método de dilución en agar	158
3.2. Determinación resistencia/sensibilidad a tetraciclina mediante la técnica de difusión en disco.....	160
3.3. Incubación en presencia de tetraciclina.....	161
3.4.Evaluación del método epsilométrico E-Test para la determinación de la sensibilidad a tetraciclina en <i>P. larvae</i>	162
3.5. Análisis de contenido de plásmidos por la técnica de lisis <i>in situ</i> en geles de agarosa	163
3.6. Extracción de ADN plasmídico a partir de un gel de agarosa	164
3.7. Extracción de ADN plasmídico (Miniprep).....	165

3.8. Investigación de genes de resistencia mediante la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	166
3.9. Tratamientos enzimáticos del ADN plasmídico	167
3.10. Secuenciación y Bioinformática	167
3.11. Experimentos de conjugación	168
3.12. Experimentos de transformación por electroporación	169
3.13. Estabilidad y curado de los transconjugantes y transformantes	170
3.14. Comparación por rep-PCR de los perfiles <i>fingerprints</i> de las cepas dadoras, transconjugantes, transformantes y curadas	171
4. Resultados y Discusión	172
4.1. Determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas de tetraciclina mediante el método de dilución en agar.....	172
4.2. Determinación de resistencia/sensibilidad a tetraciclina mediante la técnica de difusión en disco	172
4.3. Incubación en presencia de tetraciclina.....	176
4.4. Evaluación del método epsilométrico E-Test para la determinación de la sensibilidad a tetraciclina en <i>P. larvae</i>	178
4.5. Análisis de contenido de plásmidos por la técnica de lisis <i>in situ</i> en geles de agarosa	181
4.6. Extracción de ADN plasmídico de geles de agarosa	181
4.7. Extracción de ADN plasmídico (Miniprep).....	182
4.8. Investigación de genes de resistencia mediante la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	182
4.9. Tratamientos enzimáticos del ADN plasmídico	184
4.10. Secuenciación y Bioinformática	184
4.11. Experimentos de conjugación	198
4.12. Experimentos de transformación por electroporación	201
4.13. Estabilidad y curado de los transconjugantes y transformantes	202
4.14. Comparación por rep-PCR de los perfiles <i>fingerprints</i> de las cepas dadoras, transconjugantes, transformantes y curadas	204
5. Conclusiones	204
Conclusiones finales	207
Bibliografía.....	210

APÉNDICES

Apéndice I: Cepario de trabajo de <i>Paenibacillus larvae</i>	232
Apéndice II: Cepario de trabajo de especies de <i>Bacillus</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Brevibacillus</i> y <i>Lysinibacillus</i>	243
Apéndice III: Cepas de <i>Paenibacillus larvae</i> provenientes de Colecciones Internacionales	245
Apéndice IV: Cepas de referencia de otros géneros y especies bacterianas	246
Apéndice V: Alineamientos de las secuencias completas de los plásmidos	248

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema del desarrollo en la abeja obrera.....	13
Figura 2.	Síntomas de loque europea en cuadros de cría.....	16
Figura 3.	Síntomas de loque americana: Aspecto general de cría salteada.....	18
Figura 4.	Síntomas de loque americana: Prueba de la cerilla.....	19
Figura 5.	Síntomas de loque americana: Escamas en las celdas.....	20
Figura 6.	Síntomas de loque americana: Escamas.....	20
Figura 7.	Síntomas: Comparación de escamas.....	21
Figura 8.	Esporas de <i>Paenibacillus larvae</i> observadas bajo MEB.....	24
Figura 9.	Células vegetativas bacterianas en el lumen del intestino y recubriendo el epitelio vistas al MEB.....	24
Figura 10.	Esporas bacterianas contenidas en el material viscoso larval vistas bajo MEB.....	26
Figura 11.	Representación esquemática del aislamiento y cultivo de <i>Paenibacillus larvae</i> a partir de restos larvales.....	41
Figura 12.	Representación esquemática del aislamiento y cultivo de <i>P. larvae</i> a partir de miel.....	44
Figura 13.	Colonias de <i>Paenibacillus larvae</i> en MYPGP.....	60
Figura 14.	Colonias pigmentadas de <i>Paenibacillus larvae</i> en MYPGP.....	61
Figura 15.	Cepa ATCC 13537 en MYPGP.....	61
Figura 16.	Colonias pigmentadas de <i>P. larvae</i> en agar Columbia + sangre ovina.....	62
Figura 17.	Tinción de Gram.....	62
Figura 18.	Tinción de esporas bacterianas.....	62
Figura 19.	Prueba de catalasa.....	63
Figura 20.	Reacción de citocromo-oxidasa.....	63
Figura 21.	Actividad nitrato- reductasa.....	63
Figura 22.	Esporas de <i>Paenibacillus larvae</i>	66
Figura 23.	Células vegetativas de <i>Paenibacillus larvae</i>	67
Figura 24.	Esporas de <i>Paenibacillus alvei</i>	67
Figura 25.	Morfología de <i>Melissococcus plutonius</i>	68
Figura 26.	Esporas de <i>Brevibacillus laterosporus</i>	68
Figura 27.	Esporas de <i>Paenibacillus apiarius</i>	69
Figura 28.	Esporas de <i>Bacillus cereus</i>	69
Figura 29.	Esporas de <i>Bacillus megaterium</i>	70
Figura 30.	Esporas de <i>Bacillus subtilis</i>	70
Figura 31.	Esporas de <i>Bacillus licheniformis</i>	71
Figura 32.	Incidencia de esporas de <i>P. larvae</i> en mieles de la Prov. de Bs. As.	73
Figura 33.	Tipos morfológicos de los bacteriófagos.....	80
Figura 34.	Obtención de stock de alto título del bacteriófago PPL1c.....	87
Figura 35.	Spot test: Reacción positiva.....	88
Figura 36.	Resolución relativa de diferentes técnicas de identificación de microorganismos.....	104
Figura 37.	Representación esquemática de una reacción de PCR.....	106

Figura 38.	Representación esquemática de la técnica de rep-PCR.....	108
Figura 39.	Producto de amplificación del gen 16S rDNA con los cebadores PI1 y PI2	118
Figura 40.	<i>Fingerprints</i> diferenciales por BOX-PCR.....	119
Figura 41.	Dendrograma de similitud genotípica de cepas representativas de <i>P. larvae</i> obtenidos por rep-PCR	120
Figura 42.	Patrones de <i>fingerprints</i> más frecuentes obtenidos por BOX-PCR de distintas especies de <i>Paenibacillus</i> , <i>Bacillus</i> y <i>Brevibacillus</i> spp.....	121
Figura 43.	Perfiles representativos de rep- <i>fingerprints</i> empleando los cebadores BOX, REP y ERIC, respectivamente, de los 4 genotipos de <i>Paenibacillus larvae</i> presentes en la Argentina.....	122
Figura 44.	<i>Fingerprints</i> por ERIC-PCR de cepas de <i>P. larvae</i> de Argentina.....	123
Figura 45.	<i>Fingerprints</i> diferenciales por ERIC-PCR.....	124
Figura 46.	Perfiles de RFLP obtenidos con <i>MspI</i>	139
Figura 47.	Perfiles de RFLP obtenidos con <i>HaeIII</i>	140
Figura 48.	Análisis de la diversidad del gen 16S rDNA mediante RFLP	141
Figura 49.	Estructura química de la tetraciclina.....	148
Figura 50.	Esquema de la organización genética el plásmido pVM158.....	154
Figura 51.	Representación esquemática de la organización modular de los plásmidos RCR.....	155
Figura 52.	Frecuencia de distribución de los valores de CIM de Tc de 84 cepas de <i>P. larvae</i> de distintos orígenes geográficos.....	176
Figura 53.	Determinación de CIM de Tc por E-Test.....	179
Figura 54.	Esquema comparativo entre las CIM determinadas por E-test y las CIM determinadas por dilución en agar.....	181
Figura 55.	Amplificación por PCR de la secuencia del determinante <i>tetL</i>	183
Figura 56.	Secuencia completa del plásmido pPL395.....	186-187
Figura 57.	Representación esquemática del plásmido pPL374	188
Figura 58.	Comparación esquemática de los plásmidos pPL374, pPL395 y pPL373 con el plásmido pMV158.....	189
Figura 59.	Alineamiento de las secuencias de los <i>oriT</i>	191
Figura 60.	Alineamiento de las secuencias del origen de replicación simple hebra (<i>ssu</i>)	192
Figura 61.	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas Mob	194
Figura 62.	Dendrograma de máxima parsimonia construido con las secuencias completas de aminoácidos de los plásmidos.....	195
Figura 63.	Dendrograma de máxima parsimonia construido con las secuencias del determinante <i>tetL</i>	196
Figura 64.	Determinación de la topología más probable para la proteína tetL	198
Figura 65.	Fenotipo de la cepa dadora PL374WT Tc ^R	199
Figura 66.	Fenotipo de la cepa aceptora <i>B. subtilis</i> BSm351WT Tc ^S (A), de la cepa transconjugante BSm351TrD Tc ^R (B) y de la cepa curada BSm351TrDcur Tc ^S (C).....	201
Figura 67.	Fenotipo de los transformantes de <i>P. larvae</i> NRRL B-14154 Tr	202
Figura 68.	Perfiles de plásmidos obtenidos en geles <i>in-situ</i> tipo Eckhardt	203

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Síntomas diferenciales entre loque americana y europea	22
Tabla 2.	Comparación de los niveles de infección durante los 3 años de muestreo	72
Tabla 3.	Resultados de las pruebas de <i>spot-test</i> para determinar susceptibilidad /resistencia de las cepas de <i>P. larvae</i> al fago PPL1c	88
Tabla 4.	Resultados de las pruebas de <i>spot-test</i> para determinar susceptibilidad /resistencia de las cepas de <i>Paenibacillus larvae</i> (<i>ex pulvificiens</i>) al fago PPL1c	100
Tabla 5.	Resultados de las pruebas de <i>spot-test</i> para determinar susceptibilidad /resistencia de cepas seleccionadas de los géneros <i>Paenibacillus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Brevibacillus</i> y <i>Lysinibacillus</i> al fago PPL1c	101
Tabla 6.	Perfiles de <i>fingerprints</i> de las cepas de <i>P. larvae</i> obtenidos por rep-PCR con los cebadores BOX, REP y ERIC	126
Tabla 7.	Perfiles de <i>fingerprints</i> de las cepas de <i>P. larvae</i> (<i>ex grupo pulvificiens</i>) obtenidos por rep-PCR con los cebadores BOX, REP y ERIC.....	135
Tabla 8.	Distribución de los <i>Fingerprints</i> obtenidos por BOX-PCR (A, B, C, D y E) por país de origen de las cepas de <i>P. larvae</i>	137
Tabla 9.	Polimorfismos de restricción por longitud de los fragmentos (RFLP) resultantes de la amplificación por PCR con los <i>primers</i> U1/U2 empleando 7 endonucleasas	143
Tabla 10.	Secuencia de los cebadores empleados, condiciones de ciclado y tamaño de los amplicones esperados.....	166
Tabla 11.	Valores de CIM y de diámetros de los halos de inhibición (Promedio \pm SD).....	173
Tabla 12.	Incubación en presencia de Tc.....	177
Tabla 13.	Comparación de las CIM de Tc por E-test y por difusión en agar.....	180
Tabla 14.	Resultados de las determinaciones de sensibilidad/resistencia a tetraciclinas de las cepas empleadas en los ensayos de conjugación	200
Tabla 15.	Perfiles de <i>fingerprints</i> de las cepas de <i>P. larvae</i> con resistencia a Tc conteniendo el determinante <i>tetL</i>	204

BOX

BLASTn

rep-PCR

ERIC

°C

ADN

H₂O_d

% v/v

RFLP

Abreviaturas

T_c

tetL

oriT

ND

CIM

ATCC

rpm

MYPGP

pb

FT

Kb

S

ABREVIATURAS Y SIGLAS

Å: Angstroms

A: Adenina

A_{600nm}: Absorbancia medida a 600 nm

ADN: Acido desoxirribonucleico

AFB: *American Foulbrood* (loque americana)

AFLP: *Amplified fragment length polymorphisms* (polimorfismos de fragmentos de amplificación)

AN: Agar nutritivo (medio de cultivo)

ARDRA: *Amplified ribosomal DNA restriction analysis* (análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado)

ARN: Acido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNr: ARN ribosomal

ARNt: ARN de transferencia

ASC: Ausencia de sitios de corte

ATB: Antibiótico

ATCC: *American Type Culture Collection, Rockville, EE.UU.*

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool* (Herramienta básica para el alineamiento de secuencias)

BLASTn: *Standard nucleotide-nucleotide BLAST* (BLAST estándar nucleótido-nucleótido)

BM: Baño maría

BOX: elemento *Box*

bp: *Base pairs* (pares de bases)

BrEt: Bromuro de etidio

C: Carbono

C: Citosina

CCM: Czech Collection of Microorganisms, República Checa.

CCT: Coleção de Culturas Tropical, Fundação André Tosello, Brasil.

CE: Células electrocompetentes

CI: Cultivo indicador

CIM: Concentración inhibitoria mínima

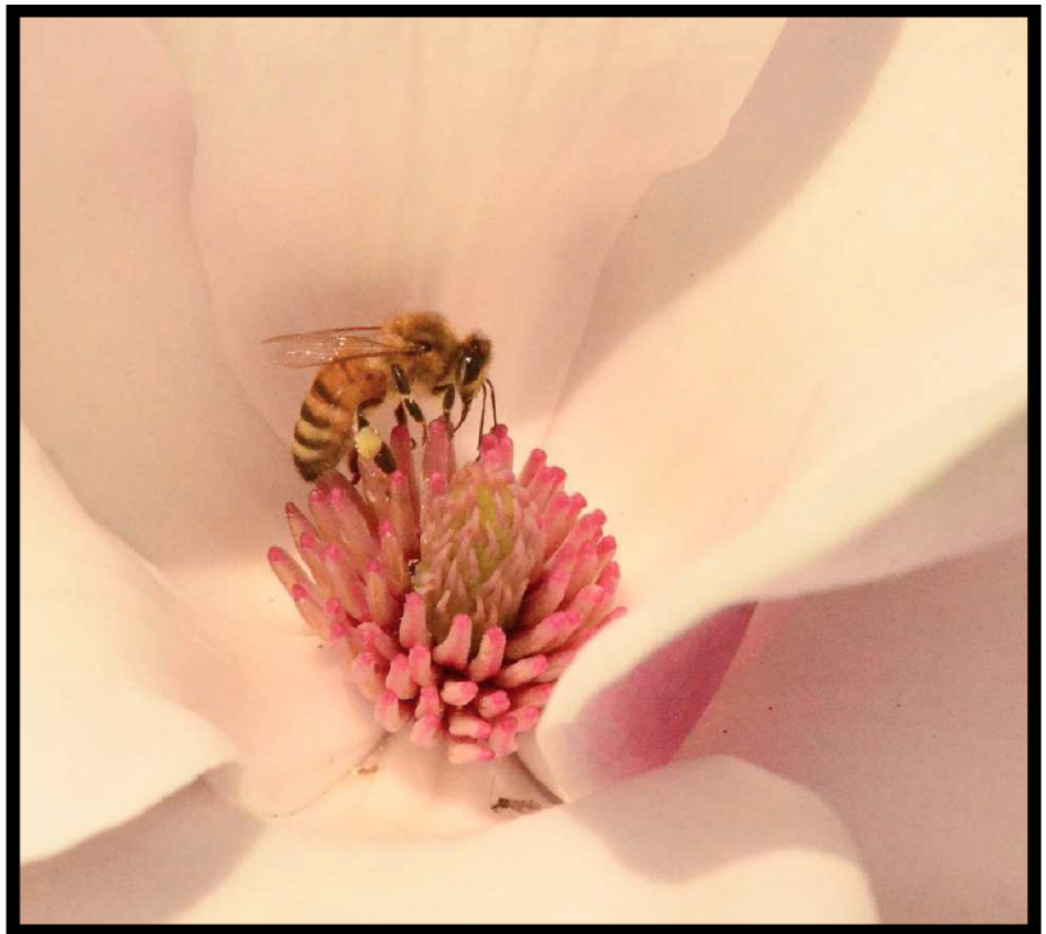
- CLSI:** (US Clinical Laboratory Standard Institute)
- cm:** Centímetro/s
- CN:** Caldo nutritivo
- Col:** Colaboradores
- csp:** Cantidad suficiente para
- dNTPs:** 2'-deoxirribonucleósidos 5-trifosfato
- DO:** Densidad óptica
- Dso:** *Double-strand origin* (Origen de replicación doble hebra)
- EDTA:** Acido etilen-diamino-tetra-acético
- EFB:** *European Foulbrood* (loque europea)
- ERIC:** *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequences* (secuencias intergénicas consenso repetitivas de Enterobacteriaceae)
- ET:** Eficiencia de transformación
- FC:** Frecuencia de conjugación
- FISH:** *Fluorescence in situ hybridization* (hibridación in situ por fluorescencia)
- FT:** Frecuencia de transformación
- G:** Guanina
- g:** Gramo/s
- GenBank:** *National Center for Biotechnology Information, Rockville Pike, Bethesda, EE.UU.*
- h:** Hora/s
- H₂Od:** Agua destilada
- H₂Obd:** Agua bidestilada
- I:** Intermedio/s (a antibiótico/s)
- IG:** Región intergénica
- Kb:** Kilobase/s
- Kda:** Kilo Dalton/s
- l:** Litro/s
- LB:** Luria Bertani (medio de cultivo)
- LPS:** Lipopolisacárido
- M:** Molar
- Mda:** Megadalton/s
- MH:** Müller-Hinton (medio de cultivo)
- MEB:** Microscopio electrónico de barrido / microscopía electrónica de barrido
-

- MET:** Microscopio electrónico de transmisión / microscopía electrónica de transmisión
- mg:** Miligramo/s
- min:** Minutos
- ml:** Mililitro/s
- mM:** Milimolar
- Mn:** Minociclina
- MYPGP:** *Müller-Hinton – Yeast –Peptone – Glucose – Pyruvate* (medio de cultivo Müller-Hinton –extracto de levadura-perptona- piruvato-glucosa)
- N:** Normal
- ND:** No determinado
- ng:** Nanogramos
- NI:** No inducible
- nm:** Nanómetros
- nmol:** Nanomol
- NRRL:** Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, EE.UU.
- No.** Número
- NO₂⁻:** Nitritos
- NO₃⁻:** Nitratos
- N₂:** Nitrógeno molecular
- N₂O:** Oxido nitroso
- NH₃:** Amoníaco
- NH₄⁺:** Ión amonio
- OIE:** *Office Internacional des Epizooties* (Organización Mundial de salud animal)
- oriT:** Origen de transferencia
- ORF:** *Open Reading Frame* (marco de lectura abierta)
- OTC:** Oxitetraciclina
- pb:** Pares de bases
- PBS:** Buffer fosfato salina (solución)
- PCR:** *Polymerase Chain Reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)
- PFGE:** *Pulse field Gel Electrophoresis* (electroforesis en campo pulsante)
- PM:** Peso molecular
- pmol:** Picomol
- QS:** *Quorum sensing*

- R:** Resistente/s (a antibiótico/s)
- RAPD:** *Randomly Amplified Polymorphic DNA* (amplificación al azar de ADN polimórfico)
- RCR:** *Rolling circle replication* (Replicación tipo círculo rodante)
- REFP:** *Restriction Endonuclease Fragment Profile* (patrones de fragmentos de restricción por endonucleasas)
- RFLP:** *Restriction Fragments Length Polymorphism* (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción)
- rep-PCR:** *Repetitive element PCR fingerprinting* (Amplificación por PCR de elementos Repetitivos)
- REP:** *Repetitive extragenic palindromic sequences* (secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas)
- RNAsa:** Ribonucleasa
- rpm:** Revoluciones por minuto
- rRNA:** Acido nucleico ribosomal
- S:** Coeficiente de similitud
- S:** Sensible/s (a antibiótico/s)
- s:** Segundo (s)
- SAG:** Servicio Agrícola Ganadero, Chile.
- SD:** *Standard Deviation* (desviación standard)
- SDS:** *Sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sodio)
- SDS-PAGE:** *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de Sodio Dodecil Sulfato bajo condiciones reductoras)
- SM:** Solución madre
- Sso:** *Single-strand origin* (cadena retrasada o de simple hebra)
- sol:** Solución
- Syn:** Sinonimia
- T:** Timina
- Taq:** *Thermus aquaticus*
- tRNA:** Acido ribonucleico de transferencia
- TBE:** Tris borato EDTA
- Tc:** Tetraciclina
- TE:** Tris - EDTA
-

- TES:** Tris - EDTA - NaCl
- THG:** Transferencia horizontal de genes
- TS:** Triptona soya (medio de cultivo)
- TSA:** agar triptona soya (medio de cultivo)
- ufc:** Unidades formadoras de colonias bacterianas
- UFP:** Unidades formadoras de placas
- UPGMA:** *Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages* (análisis de agrupamientos por ligamiento promedio)
- U:** Unidad enzimática
- UV:** Luz ultravioleta
- V:** Volts
- vf:** Volumen final
- V-P:** *Voges-Proskauer test*
- WT:** *Wild type* (cepa salvaje)
- µg:** Microgramo/s
- µl:** Microlitro/s
- µm:** Micrometro/s
- µM:** Micromolar
- 16S rDNA:** Subunidad del ADN ribosomal 16S rDNA
- 16S rDNA-RFLP:** Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción del gen que codifica para la subunidad 16S del RNA ribosómico
- °C:** Grados centígrados
- %:** Porcentaje
- % p/v:** Porcentaje peso en volumen
- % v/v:** Porcentaje volumen en volumen

RESUMEN



Resumen

La enfermedad más grave de la etapa larval de las abejas (*Apis mellifera* L.) es la loque americana, causada por la bacteria esporulada Gram (+) *Paenibacillus larvae*. Es muy contagiosa y posee problemas únicos para su prevención y control debido a que las esporas bacterianas mantienen su capacidad infectiva durante tiempo prolongado y sobreviven bajo condiciones ambientales adversas, no existiendo brotes estacionales ya que se manifiesta en cualquier época del año con la condición que haya cría presente en la colmena. La enfermedad tiene difusión mundial y aparece en la lista de enfermedades de la OIE (Office International des Epizooties - Organización Mundial de la Salud Animal), que incluye enfermedades transmisibles que son consideradas de impacto socio-económico y/o de importancia para la salud pública entre países y que influyen negativamente en el comercio internacional de animales y productos de origen animal. En la Argentina se la detectó por primera vez en 1989 y actualmente está ampliamente diseminada en todas las áreas productoras de miel.

Con el objeto de estudiar la diversidad de *Paenibacillus larvae* se aplicaron procedimientos de microbiología clásica y de biología molecular para caracterizar una colección de 455 cepas del patógeno. El cepario de trabajo se conformó con 106 aislamientos obtenidos de larvas de abejas con síntomas de la enfermedad, con 307 cepas aisladas de mieles contaminadas de distintos orígenes geográficos, 21 cepas provistas por otros laboratorios y 21 cepas de Colecciones Internacionales. Se identificaron 54 aislamientos de restos larvales y/o escamas con síntomas clínicos de la enfermedad y 252 aislamientos de mieles provenientes de distintas localidades de la Argentina. A partir de material de panales con síntomas clínicos remitidos por investigadores de otros países, se obtuvieron 52 aislamientos conformados por 3 aislamientos de Alemania, 5 de Francia, 5 de Italia, 9 de N. Zelanda, 6 de Polonia, 11 de Sudáfrica, 4 de Suecia, 1 de Túnez y 8 de Uruguay. Adicionalmente se aislaron 18 cepas de mieles de Italia, 17 de mieles de EE.UU., 7 de mieles de Francia, 5 de mieles de España, 3 de mieles de Canadá, 2 de mieles de Sudáfrica, 1 de miel de Brasil, 1 de miel de Túnez y 1 de miel de Panamá conformando un total de 55 cepas obtenidas de mieles de otros países productores. Fueron recibidas como cultivo 42 cepas: 2 de Argentina, 2 de Bélgica, 2 de Chile, 2 de Japón, 3 de Inglaterra, 4 de República Checa, 10 de EE.UU. y 13 de origen desconocido. Si bien la colección estuvo integrada por un alto número de cepas provenientes de Argentina (n= 308) el trabajo se

realizó también sobre un número considerable de cepas (n=147) de otros orígenes que resultó adecuado para los estudios de diversidad. Adicionalmente, con el fin de incluir controles, se emplearon 5 cepas de Colecciones Internacionales que en la actualidad se clasifican como *Paenibacillus larvae* pero que pertenecían a la anterior subespecie *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvificiens* (1 de EE.UU., 1 de Canadá, 1 de Francia y 2 de origen desconocido). Otras cepas de este grupo proveniente de EE.UU. fueron gentilmente cedidas por el Dr. D. P. Stahly para los estudios con el bacteriófago PPL1c del capítulo III.

Se constituyó un segundo cepario con una colección de 282 aislamientos bacterianos de otras especies esporuladas aerobias conformado por 129 aislamientos de *Bacillus cereus*, 62 de *Paenibacillus alvei*, 52 de *Bacillus megaterium*, 8 de *Bacillus mycoides*, 6 de *Bacillus subtilis*, 6 de *Lysinibacillus sphaericus*, 5 de *Bacillus thuringiensis*, 5 de *Brevibacillus laterosporus*, 5 de *Bacillus circulans*, 2 de *Bacillus licheniformis*, 1 de *Bacillus polymyxa* y 1 de *Bacillus pumilus*. Adicionalmente, se emplearon 41 cepas recibidas de Colecciones Internacionales y pertenecientes a distintas especies de los géneros *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Lysinibacillus* y *Virgibacillus*.

En el Capítulo II se caracterizaron las 455 cepas de *Paenibacillus larvae* mediante técnicas microbiológicas. El agregado de ácido nalidíxico al medio de cultivo a una concentración final de 9 µg/ml resultó adecuado para la obtención de cultivos puros de *Paenibacillus larvae* evitando el sobredesarrollo del saprobio *Paenibacillus alvei* comúnmente presente en las larvas de abejas. Con respecto a los aislamientos provenientes de muestras de mieles, el agregado de la combinación de antibióticos ácido nalidíxico y ácido pipemídico al medio MYPGP permitió obtener colonias de *Paenibacillus larvae* y mayormente inhibió el desarrollo de otras especies esporuladas presentes en este tipo de muestras, ya que más del 80% de las muestras analizadas contenía más de una especie bacteriana resistente al tratamiento de *shock* térmico de 80 °C. Independientemente del origen geográfico y/o floral de las mieles analizadas aquí, las especies esporuladas aerobias encontradas con mayor frecuencia han sido *Paenibacillus larvae*, *Paenibacillus alvei*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus pumilus*. Paralelamente y, en menor proporción, se hallaron cepas de *Brevibacillus laterosporus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans*, *Paenibacillus polymyxa*, *Lysinibacillus sphaericus* y *Bacillus licheniformis*. Mientras que *Paenibacillus larvae* y *Paenibacillus alvei* están asociados con enfermedades de las abejas, *Bacillus cereus* y *Bacillus megaterium* son especies ubicuas frecuentes en todo tipo de suelos,

sus esporas sobreviven la distribución en polvos y aerosoles siendo vehiculizadas desde estos lugares a otros hábitats como las superficies florales. Paralelamente, *Bacillus megaterium* junto con *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans* y *Paenibacillus alvei* son las especies predominantes en los tractos digestivos de larvas, abejas adultas y heces de las mismas. También en este capítulo, se determinó que la configuración superficial de las esporas bacterianas vistas al MEB resultó coincidente con lo descrito por otros autores para cada una de las especies analizadas.

En el capítulo III se demostró que el bacteriófago PPL1c resultó una herramienta útil para la identificación y diferenciación rápida de cepas de *Paenibacillus larvae*, como complemento de otras características fenotípicas. El fago mostró ser altamente específico a nivel de especie encontrándose un 98 % de cepas de *Paenibacillus larvae* susceptibles al mismo mientras que el resto de las especies de *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Lysinibacillus* y *Virgibacillus* resultaron resistentes.

En el capítulo IV se estableció que la técnica de rep-PCR resultó adecuada para determinar la variabilidad de las poblaciones de *Paenibacillus larvae* dónde se halló una alta homogeneidad genética. El empleo de los cebadores BOX y REP reveló la existencia de 4 perfiles de *fingerprints* a los cuales denominamos A, B, C y D respectivamente, mientras que las cepas de colección pertenecientes al ex. grupo *pulvificiens* mostraron el perfil distintivo E. Cuando se emplearon los cebadores ERIC, con excepción de algunas cepas provenientes de Colecciones Internacionales, todos los aislamientos obtenidos de larvas y mieles presentaron un perfil ERIC-I coincidente con lo descrito también por otros investigadores y sólo se halló el perfil ERIC-II en cepas pigmentadas enviadas de la Colección del SAG. Mientras que el perfil ERIC-I es el de mayor distribución a nivel mundial, el perfil ERIC-II ha sido citado en Alemania, Finlandia, Suecia y Austria y, muy recientemente, en muestras de Canadá y Nueva Zelanda. Las cepas pertenecientes al perfil ERIC I estudiadas en esta tesis a su vez se subdividían en alguno de los 4 perfiles BOX (A, B, C o D) y presentaban colonias "típicas" de *Paenibacillus larvae* no pigmentadas, de color entre blanquecino y grisáceo y formas ligeramente rugosas en agar MYPGP y en agar Columbia suplementado con sangre ovina (Capítulo II). Por otra parte las cepas de colección del grupo ex *pulvificiens*, analizadas aquí (n=5) presentaron un perfil ERIC-IV / BOX-E. Si bien en este trabajo no se encontró ningún representante del genotipo ERIC-II, a excepción de los cultivos enviados por el SAG, el mismo pudo haber pasado inadvertido en el análisis de mieles debido a la alta contaminación de las mismas con otras

especies esporuladas Gram (+) que hizo imprescindible someter a las muestras a un shock térmico previo al aislamiento en medios semi-selectivos. En el capítulo IV también se concluyó que el gen 16S rRNA es polimórfico entre las especies esporuladas aerobias comúnmente presentes en la miel, no obstante, no se detectaron polimorfismos a nivel intra-especie en las cepas de *Paenibacillus larvae* de distintas regiones geográficas cuando se emplearon las endonucleasas (*AluI*, *MspI*, *HaeIII*, *CfoI*, *RsaI* y *TaqI*).

En cuanto a las comparaciones entre perfiles de rep-PCR y RFLP se observó que los 4 patrones de BOX-PCR observados (A, B, C y D) y los fingerprints ERIC-I y ERIC-II se correlacionaron con el perfil A obtenido por *HaeIII*, mientras que las cepas de colección que mostraron un perfil BOX-E y un perfil ERIC-IV se correlacionaron con el perfil B obtenido con la endonucleasa *HaeIII*. Lo mismo ocurrió con la enzima *HinfI* donde las cepas pertenecientes a los perfiles ERIC-III y BOX-E mostraron un patrón B y las cepas con perfiles ERIC-I o ERIC-II y BOX-A, BOX-B, BOX-Cy BOX-D no presentaron un sitio de corte con esta endonucleasa.

En el capítulo V se seleccionó un subconjunto de aislamientos de *Paenibacillus larvae* de distintos orígenes geográficos y perfiles de *fingerprints* para determinar la sensibilidad/resistencia a tetraciclina y oxitetraciclina mediante las técnicas de CIM y de difusión en agar. La distribución de la sensibilidad por CIMs de la población bacteriana analizada varió entre 0,062 y 128 µg/ml de Tc sugiriendo una distribución bimodal con dos sub-poblaciones que claramente difirieron en su sensibilidad, con 76% de cepas S (CIM entre 0,062 y 2 µg/ml) y 24 % de cepas dentro del rango de la zona I y R. Las cepas I provenían en su mayoría de Argentina y las S cuyos valores de CIM resultaron los más bajos, de países europeos, lo cual es esperable dado que en casi toda la UE está prohibido el uso de antibióticos en apicultura, mientras que en países como EE.UU., Canadá y Argentina, entre otros, es usual el empleo de OTC para el control de loque americana en las colmenas afectadas.

Al comparar las CIM obtenidas por E-test con las obtenidas por dilución en agar, en el caso de agar Iso-Sensi Test hubo concordancia de categoría del 100 %, encontrándose la misma proporción de cepas susceptibles y resistentes que por la técnica de dilución en agar; pero al emplear MYPGP hubo concordancia de categoría del 81,81 %. Se concluye entonces que la combinación de las tiras de E-Test con el agar ISO-Sensi Test representa una alternativa válida para determinar las CIM de tetraciclina en cepas de *Paenibacillus larvae*. Es importante destacar que todas las cepas de *Paenibacillus larvae* ensayadas mostraron un desarrollo confluyente en Iso-Sensi test, el cual podría usarse también como medio alternativo para el

desarrollo de las células vegetativas de este patógeno.

Se obtuvieron las secuencias completas de los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395. Dichas secuencias se depositaron en el GenBank con los números de acceso KF 433938 para pPL373, KF 536616 para pPL374 y KF440690 para pPL395, provenientes de las cepas PL373, PL374 y PL395, respectivamente que presentaban resistencia a Tc y OTC. Hemos demostrado experimentalmente la transferencia del plásmido pPL374 en la cepa de *Bacillus subtilis* m351 y del plásmido pPL373 en la cepa de *Bacillus subtilis* GSY1104 mediante conjugaciones en medio líquido. Al examinar ambas cepas dadoras de *Paenibacillus larvae* PL373 y PL374 mediante la técnica de lisis *in situ* se observaron dos plásmidos de aproximadamente 5.000 bp y 8.000 bp, pero sólo el plásmido más pequeño era el que contenía el gen de resistencia a Tc. Luego de efectuar la secuenciación completa de los plásmidos más pequeños obtenidos de las cepas pPL373 y pPL374, respectivamente confirmamos que el gen de resistencia es el *tetL* y no el *tetK* como creímos en un principio y que ambos replican por el mecanismo de círculo rodante encontrado en pequeños plásmidos movilizables de alto número de copias presentes en bacterias Gram (+). Todos los experimentos de movilización por conjugación empleando la cepa PL395 que contiene un único plásmido de 5.000 bp denominado pPL395 resultaron infructuosos, no obstante el ADN plasmídico obtenido de la cepa PL395 si pudo transferirse por electroporación a una cepa de *Paenibacillus larvae* Tc^S. Los plásmidos pPL373 y pPL374 también pudieron transferirse por electroporación a la misma cepa de *Paenibacillus larvae* Tc^S. En todos los casos los plásmidos se mantuvieron en forma estable en sus respectivos aceptores. Los plásmidos más grandes contenidos en las cepas PL373 y PL374, podrían codificar para funciones conjugativas y, al coexistir en la misma cepa bacteriana aportarían a los plásmidos movilizables pPL373 y pPL374 las funciones conjugativas necesarias para su movilización por conjugación; por lo que se justifica estudiarlos en profundidad y secuenciarlos para clarificar los mecanismos de transmisión plasmídica de *Paenibacillus larvae* en la naturaleza. La presencia de plásmidos con secuencias muy similares aislados de bacterias Gram (+) provenientes de distintas zonas geográficas y de distintos nichos ecológicos (suelo, hábitats marinos, alimentos) de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Sporosarcina*, *Lactobacillus* y *Bhargavaea* nos sugieren que los genes *mob* presentes en dichos plásmidos pueden estar involucrados en una exitosa THG. El uso extensivo de Tc y OTC para el control de loque americana en algunos países de América pudo haber contribuido al incremento del número de cepas resistentes de *Paenibacillus larvae*, favoreciendo la transferencia de estos plásmidos entre cepas del mismo patógeno o desde o hacia otras

especies de bacterias Gram (+) de los géneros *Lactobacillus*, *Bacillus* y *Paenibacillus* que pertenecen a la microbiota de la colmena (miel, tractos digestivos de abejas adultas y larvas, superficies florales y polen). El uso prolongado de tetraciclina en las colmenas afectadas por loque americana y otras enfermedades bacterianas estaría favoreciendo la ocurrencia de eventos de transferencia genética horizontal como se demostró en cepas del patógeno provenientes de EE.UU.

Abstract

American foulbrood (AFB) is considered as the most destructive infectious disease affecting the larval and pupal stages of honeybees (*Apis mellifera* L.). The causative agent is *Paenibacillus larvae*, a Gram-positive spore-forming bacterium. AFB occurs in temperate or sub-tropical regions throughout the world and provokes losses not only in apicultural economy but also in pollination rate, since *A. mellifera* is the pollinator that is used the most worldwide. It is a highly contagious and virulent disease, and in many countries it is a notifiable disease. It is listed in the OIE (Office International des Epizooties – the World Organization for Animal Health) *Terrestrial Animal Health Code* and member countries and territories are obligated to report its occurrence. AFB can appear and spread quickly through a colony and if it is left untreated, in a short time it may lead to the hive death. It was first reported in Argentina in 1989 and since then the disease spread within most honey producing areas of the country.

The diversity of 455 strains of the pathogen *P. larvae* was characterized by means of classical microbiological as well as molecular methods. The collection is composed by 106 isolates obtained from larvae with clinical signs of the disease and 307 isolates that were obtained from honey samples from diverse geographical origins. In addition, the microorganisms analyzed included 21 strains provide from several labs around the world and 21 isolates deposited in International Collections.

Fifty-four isolates were identified from larval remains or scales with clinical signs of AFB and 252 isolates were obtained from honeys from different producing areas of Argentina. Fifty two isolates were isolated from brood samples from South Africa (11), New Zealand (9), Uruguay (8), Poland (6), France (5), Italy (5), Sweden (4), Germany (3) and Tunisia (1). Sixty one strains were isolated from honeys from Italy (18), USA (17), France (7), Spain (5), Canada (3), South Africa (2), Brazil (1) and Panama (1). Although the collection included a high number of strains from Argentina (n=308), a considerable number of strains (n=147) provided samples from other countries, which is particularly interesting to study diversity. In addition 5 strains from International Collections today classified as *Paenibacillus larvae* but previously considered as *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvificiens* were included for controls. Other strains from this group were kindly provided by Dr. D. P. Stahly for the bacteriophage studies on Chapter III .

Other spore-forming Gram positive aerobic bacteria collection of 282 isolates from apiarian sources included representatives of the following species: *Bacillus cereus* (129) *Paenibacillus alvei*

(62), *Bacillus megaterium* (52), *Bacillus mycoides* (6), *Bacillus subtilis* (6), *Lysinibacillus sphaericus* (6), *Bacillus thuringiensis* (5), *Brevibacillus laterosporus* (5), *Bacillus circulans* (5), *Bacillus licheniformis* (2), *Bacillus polymyxa* (1) y *Bacillus pumilus* (1). Forty one strains were received from International Collections belonging to different species of the genera *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Lysinibacillus* and *Virgibacillus*.

In Chapter II, 455 isolates of *P. larvae* were characterized by colony appearance in different culture media, physiological and biochemical reactions and microscopic examination of stained bacterial smears. By means of the surface configuration of bacterial spores observed by SEM, the most common spore-forming species founded in apiarian sources were clearly differentiated. *P. larvae* was successfully isolated from mixed spore populations of *P. larvae* and *P. alvei* which were found in larval remains by incorporating to the culture medium nalidixic acid at a final concentration of 9 µg/ml. The high incidence of *P. alvei* in larval samples could indicate its presence as a common inhabitant of hives. *P. alvei* multiplies in a saprophytic manner on the dead remains of larvae killed by AFB, EFB or other causes.

In the case of honey samples, the addition of both nalidixic acid and pipemidic acid to the isolation media inhibited the development of other spore-forming species that resisted the heat treatment of 80 °C. Regardless the geographical and/or botanical origin of honeys, the most frequent spore-forming bacteria founded were *P. larvae*, *P. alvei*, *B. cereus*, *B. megaterium* and *B. pumilus* and, in a minor proportion *B. laterosporus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. circulans*, *P. polymyxa*, *L. sphaericus* and *B. licheniformis*. While *P. larvae* and *P. alvei* are associated with diseases of honeybees, *B. cereus* and *B. megaterium* are ubiquitous species and common in all types of soil, their spores survive in dust and aerosols being carried from these sites to other habitats such as floral surfaces. In addition, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. circulans* and *P. alvei* are dominant in the digestive tracts of larvae and adult bees and their faeces.

In Chapter III it was demonstrated that the bacteriophage PPL1c is a useful tool for identifying *P. larvae* as a supplement to cultural, biochemical, and genotypic characteristics. Nearly all (98 %) of *P. larvae* strains were sensitive to the PPL1c while other species in the genera *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Lysinibacillus*, *Virgibacillus* and *Paenibacillus* were resistant to the phage (absence of lysis).

In Chapter IV the DNA fingerprint analysis of *P. larvae* collection by means of BOX- and REP-primers showed that all the isolates were represented by 4 genotypes named A, B, C, and D, while the strains belonging to the previous group *pulvificiens* showed a distinct genotype called

E. On the other hand, PCR typing with ERIC- primers showed that all the isolates obtained from larvae and honey belonged to ERIC-I genotype. Only 5 pigmented strains from the SAG Collection belonged to ERIC-II genotype. While ERIC-I profile is the most widely distributed worldwide, ERIC-II profile has been reported in Germany, Finland, Sweden and Austria and, most recently, in samples from Canada and New Zealand. In addition, the strains belonging to ERIC-I studied in this Thesis are subdivided into any of the 4 BOX groups (A, B, C or D) and showed "typical" non-pigmented *P. larvae* colonies (whitish to grey and slightly rough) when cultured in MYPGP agar or Columbia agar supplemented with sheep blood (Chapter II). Moreover, all the strains previously classified as *P. l. subsp. pulvifaciens* showed a profile ERIC-IV and BOX-E. Furthermore the analysis of the 16S rDNA sequence showed that it is polymorphic among the aerobic spore-forming species predominant in apiarian sources. However, there are not intraspecies polymorphisms among the strains of *P. larvae*. When comparing rep-PCR profiles and RFLP patterns, the patterns BOX-A, BOX-B, BOX-C and BOX-D and also ERIC-I and ERIC-II were correlated with *AluI* pattern A, while patterns BOX-E and ERIC-III were correlated with *HaeIII* pattern B.

In Chapter V a representative group of *P. larvae* strains from different geographical areas that have different rep-fingerprinting patterns were selected to determine their sensitivity to tetracycline (Tc) and oxytetracycline (OTC). Minimal inhibitory concentrations (MIC) to Tc ranged between 0.062 and 128 µg/ml Tc showing a bimodal distribution with two distinct groups: 76% of sensitive strains (MIC between 0.062 and 2 µg/ml Tc) and 24% of strains within the intermediate or resistant zone (MIC between 4 and 160 µg/ml).

The MIC's of Tc obtained by the Epsilometer test (E-Test) were compared with those obtained by the agar diffusion method by using MYPGP and Oxoid Iso-Sensi-test agars, results showed that a categorical agreement of 100 % was found when using Iso-Sensitest but when MYPGP agar was tested, a category agreement of 81.81 % was found. In conclusion, the E-Test is a rapid and reliable method for testing CIM of *P. larvae* to tetracycline only when used in combination with Iso-Sensi test agar. Iso-sensi test agar was also suitable for supporting the growth of *P. larvae* and can be used as an alternative culture medium.

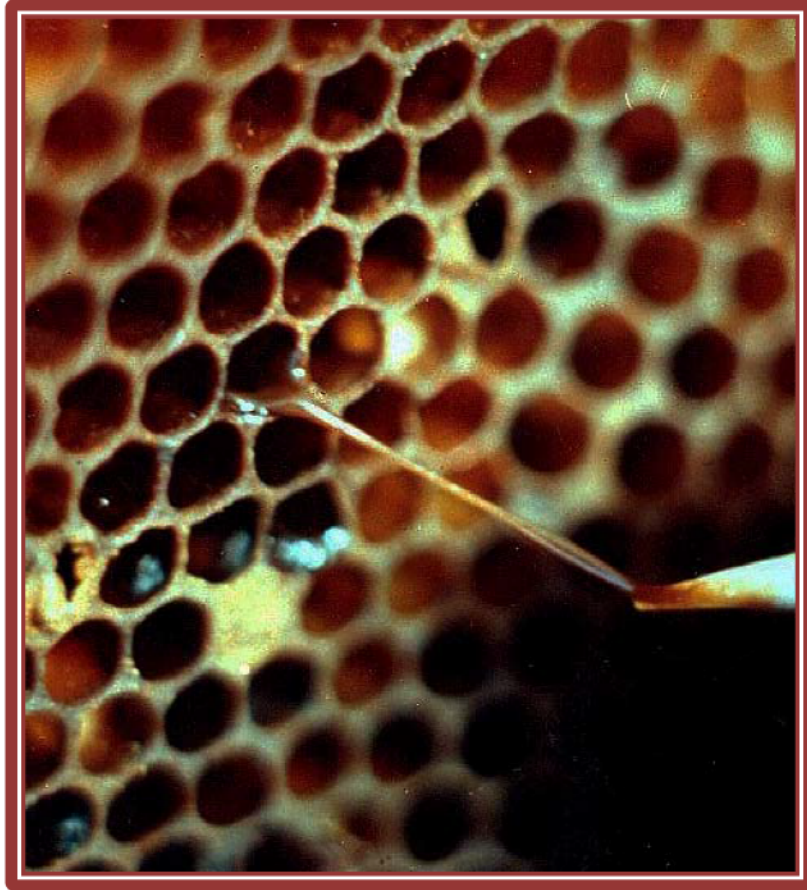
The complete nucleotide sequence of plasmids pPL373, pPL374 and pPL395 isolated from three different *P. larvae* strains exhibiting Tc and OTC resistance were determined and deposited in Genbank. Plasmids pPL373 and pPL374, containing the *tetL* determinant, were transferred by conjugation to two tetracycline-susceptible *Bacillus subtilis* strains suggesting that a conjugation mechanism may be involved in the transference of the resistant phenotype.

BLAST analysis revealed that the nucleotide sequences of pPL373, pPL374 and pPL395 were virtually identical (99%) to those of tetracycline resistance-encoding plasmids pMA67; pBHS24; pBSDMV46A; pDMV2 and pSU1 isolated from *P. larvae*, *Bacillus spp.*, *Bhargavaea cecembensis*, *Bacillus galactosidilyticus* and *Sporosarcina ureae*, respectively.

Furthermore, the 3 identical mobilizable plasmids containing the *tetL*-resistant determinant were successfully transformed into a *P. larvae* tetracycline-susceptible strain. The phylogenetic relationship of *P. larvae* plasmids with other plasmids encoding the gene *tetL* let us speculate that horizontal gene transfer have occurred between *Paenibacillus larvae* and other Firmicutes of the genera *Bacillus*, *Bhargavaea* and *Sporosarcina* from different ecological niches (soils, marine habitats, food) and also *Lactobacillus* and *Bacillus* strains commonly found within the same niche (honey, intestinal tracts of larvae and/or adult bees, floral surfaces and bee brood). In addition, two differences between the 3 plasmids studied here and the previously described pMA67 were found in the site of origin (*oriT*) and in the mobilization (*mob*) genes. Indeed, the predicted Mob proteins of plasmids pPL373, pPL374 and pPL395 are more closely related to the Mob proteins from plasmids pAST4, pBHS24, pSU1, pLS55 and pBSDMV46A with 100% identities than to the Mob protein from plasmid pMA67 (95% identity) indicating differences in mobilization and/or conjugation capacities.

The prolonged use of Tc in honeybee colonies affected by AFB could favor the occurrence of horizontal gene transfer events as showed in *P. larvae* strains from USA.

CAPITULO I



Introducción General y Objetivos

Introducción General

1. La miel y su importancia para la Argentina

La miel es una sustancia dulce producida por las abejas a partir del néctar de las flores que se combina con secreciones glandulares de las mismas. Básicamente está compuesta por agua (17.2%) fructosa (38.4%) y glucosa (30.3%); además contiene sacarosa (1.3%) y otros carbohidratos (12%), minerales (0.169%) y proteínas (169 mg/100g), su pH promedio es de 3.9 (Snowdon & Cliver, 1996).

La República Argentina es el tercer productor de miel a nivel mundial con una producción media de 80.000 toneladas por año, de la cual se exporta alrededor del 95% generando un ingreso aproximado de 200 millones de dólares. Coyunturalmente, debido a problemas sanitarios de la miel proveniente de China, Argentina ha sido en el 2002-2004 el primer exportador mundial; habitualmente es el segundo exportador. En el país existen 3.390.000 colmenas manejadas por 30.000 productores, estimándose que en nuestras áreas agrícolas se podría mantener un stock de 4.500.000 de colmenas. La Provincia de Buenos Aires concentra alrededor del 50% de la producción de miel y registra los mayores rendimientos por colmena (http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/otros/apicola/informes/2013_02Feb.pdf).

En base a lo anterior es claro que la Apicultura Argentina cuenta con un amplio potencial de crecimiento, con ventajas sobre otros tipos de producciones que requieren de distintos tiempos e inversiones.

2. La abeja

Las abejas son insectos pertenecientes al orden Hymenoptera que están estrechamente relacionados con las hormigas y las avispas. Existen alrededor de 4.000 especies de abejas, la mayor parte de las cuales no son insectos sociales sino individuos solitarios. La abeja melífera, del género *Apis*, familia *Apidae*, superfamilia *Apoidea* vive en colonias, que no son más que grandes familias de insectos sociales. Hay varias especies, subespecies, razas y subrazas de abejas melíferas que están adaptadas a su medio ambiente, pero para la apicultura las más importantes son la abeja melífera occidental o abeja doméstica *Apis mellifera* L. originaria de Europa, África y parte de Asia la cual fue introducida en América y Oceanía y la abeja melífera

oriental *Apis cerana* F. que habita en Asia meridional y oriental. En la naturaleza y, como resultado de la migración natural y las introducciones producidas por el hombre, se produjo un cruzamiento entre dos subespecies de la abeja melífera occidental: la abeja africana (*A. m. scutellata*) y abejas domésticas de Sudamérica pertenecientes a varias subespecies de *A. mellifera* como *A. m. mellifera*, *A. m. ibérica* y posiblemente otras. La abeja africanizada se encuentra en Sudamérica y Centroamérica y en algunos estados de los Estados Unidos de América (Bailey & Ball, 1991; Morse & Nowogrodzki, 1990).

2.1. La colmena de abejas

Una colmena de abejas se compone de un enjambre de varios miles de individuos que tiene un complejo sistema de división de tareas. La población de una colmena varía de acuerdo con la época del año entre un mínimo de 10.000 individuos al final del invierno y más de 60.000 a mediados del verano (Morse & Nowogrodzki, 1990). La colmena se compone de tres castas de abejas: una única reina que es una hembra sexualmente desarrollada responsable de la postura de los huevos, miles de obreras que son hembras estériles y un número variable de zánganos que son machos sexualmente desarrollados. La reina deposita huevos fecundados (diploides) y sin fecundar (haploides) en las celdas del panal que además son utilizadas para almacenamiento del polen y de la miel. El ciclo de vida de la especie *A. mellifera* se completa, desde la postura del huevo hasta el desarrollo del adulto, en 16, 21 y 24 días para una reina, una obrera y un zángano, respectivamente lo que depende además de la alimentación suministrada por las nodrizas y de si el huevo está fecundado o no. El desarrollo de las tres castas de abejas comprende una transición a través de cuatro estadios: huevo, larva, pupa y adulto. En el caso de una obrera, el ciclo comienza con el desarrollo embrionario que se produce en 3 días durante los cuales se va formando la larva a expensas de las reservas que se encuentran, junto al óvulo fecundado por la reina, dentro de un huevo que ella deposita en posición vertical en una celdilla que fue previamente limpiada por las obreras. Luego de este período las nodrizas nutren a la larva primero a base de jalea real y después con un alimento compuesto por miel y polen; esta etapa de nutrición dura 6 días al cabo de los cuales la celdilla es sellada con un fino tapón de cera de forma convexa (operculación). Dentro de la celdilla sellada se produce la metamorfosis por la cual la larva cambia su apariencia agusanada en lo que será la abeja adulta. Durante los 2-3 días previos a este cambio, la larva permaneció quieta en posición vertical y su tubo digestivo evacuó, dentro de la celdilla tapada, todos los restos que no han sido aprovechados en la digestión, etapa que se conoce como "prepupa". En esta

etapa, el tejido del intestino y la cubierta externa del individuo cambian (Puerta Puerta *et al.*, 2001). Posteriormente, la pupa endurece la cutícula que la envuelve en un período de aproximadamente 10 días, al cabo del cual, emerge como obrera adulta (Figura 1). En ese momento, las abejas obreras limpian la celda rápidamente para que esté disponible para su reutilización. En resumen: hay dos tipos de cría: 1) Cría abierta conformada por huevos y larvas y 2) cría cerrada (operculada) conformada por prepupas y pupas.

POSTURA	ETAPA LARVAL	OPERCULACION	
Desarrollo del huevo	Nutrición de la larva	Inicio de la metamorfosis	Emergencia del adulto



Figura 1: Esquema del desarrollo en la abeja obrera. Tomado de: Puerta y col. (2001)

Además del modo de reproducción individual dónde la reina virgen es fecundada por única vez por varios zánganos, para comenzar de esta forma su ciclo de postura hasta el final de su vida, existe un nivel de reproducción a nivel de la colonia denominado "enjambrazón" dónde la reina más vieja abandona la colonia junto con un grupo de obreras para conformar una nueva colonia (Seeley, 1985).

3. Enfermedades de las abejas

Las abejas como la mayoría de los organismos vivos son susceptibles a una serie de enfermedades, parásitos y predadores que pueden tener un efecto adverso en el normal desarrollo y producción de la colmena.

Virus, bacterias, hongos y microsporidios son los principales agentes causales de enfermedades en las abejas, mientras que los parásitos más importantes son los ácaros como *Varroa destructor* y *Acarapis woodi*.

3.1. Inmunidad individual

En la abeja como en el resto de los insectos, la primera línea de defensa contra las infecciones producidas por los diferentes agentes patógenos es física: por fuera la cutícula y por dentro del insecto la membrana peritrófica que rodea al intestino. Una vez que estas barreras son franqueadas, se producen una serie de reacciones complejas a nivel humoral y celular en los tejidos y en el hemocelo que pueden resultar en una rápida eliminación del microorganismo (Dunn, 1986). Este mecanismo de defensa permite detectar al agente infeccioso y activar el set de respuestas inmunes para controlar la infección, como por ejemplo secreción de péptidos antimicrobianos, fagocitosis, melanización y degradación enzimática del patógeno. El aspecto mejor caracterizado de esta respuesta es la síntesis de péptidos inmunes a la acción de las proteinasas producidas en la hemolinfa por los patógenos bacterianos, entre ellas se citan apidaecinas, abaecina, himenoptaecina, defensinas y lisozima (Evans, 2004; Jarosz & Glinski, 1990; Otvos, 2000).

Estudios comparativos entre el genoma de *A. mellifera* y los de *Drosophila* y *Anopheles* reveló que las abejas sólo poseen una tercera parte de los genes relacionados con la inmunidad. Esta disminución en la capacidad de inmunidad individual refleja o bien la fortaleza de su sistema de inmunidad social o bien una tendencia a ser afectadas por un número muy limitado de patógenos (Evans, 2004), o ambos.

3.2. Inmunidad social y transmisión de patógenos

El hecho de que la abeja melífera sea un insecto social dónde conviven varias generaciones es un factor epidemiológico importante que contribuye a que las enfermedades se distribuyan tanto de forma horizontal (entre colmenas) como vertical dentro de las generaciones de una misma colmena (Fries & Camazine, 2001). La transmisión horizontal se refiere a la transmisión del patógeno entre individuos dentro de una misma generación que sería equivalente a la transmisión entre colmenas de abejas mediante el pillaje bajo condiciones naturales y mediante el intercambio de material contaminado entre colmenas por acción del apicultor. La transmisión vertical se refiere a la transmisión del patógeno entre individuos de diferentes generaciones, que en el caso de las abejas equivale a la transmisión desde una colmena "madre" hacia su enjambre. La forma de transmisión (horizontal versus vertical) del agente patógeno entre los hospedantes permite determinar la virulencia de dicho patógeno en los insectos (Fries *et al.*, 2006). Los patógenos que se transmiten horizontalmente tienen un

mayor potencial de desarrollar una mayor virulencia que los que se transmiten en forma vertical.

La respuesta inmune de la colonia de abejas depende de la presión del agente patógeno tanto a nivel individual (abejas, larvas, pupas) como a nivel de la colonia (Cremer *et al.*, 2007). El sistema de inmunidad social es un resultado de la cooperación entre los miembros de la colmena para combatir la infección en la misma; esto comprende comportamiento, fisiología y adaptación de toda la organización de la colonia.

Además de los mecanismos que actúan a nivel individual mencionados anteriormente (3.1), las abejas con el fin de evitar la transmisión y/o dispersión de patógenos a nivel de la colonia han desarrollado variadas estrategias; entre las más estudiadas se cita el comportamiento higiénico que comprende la habilidad de remoción y eliminación de las crías afectadas por diversas enfermedades (Fries & Raina, 2003; Spivak & Gilliam, 1998a, 1998b).

3.3. Enfermedades de origen bacteriano que afectan a las abejas

Las enfermedades de origen bacteriano más importantes que afectan a la etapa larval de las abejas son la loque americana y la loque europea. Estas enfermedades han sido las más estudiadas debido a que ocasionan graves pérdidas económicas a los apicultores. Las enfermedades de origen bacteriano más comunes de la etapa adulta son las septicemias ocasionadas por diversas especies entre ellas *Pseudomonas aeruginosa* y *Hafnia alvei*.

3.3.1. La loque europea

La loque europea también denominada "European Foulbrood" (EFB) no es considerada una enfermedad grave por muchos apicultores (Bailey & Ball, 1991); su primera descripción data del año 1885 (Cheshire & Cheine, 1885). Es de carácter estacional y su importancia varía, siendo particularmente grave en colonias trashumantes, como por ejemplo las que se emplean para la polinización de cultivos que presentan una alta susceptibilidad. Con excepción de Nueva Zelanda, se halla distribuida en todo el mundo (Ellis & Munn, 2005; Matheson, 1993, 1996) pero como no se considera una enfermedad grave, no existen registros precisos sobre su real incidencia. En la Argentina se la detectó en 1959 (Camugli, 1962)

La sintomatología típica de la enfermedad es un aspecto general de "cría salteada" o "cría en mosaico" en los cuadros de cría (Figura 2). Por lo general, afecta larvas sin opercular (entre 4 y 5 días de edad larval). Las mismas toman una coloración amarillenta y luego castaño oscuro. A veces sus tráqueas se tornan visibles, lo cual no ocurre en las larvas sanas de color

blanco perlado. La larvas se secan dando lugar a escamas gomosas e irregulares que no se adhieren a las celdas (Figura 7a). Cuando la larva se estira no forma hilos de más de 2,5 cm. La enfermedad tiene carácter estacional, ataca en primavera o principios de verano y ocasionalmente en otoño.

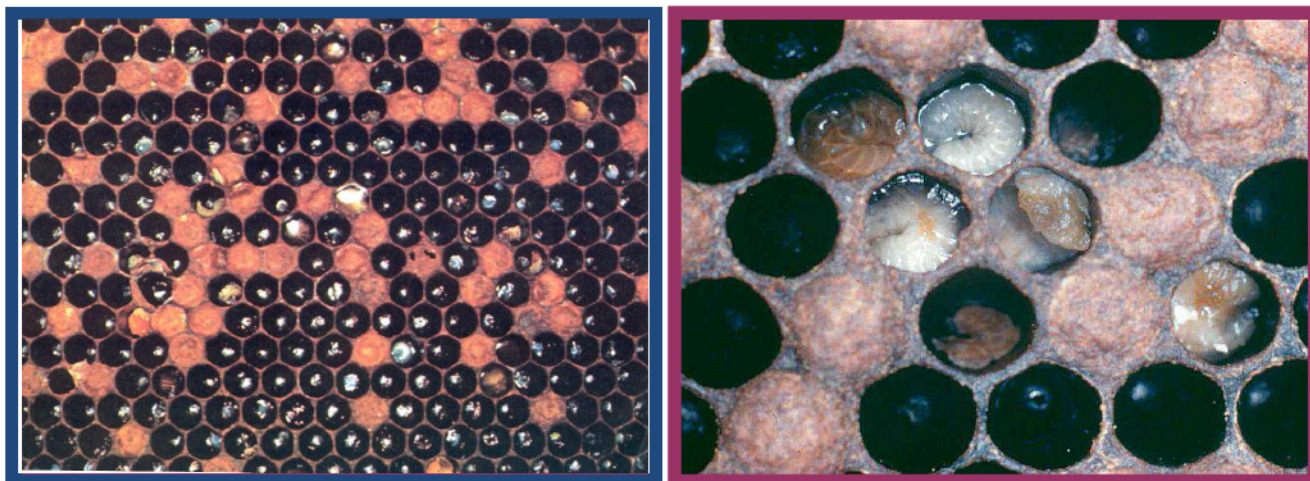


Figura 2: Cuadros de cría mostrando síntomas de loque europea

Su agente causal es una bacteria Gram positiva no esporulada y pleomórfica denominada *Melissococcus plutonius* (Allen & Ball, 1993). Su tamaño oscila entre 0,5-0,7 X 1 μm y se observa bajo la forma de cocos lanceolados dispuestos de a pares o en cadenas a partir de frotis de material larval infectado mientras que en cultivo puede adquirir forma de bastón o bacilo.

M. plutonius es fácil de detectar en los primeros estadios de la enfermedad. La muerte de la larva infectada puede acelerarse en presencia de bacterias secundarias saprobitas, que tienen influencia sobre el olor y la consistencia de la cría muerta. La población bacteriana depende de la época del año y está asociada con el tipo de síntoma que aparece en la colmena, razón por la cual el diagnóstico clínico de campo por sí solo no es confiable para una correcta detección de la enfermedad. Dentro de la variada microbiota que presentan las larvas afectadas por loque europea, se encuentran distintas especies bacterianas además de *M. plutonius*, entre ellas, *Paenibacillus alvei*, *Achromobacter eurydice*, *Brevibacillus laterosporus*, *Paenibacillus apiarius* y *Enterococcus faecalis* (Bailey & Ball, 1991).

Debido a la presencia de una microbiota variable en las larvas afectadas, originalmente se creyó que *Bacillus alvei* era su agente causal (Cheshire & Cheyne, 1885) pero posteriormente White (1912) determinó que se trataba de una especie diferente a la que denominó *Bacillus pluton* que fue finalmente renombrada como *Streptococcus pluton* (Bailey, 1957). Estudios

posteriores indicaron que su ubicación taxonómica dentro del género *Streptococcus* no era correcta por lo que se describió el nuevo género monoespecífico *Melissococcus pluton* (Allen & Ball, 1993; Bailey & Collins, 1982) posteriormente reclasificado como *Melissococcus plutonius* (Truper & de Clari, 1998).

3.3.2. La loque Americana

La loque americana, también conocida como American Foulbrood (AFB), cría pútrida o loque maligna es la enfermedad más grave que afecta a las larvas de las abejas tanto europeas como africanas y asiáticas (Bailey & Ball, 1991; Shimanuki, 1990). Es una de las pocas enfermedades capaces de matar a una colmena y diseminarse a otras aún años después que la misma fue supuestamente erradicada, esto se debe a que puede estar latente en una colonia y aparecer en forma repentina debido a factores de estrés, condiciones externas, resistencia genética o causas desconocidas. Se disemina con mucha facilidad y no existen brotes estacionales debido a que se manifiesta en cualquier época del año con la condición que haya cría presente en la colmena.

El agente causal de la enfermedad es *Paenibacillus larvae* (White) Ash *et al.*, una bacteria Gram positiva que sobrevive frente a condiciones adversas formando esporas que se mantienen viables y con capacidad infectiva por largos períodos (Bailey & Ball, 1991; Morse & Nowogrodzki, 1990). La enfermedad está difundida mundialmente, con excepción de algunos países africanos y del sudeste asiático (Ellis & Munn, 2005; Matheson, 1993, 1996). En la Argentina se la detectó por primera vez en 1989 (Alippi, 1991; 1992a) y en la actualidad se halla ampliamente diseminada en todas las áreas productoras de miel, particularmente en la Provincia de Buenos Aires, donde la incidencia de esporas en miel supera el 50 %.

La enfermedad está clasificada en la lista de la OIE (Office Internacional des Epizooties) que es la Organización Mundial de salud animal, esta lista incluye enfermedades transmisibles que son consideradas de impacto socio-económico y/o de importancia para la salud pública entre países y que influyen negativamente en el comercio internacional de animales y productos de origen animal (http://www.oie.int/esp/maladies/es_classification2007.htm).

3.3.2.1. Sintomatología

La enfermedad se presenta en los cuadros de cría dándole a la misma un aspecto de "cría salteada" a "cría en mosaico" (dispersión de cría operculada entre celdas vacías a diferencia del

aspecto compacto de cría operculada que presenta un cuadro de cría sano). La enfermedad se limita principalmente a larvas que han muerto luego de ser operculadas, aunque también las celdas abiertas pueden contener larvas muertas. Las celdas afectadas presentan los opérculos hundidos y de color castaño oscuro, de apariencia húmeda y con perforaciones irregulares (Figura 3). Si se introduce una aguja o un palillo a través del opérculo, se extrae una masa viscosa de color variable entre amarillento y castaño oscuro, casi negro que se estira más de 2,5 cm (Figura 4). Esta sintomatología de la enfermedad es tan típica que existe una prueba de diagnóstico de campo empleada por los apicultores y se conoce como "prueba de la cerilla".

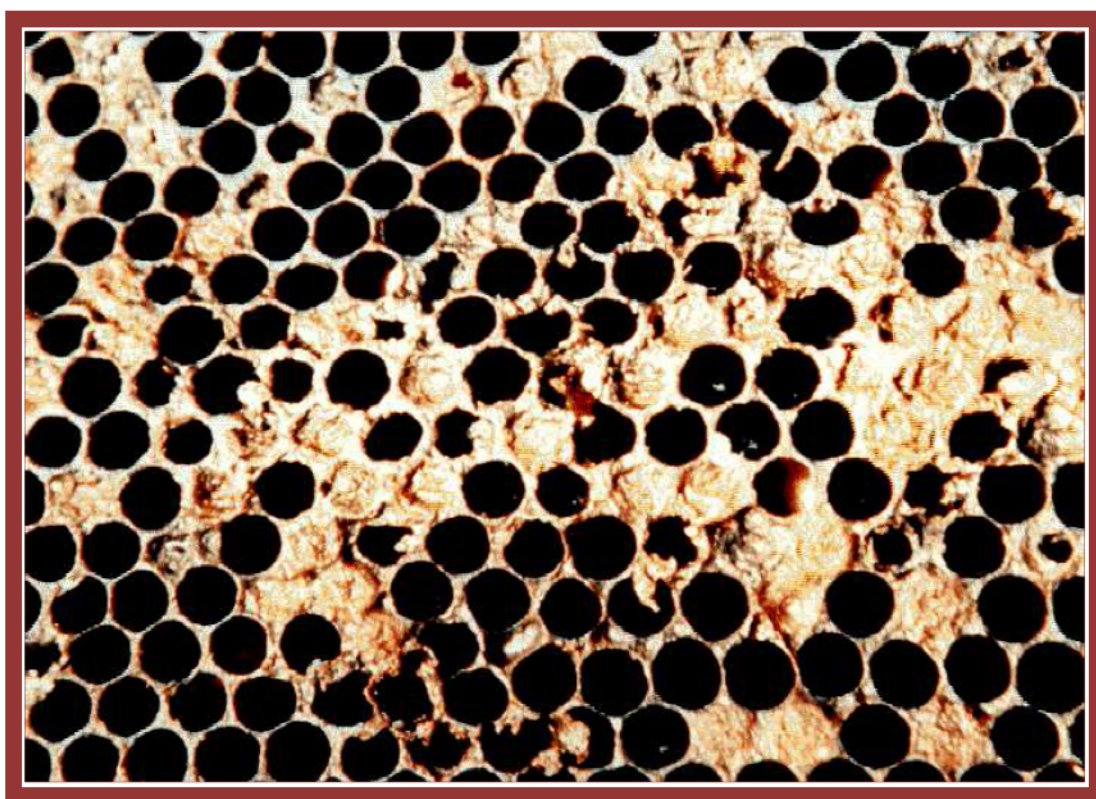


Figura 3: Síntomas de loque americana: Cuadro de cría afectado que presenta un aspecto general de cría salteada, opérculos hundidos y perforados y de consistencia oleosa.

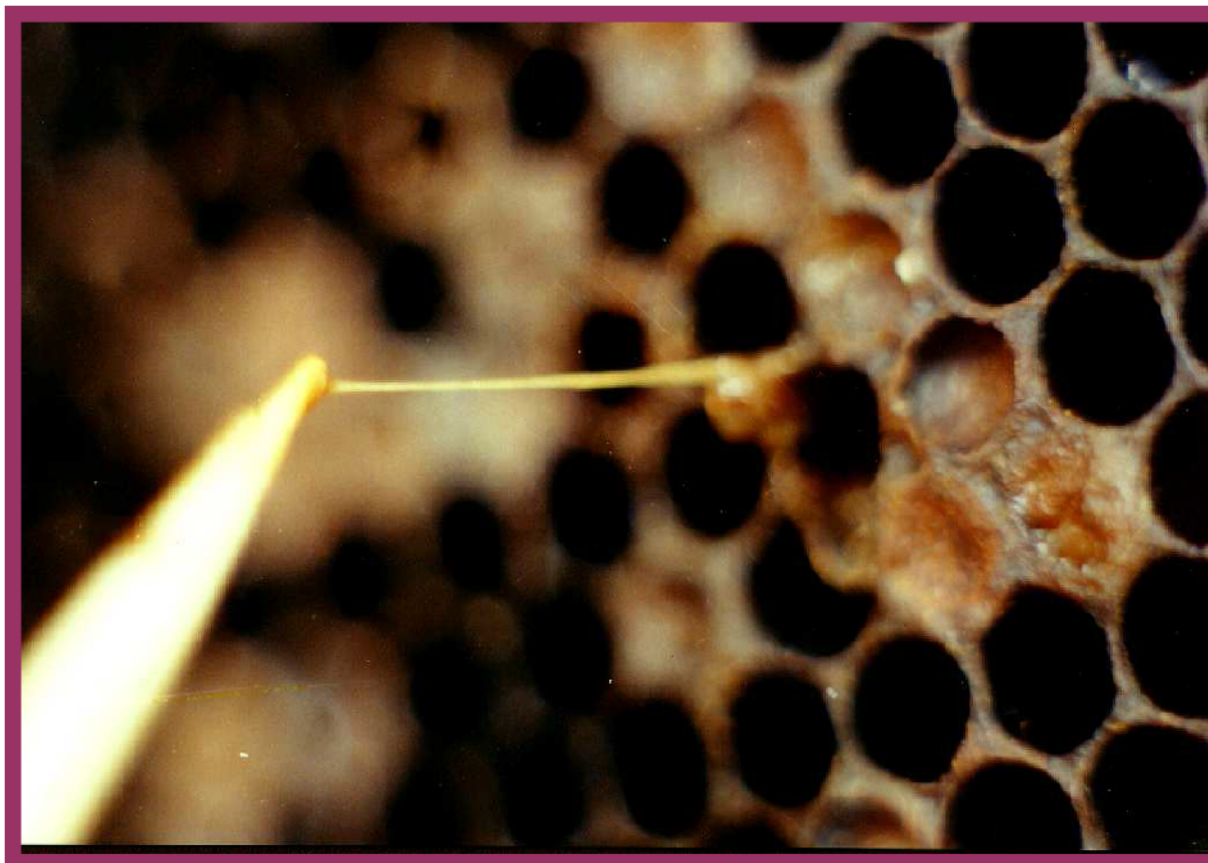


Figura 4: Prueba de la cerilla: los restos larvales se estiran formando masas viscosas que se adhieren a un objeto, como por ejemplo un palillo o cerilla.

Con el correr del tiempo, se forma una escama (Figuras 5, 6 y 7b) que se adhiere firmemente al capullo y hacia el piso y fondo de las celdas. Cuando la muerte de la cría ocurre al estado de pupa, es posible observar una protuberancia de las partes bucales estirada hacia el techo de la celda (Figura 6). Además de la glosa, las escamas pueden exhibir características del adulto como cabezas y patas; estos últimos síntomas son diferenciales de la enfermedad. Los marcos afectados presentan un olor agrio, semejante a la cola de carpintero (Bailey & Ball, 1991; Shimanuki, 1990).

Tradicionalmente, los síntomas descriptos se empleaban para efectuar el diagnóstico clínico a campo de la enfermedad. Sin embargo, en la Argentina, se han hallado sintomatologías confusas que dificultan el diagnóstico (Alippi, 1992b). En estos casos, se hallan larvas muertas en celdas desoperculadas, mostrando los restos larvales y escamas un aspecto intermedio entre loque americana y loque europea (detallada en 3.3.1). Se ha demostrado que esta sintomatología atípica se manifiesta cuando aparecen esporas de *Paenibacillus larvae* junto con esporas de *Paenibacillus alvei*, agente saprobio asociado con la loque europea (3.3.1).

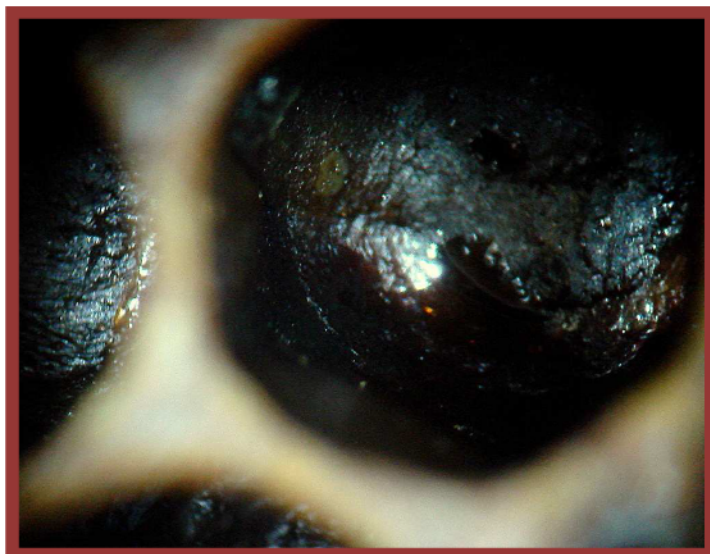


Figura 5: Escamas de loque americana adheridas al fondo de las celdas

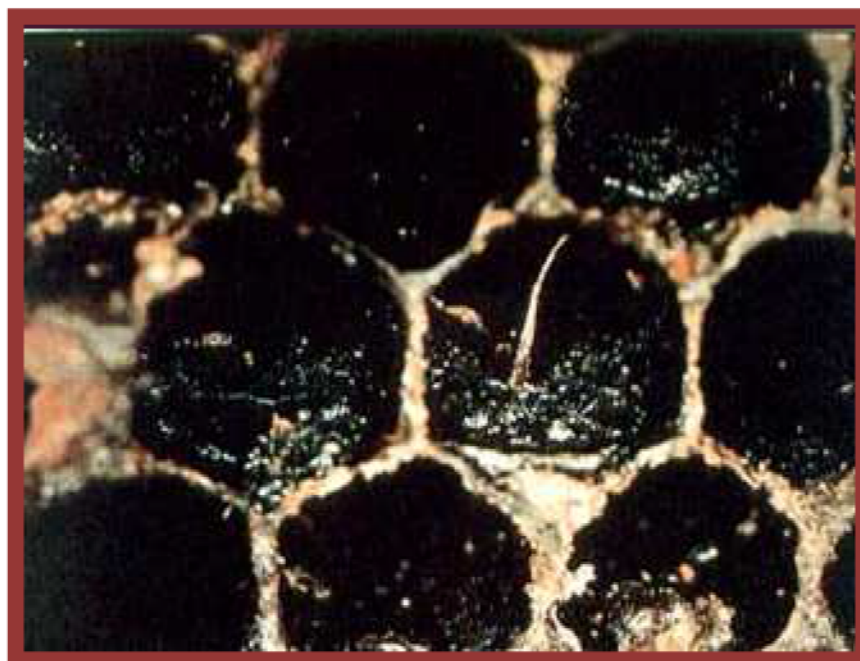


Figura 6: Síntomas de loque americana: Escama adherida al fondo de la celda con la glosa pupal extendida hacia el techo de la misma. Foto: M. V. Smith (University of Guelph, Canada).

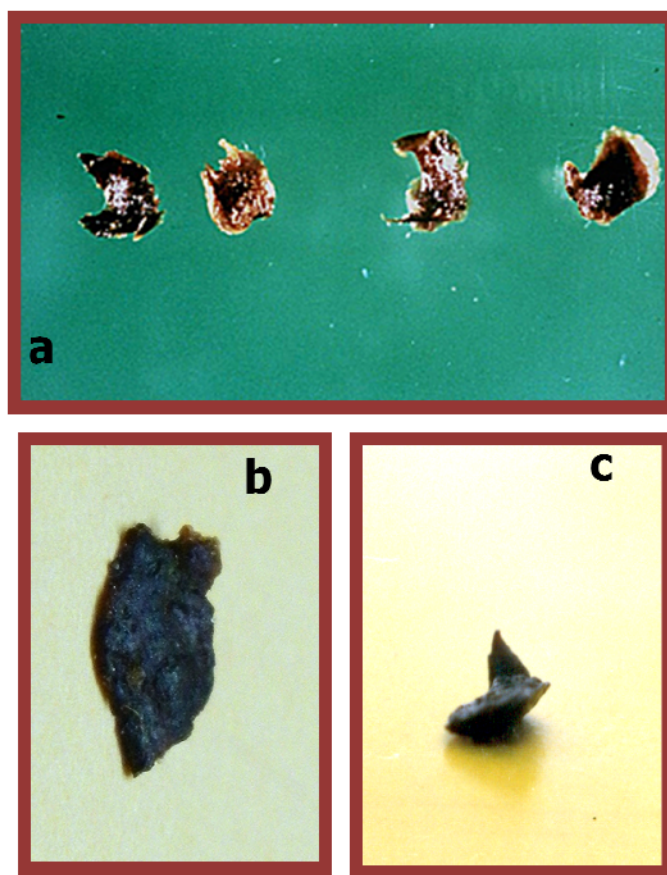


Figura 7: Comparación de escamas de las enfermedades bacterianas: a) Loque europea, b) Loque americana y c) Escama atípica conteniendo poblaciones mixtas de esporas de *P. larvae* y *P. alvei*.

Si bien la presencia de *P. alvei* en los restos larvales se considera como evidencia de una infección previa de loque europea (Hornitzky & Wilson, 1989), en la Argentina, se ha observado la presencia de poblaciones mixtas de *P. larvae* y *P. alvei* en material viscoso y escamas procedentes de colmenas infectadas por loque americana (Figura 7c) (Alippi, 1991; Alippi, 1992b), observaciones similares a las descritas por Hornitzky en Australia (Hornitzky & Karlovskis, 1989; Hornitzky & Wilson, 1989).

En base a lo anterior la alta incidencia de *P. alvei* en las muestras provenientes de Australia y de Argentina sugiere que la misma es una especie saprobia habitante frecuente de los apiarios que se multiplica y esporula sobre larvas muertas por loque americana o por loque europea (Alippi, 1992b).

Tabla 1: Síntomas diferenciales entre loque americana y europea

Síntomas	Loque Americana	Loque Europea	Cría sana
Aspecto general del cuadro de cría y opérculos	Cría salteada Larvas muertas en celdas operculadas y celdas desoperculadas por las abejas Opérculos hundidos, agujereados, oscurecidos y grasosos	Cría salteada Larvas muertas en celdas abiertas y ocasionalmente larvas muertas en celdas operculadas En estadios avanzados opérculos hundidos y agujereados	Cría de edad similar en áreas compactas Menos del 15% de celdas vacías entre las crías Opérculos convexos, secos, sin perforaciones
Edad y posición de la cría muerta	Prepupas y pupas en posición vertical Tendidas en el piso de las celdas en forma regular	Larvas jóvenes (cría abierta), a veces prepupas y pupas Enroscadas en el fondo o laterales, gran irregularidad.	—
Color de la cría muerta	Castaño claro, castaño oscuro o negro.	Blanco amarillento a castaño o castaño oscuro	Larvas de color blanco perlado y brillante
Consistencia y olor de la cría muerta	Ligeramente viscosa, con el tiempo se torna pegajosa estirándose en forma de hilos de más de 2,5 cm Olor a cola de carpintero	Blanda y acuosa, luego pastosa y granulosa, ocasionalmente pegajosa (menos de 2,5 cm) Olor ácido a pútrido	Ningún olor
Escamas	Tendidas uniformemente en la cara inferior de las celdas Glosa pupal estirada hacia el techo, la cabeza permanece tendida. Características del adulto como patas o cabeza presentes en la escama Quebradizas, difíciles de extraer de las celdas	Enroscadas en el fondo de las celdas, a menudo retorcidas en forma irregular Blandas, gomosas No se adhieren a las celdas, se extraen fácilmente	—

3.3.2.2. Patogénesis

Las esporas bacterianas (Figura 8) son la fuente de inóculo y la forma de difusión de la enfermedad iniciando el ciclo de la misma cuando éstas son ingeridas por las larvas junto con el alimento. Las larvas son muy susceptibles a la infección durante las 36 h siguientes a la eclosión del huevo y la susceptibilidad decrece al aumentar en edad (Woodrow, 1942) ya que a partir de las 53 h de la eclosión ya no son afectadas. Se ha comprobado que la dosis letal media (LD_{50}) es de $8,49 \pm 1,49$ esporas para las larvas de 24–28 h (Hansen & Brødsgaard, 1999), mientras que se requieren millones de esporas para infectar larvas de más de 2 días de edad (Woodrow, 1942). Las esporas germinan rápidamente en el lumen del intestino larval originando células vegetativas flageladas que proliferan masivamente durante varios días sin alterar la integridad del epitelio intestinal (Yue *et al.*, 2008). En estadios posteriores las bacterias rompen en forma localizada la matriz peritrófica del epitelio intestinal (Figura 9) e invaden el hemocelo. Estudios recientes mediante técnicas de análisis de hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) demostraron que el mecanismo de invasión más importante de *P. larvae* es la ruta paracelular (Yue *et al.*, 2008) y no la fagocitosis como se creía previamente (Bailey & Lee, 1962; Davidson, 1973; Gregorc & Bowen, 1998; Tanada & Kaya, 1993). La invasión bacteriana coincide con la muerte del hospedante lo cual sugiere que el punto crítico que determina el tiempo de muerte larval es la penetración bacteriana a través del epitelio intestinal y la subsecuente invasión del hemocelo por la vía paracelular.

En las larvas de más de 48 h las esporas no germinan tan fácilmente y en general son eliminadas fuera del intestino con las heces. Si bien las células vegetativas no son infectivas y no resisten la desecación, las larvas más viejas poseen una membrana peritrófica más gruesa la cual constituye una barrera para las células vegetativas bacterianas y la segunda barrera es el epitelio del intestino medio. Las condiciones óptimas para la germinación de las esporas se dan en el intestino medio de las larvas jóvenes que se caracteriza por tener un pH de 6,5; condiciones de microaerofilia (10% de CO_2) y temperaturas de 36-37 °C. Las células vegetativas en cambio, pueden multiplicarse tanto en condiciones aeróbicas como de baja concentración de O_2 , pero requieren condiciones aeróbicas para esporular, razón por la cual migran a la hemolinfa donde el tenor de O_2 es el adecuado (Bailey & Ball, 1991). Las esporas son inocuas para la abeja adulta porque no pueden germinar en su tracto digestivo que posee pH ácido (pH 3-3,5).

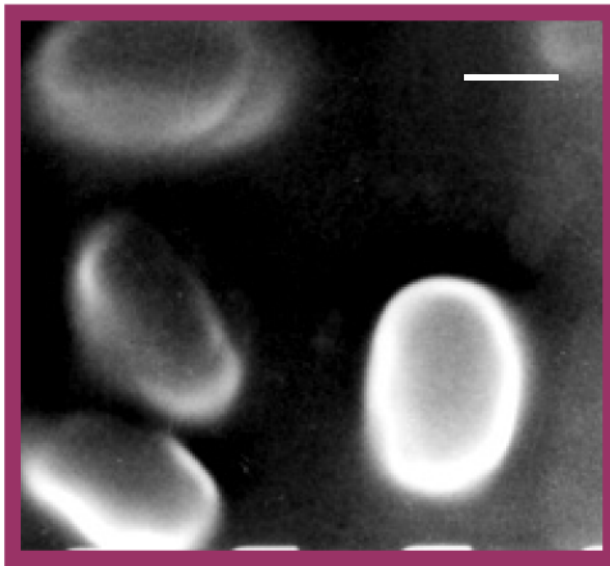


Figura 8: Esporas de *P. larvae* observadas bajo MEB. Barra: 0,5 μ m

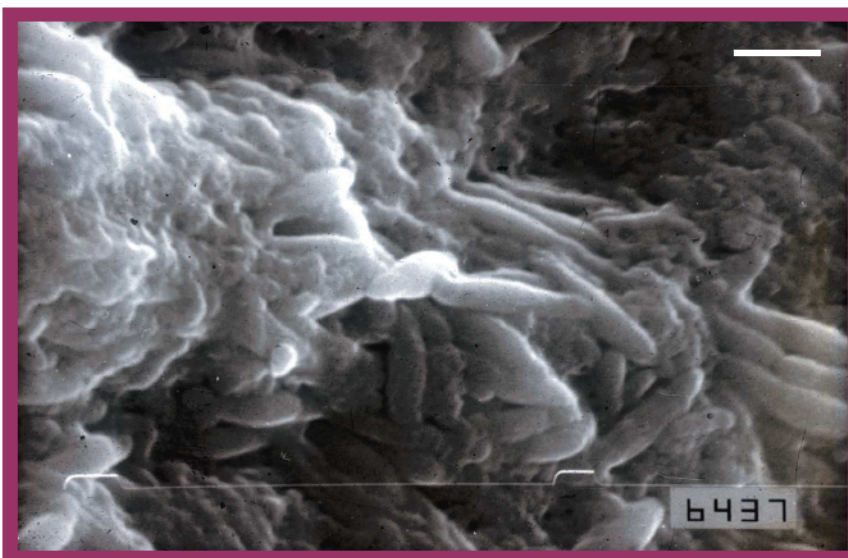


Figura 9: Células vegetativas bacterianas en el lumen del intestino y recubriendo el epitelio vistas al MEB. Barra: 2 μ m

El ciclo de vida de las bacterias en las larvas infectadas puede dividirse en dos etapas: una fase de infección temprana no invasiva y otra fase invasiva. En la fase no invasiva, las células bacterianas proliferan en el lumen del intestino medio antes de atravesar el epitelio, lo cual ha sido demostrado al observar larvas aún vivas de 4 y 5 días de edad con sus cavidades intestinales llenas de bacterias (Yue *et al*, 2008), aunque aún no se detectan bacterias en el hemocelo ni se observan alteraciones en el epitelio intestinal. En las fases tempranas de infección, las bacterias actuarían como comensales, compitiendo con la larva por el alimento (principalmente azúcares como fructosa y glucosa presentes en la dieta larval), hasta llegar al

umbral crítico de concentración para luego, en la fase invasiva, penetrar a través del epitelio intestinal hacia el hemocelo por la vía intercelular destruyendo, en forma secuencial, la membrana peritrófica, las uniones célula-célula y la matriz extracelular para posteriormente degradar todos los tejidos larvales (Yue *et al.*, 2008).

Si esta concentración bacteriana mínima ocurre antes de la metamorfosis larval, las larvas mueren antes de la operculación, de no ser así, las larvas sobreviven y mueren durante la última fase de infección bacteriana, después de ser operculadas. Si bien no ha sido estudiado específicamente en *P. larvae*, este comportamiento podría deberse a un fenómeno de *Quorum sensing* (QS) por el cual las bacterias responden a su propia concentración celular. Las bacterias responden a señales difusibles, a bajas concentraciones bacterianas la señal es baja y las bacterias no responden pero cuando la concentración bacteriana aumenta la concentración de la señal también es alta y, en consecuencia, las bacterias responden por activación de la expresión de un *set* de genes específicos. La molécula-señal se denomina autoinductor y varía de acuerdo con la especie bacteriana; en Gram (+) es típicamente mediada por pequeños péptidos que son transportados a través de la membrana por un péptido específico de transporte (Dale & Park, 2010).

Si bien se había postulado que la esporulación de *P. larvae* comienza en la hemolinfa (Chantawannakul & Dancer, 2001; Davidson, 1973), recientemente se encontró que la esporulación ocurre durante todo el proceso infectivo (Yue *et al.*, 2008), aunque en los estadios finales ya no se observan células vegetativas en ningún tejido del hospedante.

En general, las larvas infectadas mueren rápidamente, pero el tiempo varía de acuerdo con el genotipo bacteriano involucrado en el proceso infectivo, esto es 11-12 días después de la eclosión del huevo para el genotipo ERIC I (LT_{100} = 12 días) y 7 días (LT_{100} = 7 días) para el genotipo ERIC II. En el momento de la muerte larval, ya todos los tejidos contienen esporas (Figura 10).

Luego de su muerte, la cría cambia de color blanco perlado a castaño oscuro y se ubica en el piso de la celda, el tegumento se rompe, el contenido se torna viscoso lo que se comprueba en base a su adherencia a un objeto (por ejemplo a un palillo que se inserta en la celda y que al retirarlo forma hilos de 2,5 cm o más) (Figura 5). Con el correr del tiempo, la cría muerta se seca formando una escama (Figuras 6 y 7b) que se adhiere firmemente al capullo en el piso de la celda (Figuras 5 y 6). Cada una de estas escamas contiene aproximadamente $2,5 \times 10^9$ esporas bacterianas que constituyen la fuente de inóculo para nuevas infecciones (Alippi, 1999).

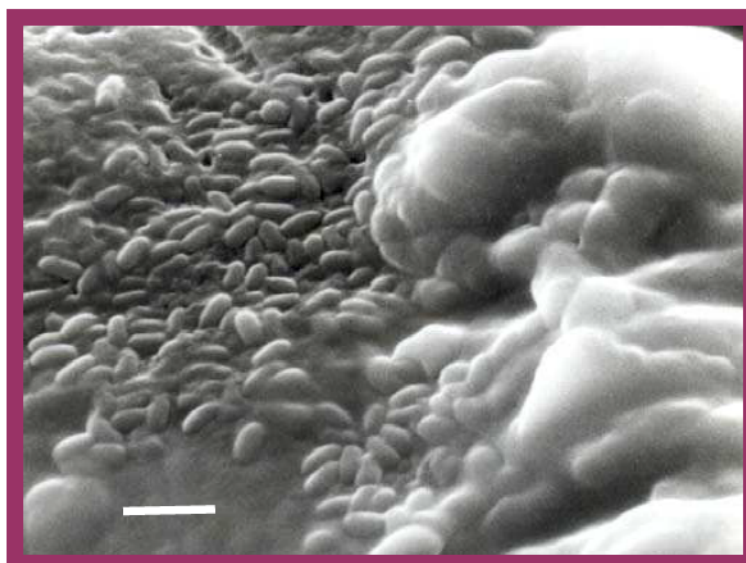


Figura 10: Esporas bacterianas contenidas en el material viscoso larval vistas bajo MEB. Barra: 2 μ m

Recientemente, a partir de la secuenciación completa del genoma de dos cepas pertenecientes a dos genotipos diferenciales en cuanto a virulencia (Djukic *et al.*, 2014) se comprobó que durante la fase no invasiva de *P. larvae*, las bacterias proliferan en forma masiva metabolizando diferentes azúcares simples y derivados, como por ejemplo D-glucosa y D-fructosa por las vías metabólicas de Embden-Meyerhoh-Parnas y de fosfato-pentosa mientras que durante la fase invasiva, metabolizan proteasas extracelulares y toxinas. De hecho, la alta capacidad proteolítica de *P. larvae* ha sido ampliamente estudiada encontrándose: i) Proteasas capaces de degradar péptidos antimicrobianos y neutralizar la respuesta inmune de las células epiteliales del intestino permitiendo a *P. larvae* sobrevivir en el intestino medio y atacar la membrana peritrófica; ii) Proteasas que degradan las uniones célula-célula del epitelio intestinal; iii) Colagenasas que degradan la membrana basal facilitando el acceso de las bacterias a los tejidos larvales y iv) Proteasas que actúan en la degradación posterior de los tejidos larvales hasta llegar a formar una masa viscosa (Antúnez *et al.*, 2009; Chantawannakul & Dancer, 2001; Djukic *et al.*, 2007; Holst, 1946; Holst & Sturtevant, 1940). El patógeno también produciría toxinas, antibióticos y metabolitos secundarios, como toxinas de tipo AB, citolisinas, lipopéptidos de la familia de las iturinas, heptapéptidos, sideróforos y lantibióticos entre otros (Djukic *et al.*, 2007).

3.3.2.3. Diseminación y transmisión:

Las esporas de *P. larvae* permanecen viables durante tiempo prolongado en distintas

fuentes de apiario como miel, polen, propóleos, cera, jalea real y pelechos, y también pueden sobrevivir en el suelo. Se ha demostrado que las esporas contenidas en las escamas permanecen viables y con capacidad infectiva luego de 35 años (Haseman, 1961), sin embargo es probable que su viabilidad sea mayor. Las esporas son muy resistentes a la desecación, a las altas temperaturas, por ejemplo se ha citado que toleran 100 °C por 30 min en suspensión acuosa y 160 min en miel; también 121 °C por 30 min en cera y 110 °C por 41 min en miel (Calesnich & White, 1952; Kosteci & Jelinski, 1977 White, 1920a). Además, sobreviven al contacto con desinfectantes, por ejemplo, soportan el contacto con una solución de formaldehído al 10% por más de 5 horas, y toleran exposición a la luz UV (Alippi, 1999; Hansen & Broodsgard, 1999; Matheson & Reid, 1992).

La loque americana se transmite tanto horizontal como verticalmente. La horizontal se refiere a la transmisión del patógeno entre individuos dentro de la misma generación, lo cual equivaldría a la transmisión del patógeno entre colmenas de abejas o dentro de la misma colmena. Por otra parte, la transmisión vertical se refiere a la propagación del patógeno entre individuos de diferentes generaciones; en este caso, la transmisión es por fisión de colmenas a través de enjambres reproductivos tanto en colmenas con síntomas clínicos de la enfermedad como en colmenas con infecciones subclínicas (Fries *et al.*, 2006).

La loque americana se transfiere principalmente de modo horizontal (Fries & Camazine, 2001) mediante dos rutas principales de diseminación de las esporas dentro de la colmena: la primera es por las larvas criadas en celdas previamente infectadas (8-9 %) que pasan a constituir nuevas fuentes de inóculo para futuras posturas de la reina y la segunda cuando las abejas encargadas de la limpieza que remueven las larvas muertas cambian a la función de nodrizas y transmiten esporas a larvas sanas por contaminación del alimento larval (Ratnieks, 1992) De esta forma, las esporas se diseminan por toda la colmena contaminando así la miel, el polen, la cera y demás productos de la colmena (Ratnieks, 1992). Entre colmenas, la enfermedad se disemina horizontalmente mediante el pillaje de miel, intercambio de marcos infectados, traslado de colmenas para polinización de cultivos y, en menor grado, por deriva de abejas (Matheson & Reid, 1992). Las esporas son inocuas para las abejas adultas, pero éstas pueden transformarse en portadoras de inóculo que puede conducir a futuras infecciones dentro y fuera del apiario.

Pese a que no hay datos sobre transmisión de loque americana en sistemas naturales, en colmenas silvestres se han detectado bajos niveles de esporas bacterianas, esto sugiere que la

ruta principal de transmisión de la enfermedad es por vía horizontal dependiendo mayormente de las prácticas apícolas del hombre (Fries *et al.*, 2006). De esta forma, el apicultor juega un rol clave en la dispersión de la enfermedad mediante el intercambio de cuadros de cría de colmenas enfermas a sanas, alimentando colmenas con miel o polen contaminados con esporas, mediante el movimiento de colonias empleadas para polinización de cultivos, por compra y venta de colmenas y núcleos sin control sanitario, incorporando enjambres desconocidos al apiario, etc. Sin la intervención del hombre, se disemina horizontalmente por pillaje, y, en menor medida por deriva de abejas de colmenas afectadas a sanas.

3.3.2.4. Etiología

La primera referencia en la literatura de una enfermedad que afectaba a las abejas data de Aristóteles (384-322 AC) quien describió en su libro IX de su Historia de los Animales una condición que "se indica como lasitud de una parte de las abejas y un mal olor en la colmena". En 1769 Schirach dio el nombre de "*foulbrood*" (cría pútrida) a una patología de las larvas de abejas melíferas caracterizada por un olor peculiar (White, 1906), desde entonces, diferentes autores han denominado a diferentes enfermedades como "*foulbrood*" y no se sabe a cual de estas enfermedades se refirió inicialmente Schirach. En 1885 en Inglaterra, Cheshire y Cheyne determinaron al agente causal de una de las enfermedades "*foulbrood*" y lo llamaron *Bacillus alvei* (White, 1906); esta enfermedad fue posteriormente denominada *European Foulbrood* (EFB) (loque europea) porque fue descrita por primera vez en Europa. White (1912) posteriormente demostró que el agente causal de loque europea era *Bacillus pluton* (White, 1912, 1920b), el cual fue ulteriormente reclasificado como *Streptococcus pluton*, *Melissococcus pluton* y *Melissococcus plutonius* (Bailey, 1957; Bailey, 1983; Bailey & Collins, 1982).

En 1903, White (1907, 1920a) observó que otro patógeno estaba asociado con otra de las enfermedades bacterianas de las larvas llamada *foulbrood* y demostró que *Bacillus larvae* era el agente causal de la misma efectuando una descripción completa del mismo. La enfermedad se denominó *American Foulbrood* (AFB) porque las investigaciones se llevaron a cabo en el estado de Nueva York, EE.UU.. Cuarenta y cuatro años más tarde, Katznelson (1950) describió una especie altamente relacionada a la cual denominó *Bacillus pulvifaciens* asociada con una rara enfermedad de las larvas de abejas llamada "*powdery scale*" cuyos síntomas particulares eran escamas de aspecto pulverulento a diferencia de las escamas "típicas" de loque americana.

Existen sólo dos registros en la literatura que describen a esta enfermedad y aislan a su agente causal (Gilliam & Dunham, 1978; Katznelson, 1950) y si bien inicialmente su patogenicidad fue cuestionada (Katznelson & Jamieson, 1951) posteriormente fue confirmada (Hitchcock *et al.*, 1979).

Con el advenimiento de las técnicas moleculares y su empleo como herramienta para estudios de taxonomía bacteriana, se puso en evidencia que el género *Bacillus* era filogenéticamente muy heterogéneo. El análisis de la secuencia del gen 16s rRNA reveló que dicho género está constituido por al menos 5 líneas filogenéticas (Ash *et al.*, 1991). Caracterizaciones posteriores a distintos niveles genotípicos y fenotípicos permitieron dividir al género *Bacillus* en 14 géneros nuevos: *Amphibacillus* (Niimura *et al.*, 1990); *Alicyclobacillus* (Wisotzkey *et al.*, 1992), *Paenibacillus* (Ash *et al.*, 1993), *Aneurinibacillus* (Shida *et al.*, 1996a), *Brevibacillus* (Shida *et al.*, 1996); *Virgibacillus* (Heyndrickx *et al.*, 1998); *Gracilibacillus* (Wainø *et al.*, 1999), *Salibacillus* (Wainø *et al.*, 1999), *Filobacillus* (Schlesner *et al.*, 2001), *Geobacillus* (Nazina *et al.*, 2001), *Ureibacillus* (Fortina *et al.*, 2001), *Jeotgalibacillus* (Yoon *et al.*, 2001), *Marinibacillus* (Yoon *et al.*, 2001) y *Lysinibacillus* (Jung *et al.*, 2012).

En 1993, Ash y colaboradores reclasificaron a *Bacillus larvae* y *Bacillus pulvifaciens* dentro del género *Paenibacillus*, el cual comprendía al grupo 3 *Bacillus* definido de acuerdo con el análisis de la secuencia 16s rRNA. De acuerdo con dicho estudio, dentro del género *Paenibacillus* se incluían las siguientes especies: *P. larvae*, *P. alvei*, *P. pulvifaciens*, *P. polymyxa*, *P. gordonae*, *P. macerans*, *azotofixans*, *P. pabuli*, *P. macquariensis*, *P. amylolyticus* y *P. validus*. Trabajos de taxonomía polifásica posteriores (Heyndrickx *et al.*, 1996) demostraron que *Paenibacillus pulvifaciens* debía reclasificarse como una subespecie de *Paenibacillus larvae*, dado que los genomas de ambas subespecies presentaban un 90 % de homología. Recientemente, Genersch y col. (2006) propusieron eliminar la designación de subespecies basados en un estudio de taxonomía polifásica que incluyó un mayor número de cepas y en los que se determinaron perfiles bioquímicos, las características morfológicas de las esporas y de las colonias, el patrón proteico mediante SDS-PAGE, marcadores moleculares como rep-PCR y PFGE, así como también pruebas de patogenicidad y virulencia en colmenas. Al publicar esta reclasificación en la publicación oficial del Comité Internacional de Sistemática de Procariotes (*International Committee on Systematics of Prokaryotes*) la eliminación del epíteto de subespecie para *Paenibacillus larvae* ha sido validada razón por la cual, el binomio *Paenibacillus larvae* debe considerarse como la designación completa y correcta para el agente causal de

loque americana. Con fines de una mayor claridad, durante el desarrollo de la presente Tesis se denominará a este grupo de cepas de *P. larvae* como "ex *pulvificiens*"

Posteriormente se describieron nuevas especies dentro del género *Paenibacillus* conteniendo, hasta el momento, 153 especies válidas (<http://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>), que se enumeran a continuación: *P. aestuarii*, *P. agarexedens*, *agaridevorans*, *P. alginolyticus*, *P. algorifonticola*, *P. alkaliterrae*, *P. alvei*, *P. amylolyticus*, *P. anaericanus*, *P. antarcticus*, *P. apiarius*, *P. assamensis*, *P. azoreducens*, *P. azotofixans*, *P. azotoformans*, *P. barcinonensis*, *P. barengoltzii*, *P. borealis*, *P. brasiliensis*, *P. camelliae*, *P. campinasensis*, *P. castanea*, *P. catalpaea*, *P. cellulosityticus*, *P. cellulositrophicus*, *P. chartarius*, *P. chibensis*, *P. chinjuensis*, *P. chitinolyticus*, *P. chondroitinus*, *P. chugangensis*, *P. cineris*, *P. contaminans*, *P. cookii*, *P. curdlanolyticus*, *P. daejeonensis*, *P. darwinianus*, *P. dendritiformis*, *P. doosanensis*, *P. durum*, *P. durus*, *P. edaphicus*, *P. ehimensis*, *P. elgii*, *P. favisporus*, *P. filicis*, *P. fonticola*, *P. forsythiae*, *P. frigori-resistens*, *P. gansuensis*, *P. ginsengarvi*, *P. ginsengihumi*, *P. ginsengisoli*, *P. glacialis*, *P. glucanolyticus*, *P. glycanilyticus*, *P. gordonae*, *P. graminis*, *P. granivorans*, *P. harenae*, *P. hodogayensis*, *P. hordei*, *P. humicus*, *P. hunanensis*, *P. illinoisensis*, *P. jamilae*, *P. jilunlii*, *P. kobensis*, *P. koleovorans*, *P. konsidensis*, *P. koreensis*, *P. kribbensis*, *P. lactis*, *P. larvae*, *P. lautus*, *P. lentimorbus*, *P. lentus*, *P. macerans*, *P. macquariensis*, *P. massiliensis*, *P. mendelii*, *P. montaniterrae*, *P. motobuensis*, *P. mucilaginosus*, *P. napensis*, *P. naphthalenovorans*, *P. nematophilus*, *P. oceanisediminis*, *P. odorifer*, *P. pabuli*, *P. panacisoli*, *P. pasadenensis*, *P. pectinolyticus*, *P. peoriae*, *P. phoenicis*, *P. phyllosphaerae*, *P. pini*, *P. pinihumi*, *P. pocheonensis*, *P. polymyxa*, *P. popilliae*, *P. profundis*, *P. prosopidis*, *P. provencensis*, *P. pueri*, *P. puldeungensis*, *P. purispatii*, *P. residui*, *P. rhizosphaerae*, *P. righi*, *P. riograndensis*, *P. sabinae*, *P. sanguinis*, *P. sediminis*, *P. selenitireducens*, *P. septentrionalis*, *P. sepulcri*, *P. siamensis*, *P. soli*, *P. sonchi*, *P. sophorae*, *P. sputi*, *P. stellifer*, *P. taichungensis*, *P. taiwanensis*, *P. tarimensis*, *P. tellirus*, *P. terrae*, *P. terrigena*, *P. thailandensis*, *P. thermoaerophilus*, *P. thermophilus*, *P. thiaminolyticus*, *P. tianmuensis*, *P. timonensis*, *P. tundrae*, *P. turicensis*, *P. typhae*, *P. uliginis*, *P. urinalis*, *P. validus*, *P. vulneris*, *P. wooponensis*, *P. woosongensis*, *P. wynnii*, *P. xinjiangensis*, *P. xylanexedens*, *P. xylanilyticus*, *P. xylanisolvens* y *P. zanthoxyli*.

3.3.2.5. Control

En la mayoría de los países desarrollados la quema de colmenas es la única alternativa para el control de loque americana, existiendo distintos métodos para recuperar el material inerte como esterilización por radiación gamma, inmersión en parafina, desinfección con óxido de etileno, soda cáustica e hipoclorito de sodio (Goodwin & Van Eaton, 1999; Matheson & Reid, 1992). Sin embargo, en la Argentina, como alternativa a la quema, se emplean antibióticos que eliminan los síntomas de la enfermedad controlando las formas vegetativas pero no las esporas bacterianas; de esta manera, la colonia puede crecer y producir miel en forma normal. La quimioterapia resulta económicamente atractiva cuando la enfermedad se halla ampliamente diseminada en los colmenares de una zona (área endémica) (Seeley, 1985), no obstante, el período de protección es breve y es necesario repetir el tratamiento indefinidamente a medida que reaparecen los síntomas (recurrencia).

Si bien existen otros modos de recuperar el material vivo como por ejemplo enjambrado artificial y cepillado (Del Hoyo *et al.*, 2001), el primero no es apto para aquellos apicultores con un gran número de colmenas dado que es una técnica muy laboriosa mientras que el segundo no pareciera ser totalmente efectivo dado que la prevalencia de esporas de *P. larvae* en mieles argentinas es muy alta. Lo anterior sugiere que es imprescindible buscar métodos alternativos para disminuir la incidencia de la enfermedad, lo que es aún más relevante desde el momento en que se identificó la aparición de cepas bacterianas resistentes a oxitetraciclina (Alippi, 2000). El empleo de este y otros antibióticos trae como consecuencia directa la contaminación de las mieles con residuos de los mismos, reducción de la expectativa de vida media de las abejas, alteraciones en la microbiota de la colmena con un sobredesarrollo de especies no deseables y la selección natural de cepas bacterianas resistentes.

4. Biodiversidad microbiana

La biodiversidad o diversidad biológica es la variedad y la variabilidad de todas las formas de vida, el complejo ecológico en el cual están presentes y los procesos de los que forman parte (Olembó, 1991). La biodiversidad es el resultado de miles de millones de años de evolución según procesos naturales y la influencia creciente de las actividades del ser humano.

Los microorganismos son los seres más numerosos que existen en la tierra; son

organismos ancestrales que han colonizado exitosamente cada nicho ecológico posible, se encuentran prácticamente en todas las regiones del planeta, desde los polos, en ambientes bajo el punto de congelación y muy secos, hasta los trópicos con temperaturas altas y con elevada precipitación pluvial. Su presencia y actividad es esencial para la salud y funcionamiento adecuado de todos los ecosistemas (Olembo, 1991). Desde el punto de vista genético, se debe tener en cuenta que cada secuencia de ADN es única e irremplazable, con lo cual la desaparición de cualquier especie biológica implica la pérdida irreversible de un único conjunto de información. Esto es aplicable a todo organismo viviente y por lo tanto, también a los microorganismos. La diversidad microbiana y su rol en la naturaleza es prácticamente desconocida puesto que se estima que el 50% del protoplasma del planeta es microbiano y sólo se conoce entre un 1 y 5 % del mismo (Rosado *et al.*, 1997). Este desconocimiento se atribuye a la utilización de las técnicas comunes de la microbiología tradicional, como microscopía y cultivo *in vitro* de los microorganismos las cuales tienen sus limitaciones en la clasificación e identificación de los mismos. Por ejemplo, la clasificación mediante rasgos fisiológicos y bioquímicos es casi imposible puesto que aproximadamente el 80% de los microorganismos presentes en la naturaleza no se han podido aislar en cultivo puro por desconocimiento de las condiciones de cultivo (Muyzer, 1999). Por lo tanto, para un mejor entendimiento de la diversidad microbiana y su rol en el ecosistema, es necesario utilizar otro tipo de técnicas en las que el cultivo del microorganismo, no es indispensable, tales como las desarrolladas en base a técnicas moleculares. Con este objetivo, los ecologistas han desarrollado una rama de la ecología, la ecología microbiana molecular, que intenta estudiar tanto a los microorganismos cultivables como a los no cultivables mediante técnicas que emplean marcadores moleculares de ADN. Estos marcadores moleculares se caracterizan por conservarse en los distintos niveles jerárquicos de la clasificación y se mantienen neutros frente al ambiente. Si bien la caracterización fenotípica es importante, ésta no alcanza para clasificar a un determinado grupo y, por otra parte, la diversidad genotípica puede ser tan grande que es probable que dificulte la identificación y clasificación. A raíz de esta dualidad, en las últimas décadas surgió la necesidad de combinar estudios fenotípicos y genotípicos a través de una taxonomía polifásica para lograr la caracterización de una población (Vandamme *et al.*, 1996). Tradicionalmente, la taxonomía bacteriana se ha dividido en tres partes: I) clasificación, que es el ordenamiento dentro de grupos taxonómicos sobre la base de su similitud; II) nomenclatura, que es dar nombre a los grupos previamente establecidos y III) identificación de los microorganismos

desconocidos que es el proceso por el cual se puede determinar si el microorganismo problema pertenece o no a los grupos definidos en I) para denominarlo de acuerdo con II). No obstante, se necesitan dos partes adicionales para lograr definir la moderna biosistemática: IV) la filogenia y la V) genética de poblaciones. En las últimas décadas se ha consensuado que la taxonomía bacteriana debía reflejar las relaciones naturales entre las bacterias, representadas por el análisis de las relaciones filogenéticas de las secuencias 16S o 23S del rRNA (Vandamme *et al.*, 1996).

4.1. Diversidad en *Paenibacillus larvae* y fundamentos de la elección de este tema de tesis

He seleccionado este tema con el objeto de dar continuidad a mis trabajos de investigación iniciados en el año 1989 que coinciden con la primera aparición de loque americana en la Argentina. En aquella oportunidad efectué la caracterización del agente causal mediante técnicas microbiológicas clásicas y estudios morfológicos mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) y posterior cumplimiento de los postulados de Koch (Alippi, 1991; Alippi, 1992a). También desarrollé un medio de cultivo semi-selectivo para el aislamiento de *P. larvae* a partir de mieles con altos niveles de contaminación bacteriana, particularmente otras especies de *Paenibacillus* y *Bacillus* (Alippi, 1995).

En colaboración con el Dr. O. Mario Aguilar, demostramos por primera vez que mediante el uso de la técnica de PCR y primers BOX era posible diferenciar 3 genotipos dentro de la población de *P. larvae* (Alippi & Aguilar, 1998). En el momento de iniciar el presente estudio existían muy pocos antecedentes sobre la variabilidad intraespecífica en *P. larvae* y la nomenclatura vigente para el patógeno era a nivel subespecie de acuerdo con lo postulado por Heyndrickx y col. (1996).

Djordjevic y col. (1994) identificaron 5 tipos clonales de acuerdo con el nivel de similitud resultante del análisis por RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción); Carpana y col. (1995) caracterizaron, mediante pruebas bioquímicas miniaturizadas (API 50CHB) los patrones de utilización de compuestos carbonados de un grupo de 30 cepas; Heyndrickx y col. (1996) emplearon técnicas de amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD, *Randomly Amplified Polymorphic DNA*), de análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA, *amplified ribosomal DNA restriction analysis*) y de polimorfismos de

fragmentos de amplificación (AFLP, *Amplified fragment length polymorphisms*), mientras que Wu y col. (2005) usaron electroforesis en campo pulsante (PFGE, *Pulse field gel electrophoresis*) para estudiar variabilidad intra-especie encontrando 12 tipos diferentes en una población de 44 cepas. Mediante el análisis por rep-PCR de una colección de aislamientos de Alemania, Neuendorf y col. (2004) diferenciaron 3 patrones de *fingerprints* empleando *primers* BOXA1R y dos empleando *primers* MBOREP1 y, mediante una combinación de patrones genéticos Genersch y Otten (2006) definieron 5 subgrupos genéticos a los cuales denominaron AB, Ab, ab, aB, y aβ que se correlacionaban con 4 subgrupos definidos mediante el empleo de *primers* ERIC (ERIC I, ERIC II, ERIC III y ERIC VI) (Ashiralieva & Genersch, 2006). Estos genotipos diferían en ciertas características fenotípicas pero también en su virulencia (Genersch *et al.*, 2005).

Por otra parte, Benada y col. (1988), en un estudio sobre 12 cepas de *P. larvae*, encontraron que 3 aislamientos de zonas geográficas cercanas contenían plásmidos del mismo tamaño determinando su masa molecular en 5,72 Mdal (aproximadamente 9,4 kb). Adicionalmente buscaron si la presencia de estos plásmidos estaba correlacionada con alguna propiedad especial, para lo cual determinaron si las cepas bacterianas que contenían plásmidos poseían resistencia a antibióticos o a metales pesados los compararon con cepas libres de plásmidos, concluyendo que se trataba de plásmidos crípticos, ya que no pudieron asignarle ninguna función específica (Benada *et al.*, 1987). Continuando con el trabajo anterior, se construyó un mapa de restricción de dos plásmidos crípticos encontrados en cepas de *P. larvae* y se confirmó un alto porcentaje de identidad entre los plásmidos encontrados corroborando su tamaño en aproximadamente 9 kb y consideraron que los tres compartían el mismo origen (Bodorova-Urgosikova *et al.*, 1991). Posteriormente, Neuendorf y col. (2004) hallaron dos plásmidos crípticos de un tamaño de 9,4 y 11 kb, asociados únicamente con un genotipo específico AB determinado por rep-PCR. Dichos autores construyeron mapas de restricción y encontraron la presencia de un sitio *Xba*I y diferencias en los tamaños de los plásmidos con respecto a las observaciones de Benada y col. (1988) y Bodorova-Urgosikova y col. (1992). Recientemente, Murray y col. secuenciaron en forma completa un plásmido aislado de una cepa de *P. larvae* resistente a OTC; dicho plásmido, de un tamaño de 5 kb, fue denominado pMA67 y contenía el gen *tetL*. (Murray & Aronstein, 2006; Murray *et al.*, 2007). Adicionalmente, dichos autores (Murray & Aronstein, 2006), hallaron otros tres plásmidos, aparentemente distintos entre sí y de mayor tamaño que el pMA67, pero no los caracterizaron ni efectuaron mapas de

restricción. Por último, Djukic y col. (2014) encontraron dos plásmidos de 9,7 kb cada uno en dos cepas de *P. larvae* de diferentes genotipos ERIC, dichos plásmidos presentaban una alta homología y contenían el gen de origen de replicación *rep*.

En los últimos años, el análisis molecular de la región intergénica (*intergenic transcriber spacer*, ITS) entre los genes 16S y 23S rADN de 134 cepas provenientes de USA y 5 de Argentina y Chile, reveló la presencia de un único perfil de ITS-PCR conteniendo 3 regiones ITS verdaderas indicando 3 tipos de operones ribosómicos (*rrn*) (Dingman, 2012).

Todos estos estudios han sido efectuados sobre un número limitado de cepas del patógeno provenientes de áreas geográficas restringidas. En la Argentina, con excepción de nuestros primeros trabajos publicados (Alippi, 1991, 1995; Alippi & Aguilar, 1998a, 1998b), no existen estudios específicos sobre las poblaciones bacterianas presentes en los apiarios ni sobre las aisladas de mieles por lo que el trabajo propuesto para el desarrollo de esta Tesis doctoral ha consistido en el estudio de la biodiversidad de las poblaciones de *Paenibacillus larvae*, agente causal de la loque americana de las abejas.

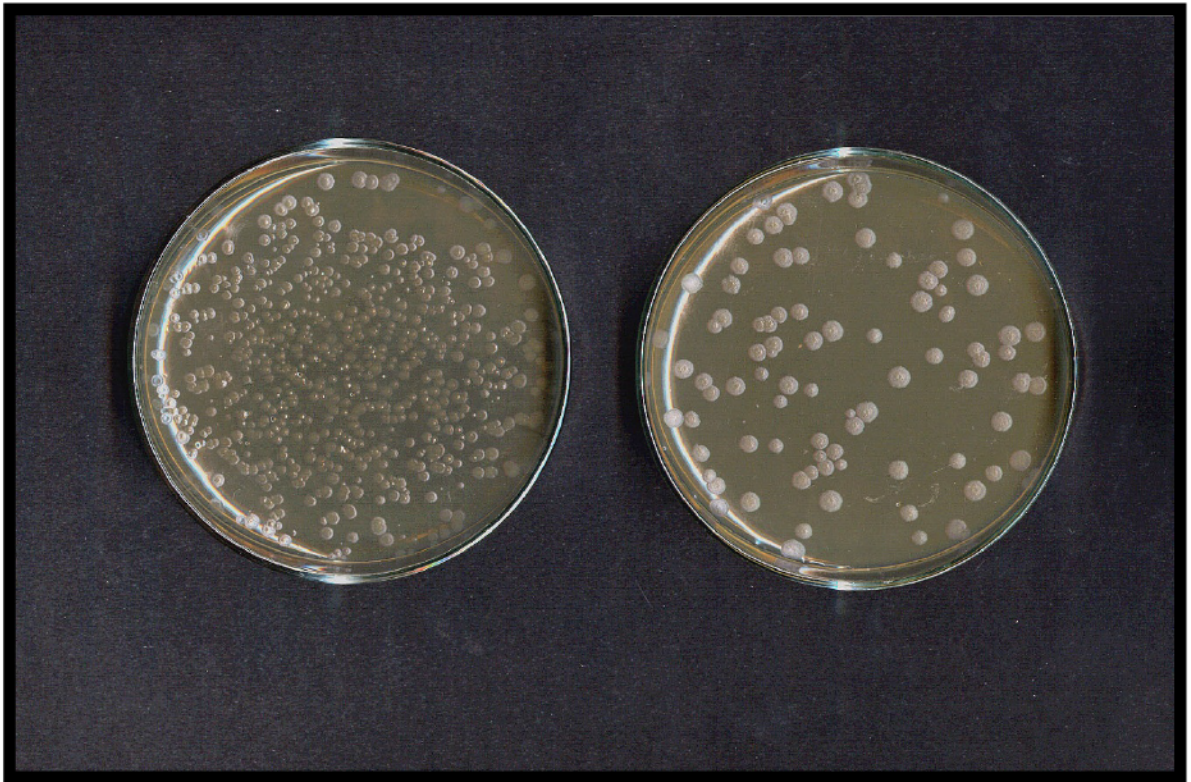
Hipótesis planteadas

- ✚ Las poblaciones de *Paenibacillus larvae* presentan diversidad a nivel morfológico, fisiológico y genético.
- ✚ Existen diversos tipos de resistencia a tetraciclina en *Paenibacillus larvae* y la misma puede transferirse en poblaciones bacterianas en forma horizontal mediante plásmidos movilizables.

Objetivos generales

1. Estudiar la diversidad de una población de cepas de *Paenibacillus larvae* aisladas de larvas de abejas y de muestras de miel aplicando procedimientos de microbiología clásicos y de biología molecular.
2. Definir regiones genómicas específicas de *Paenibacillus larvae* que permitan encarar el desarrollo de procedimientos de diagnóstico basados en el análisis de genomas de la comunidad microbiana presente en miel y otras fuentes del apiario.
3. Investigar las bases genéticas de la resistencia a tetraciclina en las poblaciones de *Paenibacillus larvae* provenientes de miel.

Capítulo II



**Aislamiento y caracterización
fenotípica de cepas de *Paenibacillus
larvae* y otras especies esporuladas
presentes en fuentes de apiario**

Aislamiento y caracterización fenotípica de cepas de *Paenibacillus larvae* y otras especies esporuladas presentes en fuentes de apiario

1. Introducción

1.1. Aislamiento y cultivo de *Paenibacillus larvae*

Paenibacillus larvae no desarrolla ni esporula en los medios de cultivo bacteriológicos standard. Hace más de 100 años se cultivó por primera vez en un medio de cultivo preparado a partir de extracto de larvas de abejas (White, 1907). Con el correr del tiempo, se han desarrollaron o adaptado nuevos medios de cultivo sintéticos, entre los que se puede mencionar: J-agar (Medio J) (Gordon *et al.*, 1973); agar cerebro corazón fortificado con tiamina (Gochnauer, 1973); agar MYPGP (Dingman & Stahly, 1983); agar sangre Columbia (Plagemann, 1985); agar sangre de oveja (Lloyd, 1986); SBA (Hornitsky & Karlovskis, 1989) y PLA agar (Schuch *et al.*, 2001).

P. larvae posee un perfil bioquímico que se caracteriza por la producción de ácido a partir de glucosa y trehalosa, característica que es variable con respecto a la utilización de d-salicina y manitol, pero que no ocurre cuando la fuente de C es arabinosa y xilosa (De Graaf *et al.*, 2006; Gordon *et al.*, 1973). Una de las formas de caracterizar aislamientos bacterianos es efectuar un análisis bioquímico, evaluando la capacidad de metabolizar un conjunto de fuentes carbonadas. Para la determinación del perfil de utilización de carbohidratos pueden ensayarse preparaciones de carbohidratos hechas en el laboratorio o *kits* comerciales, como las Galerías API, las galerías Vitek, las placas Biolog y otras (De Graaf *et al.*, 2006).

1.2. Microbiología de la miel

Según el Código Alimentario Argentino, se denomina Miel o Miel de Abeja el producto dulce elaborado por las abejas obreras a partir del néctar de las flores o de exudaciones de otras partes vivas de las plantas o presentes en ellas, que dichas abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, almacenándolo en panales, donde madura hasta completar su formación [www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_X.pdf] (Art. 782 - Res. 2256, 16.12.85).

Los microorganismos presentes en la miel pueden influenciar su calidad y/o seguridad. Debido a las propiedades naturales antimicrobianas de la miel y, si existen medidas de control en

el procesamiento de la misma, la miel resulta un producto con relativamente bajos niveles de contaminación microbiana, no obstante existen microorganismos capaces de tolerar la alta concentración de azúcares, acidez y otros factores antibacterianos (Snowdon & Cliver, 1999) y pueden agruparse en 4 grandes categorías:

- 1) Microorganismos que aparecen frecuentemente en la miel (levaduras y bacterias esporuladas)
- 2) Microorganismos indicadores de la calidad comercial y sanitaria de la miel (coliformes y levaduras)
- 3) Microorganismos que pueden causar enfermedades en humanos
- 4) Microorganismos que causan enfermedades en las abejas.

Las fuentes primarias de contaminación microbiana son el polen, los tractos digestivos de las abejas, el polvo ambiental, el aire, el suelo y las flores. Las fuentes de contaminación secundaria son las mismas que para otros alimentos. Los géneros bacterianos de mayor prevalencia en los intestinos y heces de las larvas (pH 6,5) son *Bacillus* y *Paenibacillus* a diferencia de la microbiota de los intestinos de las adultas (pH 3-4) en donde predominan las Enterobacteriaceae, bacterias Gram-variables pleomórficas de taxonomía incierta y hongos como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Torulopsis*. Los bacilos aeróbicos formadores de esporas, en su mayoría pertenecientes al género *Bacillus* y *Paenibacillus* son las especies bacterianas que se encuentran más frecuentemente en las superficies externas, intestinos, hemolinfa y tráqueas de las abejas adultas y por consiguiente son las introducidas en la miel por las abejas con mayor frecuencia (Gilliam, 1979; Gilliam & Valentine, 1976). El néctar, el cuerpo de las abejas el suelo que rodea a las colmenas y el interior de las colmenas son todas fuentes posibles de levaduras. El polen probablemente sea el origen de los microorganismos del intestino de las adultas, mientras que el néctar prácticamente no contiene microorganismos. Las levaduras se hallan muy frecuentemente en miel, pueden crecer en condiciones de pH bajo y no son inhibidas por altos tenores de azúcares (levaduras osmofílicas) fermentan la miel y ocasionan graves perjuicios en la industria (Snowdon & Cliver, 1999).

La contaminación secundaria por microorganismos ocurre durante y después del proceso de extracción de la miel más que en la colmena misma, las principales fuentes secundarias son: el hombre, equipos de extracción y manipuleo de los marcos de miel, viento, polvo ambiental, insectos, animales y agua y, las rutas posibles, el aire en el momento de extracción y envasado de la miel y pisos paredes y techos como reservorios de bacterias que entran a la miel. Estas rutas secundarias pueden controlarse por medidas higiénicas standard y buenas prácticas de

manufactura (Snowdon & Cliver, 1999).

En la práctica, las esporas de *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* y *Clostridium* y algunas especies de hongos y levaduras están presentes en la miel de forma regular. Mientras que los hongos y las levaduras son los únicos microorganismos que pueden crecer y desarrollar en la miel, las esporas bacterianas pueden sobrevivir pero no pueden desarrollar en la miel, pero se mantienen viables por largos períodos y germinan si encuentran las condiciones adecuadas para su desarrollo; esto es particularmente importante en el caso de las bacterias patógenas de abejas, ya que la miel es la fuente primaria de diseminación de las principales enfermedades de *Apis mellifera*. Los conteos normales de bacterias esporuladas aeróbicas oscilan entre 0 y 200 ufc/g de miel habiendo grandes variaciones en cuanto al número de especies y cantidad de acuerdo con la muestra de miel. Entre las especies de mayor prevalencia se han citado *Bacillus cereus*, *B. coagulans*, *B. megaterium* y *Paenibacillus alvei*, y distintas especies de *Clostridium*, entre ellas, *C. botulinum* (Snowdon & Cliver, 1999). En la Argentina, en estudios previos, hemos determinado que las especies esporuladas aerobias predominantes sobre un total de 122 muestras analizadas fueron: *Paenibacillus alvei* (56 %), *P. larvae* (8 %), *Bacillus cereus sensu lato* (10,5 %) y *B. subtilis* (1 %) y, en menor proporción se identificó a *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. circulans*, *Paenibacillus polymyxa* y *Brevibacillus laterosporus*. Habida cuenta que en una misma muestra de miel podían encontrarse esporas de más de una especie del grupo de las mesófilas, resultó imprescindible el empleo de medios semi-selectivos para el aislamiento de *P. larvae* (Alippi, 1995).

2. Objetivos específicos:

- 2.1. Analizar la diversidad desde el punto de vista morfológico y fisiológico de las cepas de *P. larvae* aisladas de distintas fuentes de apiario, predominantemente larvas y mieles.
- 2.2. Poner a punto técnicas para el aislamiento de la especie en cultivo puro evitando el desarrollo de otras especies esporuladas aeróbicas y microaerofílicas comúnmente presentes en ese tipo de muestras.
- 2.3. Determinar la frecuencia de esporas de *P. larvae* en mieles de la Provincia de Buenos Aires durante 3 años consecutivos de muestreo.
- 2.4. Identificar otras especies de bacterias esporuladas aerobias comúnmente presentes en mieles.

3. Materiales y Métodos

3.1. Observación directa a partir de restos larvales con síntomas clínicos mediante tinción y observación por microscopía óptica

3.1.1. Tinción simple

Preparación del colorante:

Solución A: Fucsina básica 0,3 g + etanol (95 %) 10 ml

Solución B: Acido fénico 5 g + agua destilada 95 ml

Al mezclar A + B se obtiene fucsina fenicada de Ziehl.

Técnica: Se prepararon frotis individuales a partir del material viscoso de las celdas homogeneizando los restos larvales en una gota de agua destilada sobre un portaobjetos y se fijaron a la llama. Se colorearon con fucsina fenicada durante 30 s. El exceso de colorante se eliminó por lavado y el portaobjetos se secó con papel tisú antes de examinarlo al microscopio, empleando objetivo de inmersión (100 X). Así se observaron las características morfológicas que permitieron diferenciar las esporas y las células vegetativas bacterianas.

3.1.2. Técnica de "Hanging drop" modificada

Colorante: Fucsina fenicada de Ziehl (3.1.1.)

Técnica: Esta técnica es de rutina para el diagnóstico de loque americana en restos larvales (Alippi, 1991; Alippi, 1996b; Hornitzky & Wilson, 1989; Shimanuki, 1990; Shimanuki & Knox, 1991). Consiste en preparar, a partir del material viscoso de las celdas un extendido sobre un cubreobjetos de 24 X 36 mm, homogeneizando las larvas en una gota de agua destilada y fijándolo a la llama. Paralelamente se coloca aceite de inmersión sobre un portaobjetos, en una superficie algo mayor a la que ocupará el cubre. El frotis fijado en el cubreobjetos se colorea con fucsina fenicada de Ziehl (3.1.1.) durante 20-30 s; se lava con agua corriente y se coloca aún húmedo sobre el portaobjetos con el aceite de modo que la superficie coloreada se contacte con el mismo (en forma invertida). La parte superior del cubre se seca con papel tisú y se observa al microscopio con objetivo de inmersión (X100), colocando previamente una gota de aceite entre el cubre y el objetivo. Esta técnica también puede realizarse a partir de una escama, la que se coloca en agua destilada sobre un cubreobjetos durante 2-3 min, luego se retira la misma y se procede como se describió anteriormente.

3.1.3. Coloración negativa con nigrosina

Preparación del colorante: Solución de nigrosina al 10 % en agua destilada (p/ v)

Técnica: Esta coloración se empleó para determinar la morfología de las células vegetativas de *Melissococcus plutonius*, agente causal de la loque europea y otras especies bacterianas asociadas con esta enfermedad, como por ejemplo, *Paenibacillus alvei*, *Brevibacillus laterosporus* y *Achromobacter eurydice* y así diferenciarlas de las esporas de *P. larvae*. Para la misma, se preparó una suspensión turbia a partir de larvas con síntomas clínicos o colocando una escama en agua destilada por 10-15 min. Una gota de esta suspensión se colocó sobre un portaobjetos al que se le adicionó una gota de la solución de nigrosina. Se mezcló con palillo o aguja histológica y se extendió en forma pareja, se dejó secar al aire y se observó con el objetivo de inmersión (X 100).

3.2. Aislamiento y cultivo bacteriano de *Paenibacillus larvae*

Las técnicas de aislamiento detalladas a continuación se basan en la detección de esporas viables de *Paenibacillus larvae* presentes en larvas con síntomas clínicos de loque americana y también que puedan encontrarse contaminando abejas adultas, miel y polen mediante aislamiento en medio de cultivo específico y posterior caracterización de las colonias obtenidas.

3.2.1. Aislamiento y cultivo bacteriano de *Paenibacillus larvae* a partir de restos larvales

Se tomó una escama individual o material viscoso de las celdas con síntomas clínicos extraído mediante palillos estériles y se suspendió en tubos con tapa a rosca conteniendo 5 ml de agua destilada estéril (una muestra por tubo). Los tubos se sometieron a un "shock térmico" en BM a 80 °C durante 10-15 min con el objeto de matar a las formas no esporuladas bacterianas que pudieran estar presentes en la muestra y activar, al mismo tiempo, la germinación de las esporas de *P. larvae*. Posteriormente se agitaron en vortex durante 2-3 min; se tomaron 100 µl empleando una micropipeta automática y se descargaron en placas de Petri sembradas con medio MYPGP adicionado con 9 µg/ml de ácido nalidíxico (de una sol. madre previamente esterilizada por filtración). El volumen sembrado se dispersó mediante hisopos de algodón estériles.

Las placas así sembradas se incubaron en posición invertida a 37 °C ± 1 dentro de una jarra de anaerobiosis en una atmósfera de 8-10% de CO₂ empleando Anaerocult C® (Merck)

durante 48-72 hs, al cabo de las cuales se observa el desarrollo de las colonias de *P. larvae* y se efectuó la prueba de catalasa según lo detallado en 3.6.4.1.1.



Figura 11: Representación esquemática del aislamiento y cultivo de *Paenibacillus larvae* a partir de restos larvales.

Agar MPYGP:

Fórmula: 15 g de extracto de levaduras; 10 g de caldo Muller-Hinton (Britania®); 2 g de glucosa; 3 g de K_2HPO_4 ; 1 g de piruvato de sodio; 20 g de agar bacteriológico; agua destilada c.s.p. 1.000 ml; pH 7,0

Preparación: El medio se fraccionó en frascos de tapa a rosca a razón de 200 ml por frasco. Se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 15 minutos. Al medio enfriado a 45-50 °C se le agregó 1200 µl de la solución madre de ácido nalidíxico (conteniendo 1500 µg de antibiótico por mililitro) por cada frasco de 200 ml de agar MYPGP (de esta forma se obtiene la concentración deseada de 9 µg/ml) y luego se volcó en placas de Petri estériles de 90 mm de diámetro dentro del banco de flujo laminar.

Preparación de la solución madre de ácido nalidíxico (1.500 µg/ml):

Se pesaron 0,15 g de ácido nalidíxico (Sigma®) y se disolvieron en 100 ml de NaOH 1 N. Se esterilizó por filtración por Millipore® de 0,45 µm de diámetro de poro y el filtrado se recolectó en un recipiente estéril. Se mantuvo refrigerado en heladera a 4 °C por un término máximo de 3 meses.

3.2.2. Aislamiento y cultivo bacteriano de *Paenibacillus larvae* a partir de abejas adultas asintomáticas.

Esta técnica desarrollada por Hornitzky y Karlovskis (1989) se basa en la detección de esporas viables de *Paenibacillus larvae* que puedan estar presentes en abejas adultas (asintomáticas) mediante aislamientos en medios de cultivo específicos, procediéndose a posteriori a la identificación de las colonias obtenidas.

Se tomó una muestra de 30 abejas adultas del área de cría (nodrizas) y se colocaron en una bolsa de plástico a la que se le adicionaron 10 ml de solución buffer fosfato salina (PBS), pH 7,2 estéril. Se efectuó un macerado de la bolsa con un pilón de mortero o en un stomacher y, el

homogeneizado obtenido se filtró por papel de filtro Whatman No 1 y se centrifugó a 1.100 X g durante 30 min. Luego de la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet obtenido en 2 ml de PBS estéril. Posteriormente se agitó en vortex durante 2 min y se llevó a BM a 80-85 °C durante 15 min con el fin de eliminar células vegetativas bacterianas y esporas de hongos que pudieran estar presentes en la muestra y, paralelamente, activar la germinación de las esporas de *P. larvae*. Posteriormente, mediante micropipeta automática se sembraron 50 µl de la suspensión en placas de Petri de 90 mm de diámetro que contenían 20 ml de medio MYPGP adicionado con 9 µg/ml de ácido nalidíxico de acuerdo con lo detallado en 3.2.1. Las placas se incubaron en posición invertida a 37 ± 1°C dentro de una jarra de anaerobiosis en una atmósfera de 8-10% de CO₂ en aire durante 3 días como mínimo -y hasta 7 días - y se procedió a identificar las colonias bacterianas obtenidas de acuerdo con lo detallado en 3.2.1.

PBS (buffer fosfato salina):

Buffer fosfato 0,01M pH 7,2: Na₂HPO₄.12H₂O 2,7 g; NaH₂PO₄ 0,4 g; NaCl 8 g; agua destilada c.s.p. 1000 ml

3.2.3. Aislamiento y cultivo bacteriano de *Paenibacillus larvae* a partir de miel.

Se han desarrollado varios métodos para el aislamiento de esporas viables de *P. larvae* a partir de miel, entre ellos, la siembra directa de la muestra de miel (Hansen, 1984a; 1984b; Hansen & Rasmussen, 1986), y la concentración de esporas por diálisis (Shimanuki & Knox, 1988) o por centrifugación (Hornitzky & Clarck, 1991) y posterior siembra del concentrado de esporas en medios de cultivo. La incorporación de distintas concentraciones de antibióticos a un medio basal apto para el desarrollo de *P. larvae* permite una buena recuperación de esporas del patógeno a partir de mieles con poblaciones heterogéneas de especies bacterianas esporuladas aeróbicas y/o microaerófilas (Alippi, 1995).

La técnica detallada a continuación se basa en la detección de esporas viables de *P. larvae* mediante concentrado de las mismas por centrifugación previa dilución de la miel y posterior aislamiento e identificación de las colonias obtenidas en medio de cultivo semi-selectivo (Alippi, 1995). Por la misma, es posible determinar la cantidad de esporas viables de *P. larvae* en una muestra de miel y obtener colonias puras bacterianas a partir de muestras contaminadas con otras especies esporuladas aeróbicas comúnmente presentes en este tipo de muestras.

Cada muestra se calentó a BM en su correspondiente frasco a 40 - 45° C con el objeto de fluidificarla para luego homogeneizarla con la ayuda de una varilla de vidrio estéril. Se trasvasaron 10 ml de miel pura a un tubo de centrifuga estéril con tapa a rosca en donde se hizo una dilución 1:2 con buffer fosfato 0,01 M pH 7,2 (1:1 v/v) o PBS (buffer fosfato salina) pH 7,2

homogeneizando con varilla de vidrio estéril. Los tubos se centrifugaron a 3.000 X g durante 40 min, descartando el sobrenadante y dejando 3 ml por tubo. El pellet formado conteniendo las esporas bacterianas y granos de polen se resuspendió en los 3 ml que quedaban en el tubo y se sometió a un shock térmico de 85-90 °C durante 15 min, al cabo de los cuales, se agitó en vortex durante 1 min y se sembraron 100 µl del fluido distribuyéndolos con espátula de Drigalsky estéril sobre la superficie de placas sembradas con agar MYPGP adicionado con:

- **MYPGP A:** 6 µg/ml de ac. nalidíxico + 10 µg/ml de ac. pipemídico para mieles con baja contaminación bacteriana con otras especies de *Bacillus* y *Paenibacillus*.
- **MYPGP B:** 9 µg/ml de ac. nalidíxico + 20 µg/ml de ac. pipemídico para mieles con alto grado de contaminación bacteriana.

Con las placas sembradas se procedió de la misma manera descrita anteriormente (3.2.1) verificando la presencia de colonias a intervalos de 2 días y hasta 14 días (última lectura).

Preparación de la solución de ácido pipemídico:

Se pesaron 0,4 g de ácido pipemídico (Sigma®) y se disolvieron en 100 ml de NaOH 1 N. Se esterilizó por filtración por millipore® de 0,45 µm de diámetro de poro y el filtrado se recolectó en un recipiente estéril. Se mantuvo en heladera a 4 °C hasta el momento de usar y por un término máximo de 3 meses. La solución madre contiene 4.000 µg/ml de antibiótico. Para una concentración final en el medio de 10 µg/ml se tomaron 500 µl de sol. madre y mezclaron con 200 ml de medio de cultivo previamente fundido y enfriado a 45 °C. Para una concentración final de 20 µg/ml se tomaron 1.000 µl de la sol. madre y se mezclaron con 200 ml de medio de cultivo previamente fundido y enfriado a 45 °C.



Figura 12: Representación esquemática del aislamiento y cultivo de *Paenibacillus larvae* a partir de miel.

Cálculos para determinar contenido de esporas:

Habida cuenta que el menor número que se puede contar por placa es 1 ufc (unidades formadoras de colonias de *P. larvae*), si en 100 μ l de siembra se cuenta 1 ufc; en 3000 μ l (el pellet de esporas + miel que queda en el tubo de centrifuga) hay 30 ufc, como teóricamente todas las esporas bajan en la centrifugada, hay 3000 ufc en los 10 ml de miel originales. Tomando en cuenta las variaciones de densidad de la miel de acuerdo con el origen botánico de la muestra, se toma una estimación de que 1 ml de miel equivale a 1 g de miel, entonces: En 10 ml de miel (total de la muestra de miel que se centrifuga) hay 3000 ufc, en 1 ml de miel hay 3 ufc correspondientes a ufc viables por gramo de miel (o por ml de miel)

Si se cuenta 1 ufc por placa, esto corresponde a 3 esporas viables / g [1 X 3]

Si se cuentan 5 ufc por placa, esto corresponde a 15 esporas viables / g [5 X 3]

Según Dingman y Stahly (1983), sólo entre el 6% y el 7 % de las esporas de *P. larvae* germinan en los medios de cultivo, entonces:

6% _____ 3 esporas

100% _____ X = 50 esporas potencialmente infectivas (reales) por gramo de miel

7% _____ 3 esporas

100% _____ 43 esporas reales / g de miel

Al efectuar un promedio (46,5 esporas reales) el cálculo sería:

Si se cuenta 1 ufc por placa, este valor corresponde a 46,5 esporas reales/g [1 X 46,5]

Si se cuenta 5 ufc por placa, este valor corresponde a 232,5 esporas reales/g [5 X 46,5]

3.3. Obtención de cultivos puros de *P. larvae*

Las colonias provenientes de las placas de aislamiento y que resultaron con las características morfológicas típicas de *P. larvae* de acuerdo con la bibliografía específica (Gordon *et al.*, 1973) se purificaron por re-estrías de cada colonia individual en medio MYPGP con el agregado de 9 μ g/ml de ac. nalidíxico e incubadas en aerobiosis a 37 \pm 1 $^{\circ}$ C durante 24-48 h.

3.4. Mantenimiento del stock bacteriano

El medio de cultivo utilizado para el desarrollo y mantenimiento de los aislamientos de *P. larvae* fue MYPGP. Las resiembras de los aislamientos obtenidos se purificaron por 3 pasajes en medio sólido.

La colección de aislamientos se mantuvo por triplicado de la siguiente forma:

- A largo plazo congelados a -80 $^{\circ}$ C en crioviales conteniendo caldo MYPGP más glicerol (como crioprotector) a una concentración final de 20 % v/v
- A mediano plazo, cultivos de 4 días y con más del 60% de esporulación se almacenaron a 4 $^{\circ}$ C en crioviales conteniendo agua mineral estéril (Glaciar[®]).
- Los stocks de cultivos de trabajo se mantuvieron en medio MYPGP semi-sólido (0,6% de agar). Los mismos se inocularon mediante un palillo estéril y en punción, incubando a 37 $^{\circ}$ C durante 48 h para posteriormente almacenar a 4 $^{\circ}$ C.

3.5. Aislamiento y cultivo bacteriano de otras especies de *Paenibacillus*, *Bacillus* y *Brevibacillus* presentes en miel y en restos larvales.

Para el aislamiento de otras especies esporuladas aeróbicas a partir de fuentes de apiario, se siguió la misma metodología que la detallada en los puntos 3.2.1, 3.2.2. y 3.2.3, pero empleando como medio de cultivo agar triptona soya (TSA), Britania® e incubando las placas en aerobiosis durante 24 – 48 h a 37 °C ± 1. Las colonias obtenidas se re-estriaron en placas con TSA y se incubaron a 37 °C ± 1. Las colonias individuales obtenidas de esta forma se mantuvieron según lo detallado en 3.4., pero empleando TS como medio base.

3.6. Caracterización de los aislamientos estudiados

3.6.1. Morfología de células vegetativas y esporas

3.6.1.1. Tinción de Gram

Las bacterias se dividen en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas en función de la respuesta que presentan frente a la tinción de Gram (Bartholomew, 1962) que permite distinguir dos tipos de estructura de pared celular mediante una tinción diferencial. Para la misma, se utilizó el método de Gram modificado por Hucker (Hucker & Conn, 1923), en el cual se emplea el cristal violeta de Hucker, una solución de lugol como mordiente y una solución de safranina como colorante de contraste.

Preparación de los colorantes y reactivos:

Cristal violeta: Solución A: cristal violeta 2 g + etanol 95% 20 ml. Solución B: oxalato de amonio 0,8 g + agua destilada 100 ml. Mezclar A+B. Dejar 24 h. Filtrar con papel de filtro.

Lugol: I₂ 1 g + IK 2 g + agua destilada c.s.p. 300 ml.

Decolorante: alcohol etílico 95% (más lento) o acetona (más rápido)

Colorante de contraste: sol. stock: safranina 0,5 g + alcohol etílico 95% 100 ml. Sol. de trabajo: sol. stock 10 ml + agua destilada 90 ml.

Técnica:

Se preparó un film con agua destilada sobre un portaobjetos, se dejó secar al aire y se fijó por 2 pasajes a la llama. Se agregó sol. cristal violeta durante 1 min y se lavó con agua corriente durante 1-2 segundos. Se secó con papel secante y se agregó el lugol, durante 1 min, se escurrió y se decolora con etanol 10-15 s sobre el portaobjetos inclinado hasta que el solvente no tuvo más color. Se enjuagó 2 s con agua corriente. Se coloreó con safranina durante 30 s y se lavó brevemente con agua corriente. Se secó con papel secante y se examinó con objetivo de inmersión (X 100).

Resultado:

Los microorganismos Gram (+) retienen el color azul-violeta y los Gram (-) aparecen de color rojo-rosado.

3.6.1.2. Tinción de esporas. Técnica de Schaeffer-Fulton

Para determinar la presencia de esporas en los cultivos bacterianos se utilizó la tinción de esporas según Schaeffer y Fulton (1933), que es una tinción estructural que utiliza verde de malaquita para la tinción de la espora y una solución de safranina como colorante de contraste.

Preparación del colorante:

Solución acuosa de verde de malaquita al 5% p/v y solución acuosa de safranina O al 0,5% en agua destilada.

Técnica:

Se preparó un frotis bacteriano, se secó al aire y se fijó por 3 pasajes a la llama. Se cubrió el frotis con un rectángulo de papel de filtro y se saturó con sol. de verde de malaquita y se colocó sobre BM hirviendo durante 5 min. Se enfrió, se eliminó el papel de filtro y el porta se lavó con agua corriente durante 30 s. Posteriormente se cubrió con sol. de safranina durante 30 s. Se lavó muy ligeramente, se secó con papel secante y se examinó por inmersión (X 100).

Resultado:

Las esporas se tiñen de verde y las células vegetativas de rojo.

3.6.2. Dimensiones de esporas y células vegetativas:

Se determinó el tamaño promedio de las esporas y células vegetativas. El promedio y la desviación standard (DS) fueron calculados en base a medidas tomadas en 10 campos diferentes en un total de 50 repeticiones a partir de frotis bacterianos teñidos de acuerdo con lo especificado en 3.6.1.2 en cultivos de 24 h y de 72 h (Figura 17).

3.6.3. Observaciones por microscopía electrónica de barrido.

Se realizó un análisis más preciso de la morfología de las células bacterianas por microscopía electrónica de barrido (MEB). Para ello se siguieron las técnicas habituales de fijación, deshidratación y recubrimiento con oro.

Como material de partida se resuspendió en 1 ml de buffer fosfato de sodio 0.2 M pH 7.4, una pequeña cantidad de biomasa celular, obtenida a partir de placas de MYPGP en el caso de *P. larvae* o TSA en el caso de otras especies esporuladas. Los tiempos de muestreo fueron a las 24, 48, 72 hs y 7 días de incubación a temperatura óptima de desarrollo de cada especie (Gordon *et al.*, 1973). Se colocaron gotas de 5 µl de cada suspensión en portaobjetos cortados a un tamaño de 5 X 5 mm, se dejaron secar al aire y se fijaron en glutaraldehído preparado al 5% en buffer fosfato de sodio 0,2M pH 7.4 durante 12 h a 4 °C. Las muestras fijadas se enjuagaron por 3 pasajes de 30 min cada uno en buffer y posterior deshidratación en una serie creciente de acetona (50, 75, 95 y 100% v/v en agua bidestilada).

Para la observación de las esporas bacterianas por MEB, se desarrolló un protocolo específico habida cuenta que la clara observación de la morfología superficial de las esporas es directamente dependiente de la "limpieza" de la suspensión de esporas a examinar. Cuando el nivel de esporulación de la cepa alcanzó el 60% -verificado por observación en microscopio de contraste de fase- el desarrollo bacteriano se suspendió en 20 ml de agua bidestilada estéril en frío y se lavó 3 veces separando las esporas del sobrenadante por una centrifugación a 1.000 g durante 10 min a 4 °C, eliminando el sobrenadante de cada lavado. Luego del último ciclo de centrifugación, el pellet se resuspendió en buffer fosfato (66 mM, pH 6,24) con el agregado de 0,1 % de lisozima (p/v) y se agitó en frascos con tapa a rosca conteniendo perlas de vidrio durante 1 h a 4 °C. Posteriormente, las esporas se separaron de las células vegetativas y restos bacterianos por filtración a través de filtros de 10 µm de diámetro de poro (SPI supplies), se descartó el filtro y el líquido de filtrado se examinó por microscopio de contraste de fase para corroborar la presencia de esporas libres. Las esporas se sedimentaron por centrifugación y lavado durante 3 veces consecutivas en agua destilada (5 min a 2.200 g a 4 °C) y se resuspendieron en una solución de buffer cacodilato de sodio (0,1 M). Se fijaron incorporando 2 partes del fijador (2,5% de glutaraldehído en 0,1 M de cacodilato de sodio) a 1 parte de la suspensión de esporas y se mantuvieron a 20 °C durante 14 h. La muestra así fijada se tomó mediante una jeringa de 5 ml y se filtró a través de una unidad de filtración Nucleopore® (SPI supplies) empleando membranas Nucleopore® (SPI supplies) de 13 mm de diámetro y 0,2 µm de diámetro de poro. En la membrana quedaron retenidas las esporas que se lavaron 3 veces con buffer cacodilato y, posteriormente se hizo pasar una solución de etanol al 20% (v/v) en agua destilada. Con la membrana aún húmeda, se desarmó el portafiltros y la membrana con las esporas se colocó sobre una segunda membrana de contenedores especiales de acuerdo con lo descrito por Watson y colaboradores (Watson *et al.*, 1980). Las membranas en sus correspondientes contenedores se deshidrataron en una serie crecientes de etanol (20%, 50%, 75%, 95% y 100% v/v) previamente filtrado, manteniéndolas durante 10 min en cada una. Luego del último pasaje por alcohol absoluto (100% v/v), las membranas así tratadas se colocaron sobre papel secante para eliminar el exceso de etanol y se secaron al aire o por punto crítico. Se montaron con cinta bifaz sobre tacos para MEB.

Las muestras directas provenientes de larvas afectadas con síntomas de loque americana y de infecciones mixtas se lavaron con PBS, se resuspendieron en agua destilada, se mezclaron en vortex, se centrifugaron a 1.100 g durante 20 min, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 5 ml de agua destilada estéril. Se colocaron gotas de 5 µl de cada muestra en portaobjetos cortados a un tamaño de 5 X 5 mm aproximadamente y se fijaron y deshidrataron en la forma detallada anteriormente. Como controles, se emplearon larvas sanas de 24 y 48 h de

edad que fueron tratadas de la misma manera. En el caso de escamas, las mismas se colocaron directamente sobre los trozos de vidrio y se fijaron y deshidrataron de la misma manera (Alippi, 1991).

Finalmente, todas las muestras (provenientes de cultivos *in vitro* o de restos larvales) se recubrieron al vacío con una película de oro de 200 Å de espesor y se examinaron con un Microscopio electrónico de transmisión marca Jeol modelo JSM-T100.

3.6.4. Características fisiológicas y bioquímicas

3.6.4.1. Enzimas respiratorias

3.6.4.1.1. Catalasa

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en agua (H₂O) y oxígeno (O₂) y se encuentra presente en la mayoría de los microorganismos aerobios y anaerobios facultativos que contienen citocromo (Loewen, 1997).

La actividad catalasa se detectó según el método descrito por Haynes (1972) para *P. larvae* que consiste en cubrir una pequeña cantidad de biomasa bacteriana depositada en un portaobjetos con 0,5 ml de H₂O₂ al 3 %. La presencia del enzima se pone de manifiesto por el desprendimiento de burbujas que indican la presencia de O₂ inmediatamente después de haber añadido el agua oxigenada. Se utilizaron cultivos en MYPGP de 24 h de incubación a 37 °C para las cepas de *P. larvae* y en TSA para el resto de las especies estudiadas.

3.6.4.1.2. Citocromo oxidasa

La actividad citocromo C oxidasa se determinó por el método de Kovács (1956). La prueba de la oxidasa permite detectar la presencia del citocromo C como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria. Para ello se utiliza una solución de tetrametil-p-fenilendiamina al 1 %, compuesto que sustituye al O₂ como aceptor terminal de electrones produciendo una coloración azul violácea por la acción de la citocromo oxidasa.

Para la realización de la prueba se utilizaron cultivos en MYPGP o TSA, según la especie a probar, de 24 h de incubación a 37 °C. Una colonia del microorganismo problema se depositó sobre un disco reactivo Britania[®]. Estos discos contienen el sustrato N,N-dimethyl-1,4-phenylene diammonium dichloride 0.1 µmol, 1-naphtol 1.0 µmol. Este sustrato puede ser reducido por la enzima citocromo oxidasa en presencia de oxígeno molecular dando lugar a la formación de una

molécula de condensación de color rojo-violáceo. La presencia de oxidasa se pone de manifiesto rápidamente por la aparición de color violáceo después de 20-60 s de haber depositado una colonia del microorganismo sobre el disco humedecido con agua destilada estéril.

3.6.4.1.3. Reacción de Voges-Proskauer (V-P)

La prueba de Voges-Proskauer permite determinar si la bacteria estudiada sigue la vía de la fermentación butilén glicólica para la conversión del ácido pirúvico, produciendo mayoritariamente productos neutros como resultado del proceso de fermentación, detectando un producto intermedio en la reacción que es el acetil-metil-carbinol o acetoína.

Esta prueba se realizó según el método de Barritt (1936) y consiste en la detección de acetoína, producto intermedio en la fermentación butanodiólica, que se evidencia en un cultivo del microorganismo en caldo glucosa fosfato al añadir el reactivo de Barritt (solución de α -naftol al 6 % en etanol y solución acuosa de KOH al 40 %) por la aparición de una coloración roja. El medio base fue el indicado por Gordon *et al.* (1973) para *P. larvae*.

Preparación de los reactivos:

Caldo para V-P: Triptona 5 g; extracto de levaduras 15 g; glucosa 5 g; agua destilada c.s.p. 1.000 ml pH final 6,9. Dispensar 5 ml en tubos con tapa a rosca y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Reactivo A: Solución de alfa-naftol al 5% p/v en alcohol absoluto

Reactivo B: Solución acuosa al 40% p/v de KOH

Técnica:

Se sembró una ansada de desarrollo bacteriano de cada cepa de 24-48 h en tubos con caldo V-P y se incubaron en aerobiosis a 37 °C \pm 1. La prueba se efectuó a los 3, 5 y 7 días removiendo 1 ml del cultivo en forma aséptica y mezclándolo con 1 ml de sol. A y 0,6 ml de sol. B en un tubo de hemólisis. Se evaluó el resultado a los 15 y 30 min de agregados los reactivos. Como control se empleó medio basal sin siembra bacteriana más los reactivos.

Interpretación:

Reacción positiva: Coloración rojo-rojiza-rosada en la parte superior del tubo en contacto con el aire, indica que la prueba es positiva, es decir, que la acetoína se ha oxidado pasando a diacetilo.

Reacción negativa: Coloración amarillenta que se mantiene hasta 30 min.

3.6.4.2. Utilización de fuentes de carbono

Se determinó si la bacteria es capaz de fermentar un carbohidrato particular. Se ensayaron individualmente diferentes carbohidratos en bacterias con metabolismo fermentador. La producción de ácidos se pone de manifiesto con un indicador de pH, como por ejemplo el púrpura de bromocresol (5,5-Dibromo-o-Cresulfonftaleína) cuyo intervalo de transición visual es: pH: 5.2 (amarillo) – pH: 6.8 (púrpura). La producción de ácido a partir de carbohidratos, se ensayó en un medio basal (Gordon *et al.*, 1973) diseñado para la determinación del metabolismo de carbohidratos en *P. larvae*.

Preparación de los colorantes y reactivos:

Medio basal: triptona 5 g; extracto de levaduras 15 g; PO_4K_2H 3 g; agua destilada c.s.p. 1.000 ml. Fuente de carbono: Se emplearon d-manitol, L-arabinosa y xilosa como fuentes carbonadas, preparadas por separado en solución acuosa y esterilizadas por filtración empleando filtros "millipore" de 0,45 μ m de diámetro de poro.

Medio de cultivo: Al medio basal esterilizado y enfriado a 50 °C se le agregó una concentración final de carbohidrato del 0,5% pH final: 7. Dispensar en forma aséptica 5 ml en tubos con tapa a rosca.

Colorante indicador: Solución de púrpura de bromocresol en alcohol etílico de 96° preparada a una concentración de 0,04 % p/v.

Técnica:

Cada cepa se siembra en medio basal más el correspondiente carbohidrato y se incuba en aerobiosis a 37 °C \pm 1. Se evalúa a los 7 y 14 días removiendo en forma aséptica 1 ml del cultivo y mezclándolo con 5 μ l del colorante en un tubo tapa a rosca estéril. Emplear 1 ml de medio de cultivo sin siembra como control negativo. Observar el cambio de color del indicador de pH.

Interpretación:

Reacción positiva: Coloración amarilla que indica producción de ácido

Reacción negativa: Coloración púrpura-violácea que indica reacción neutra (igual al control) o ligeramente alcalina.

3.6.4.3. Utilización de ácidos orgánicos (citrato de sodio)

Algunos microorganismos utilizan el citrato presente en el medio de cultivo como única fuente de carbono, esta característica es importante en la identificación de los microorganismos. Si el microorganismo utiliza el citrato como fuente de carbono da lugar a una alcalinización del medio. Esto se pone de manifiesto por un viraje del indicador de acidez (rojo fenol), el medio de cultivo vira de color anaranjado al rojo a la vez que se observa crecimiento en la superficie.

Preparación de los colorantes y reactivos:

Medio basal: triptona 5 g; extracto de levaduras 15 g; PO_4K_2H 3 g; citrato de sodio 1 g; agar 6 g (medio semi-sólido); agua destilada c.s.p. 1.000 ml. Dispensar 5 ml en tubos con tapa a rosca y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Colorante indicador: Solución de rojo fenol en alcohol etílico de 96° preparada a una concentración de 0,04 % p/v.

Técnica:

Cada cepa se sembró en medio basal y se incubó en aerobiosis a 37 °C \pm 1 durante 14 y 21 días. Se evaluó mezclando una alícuota del cultivo con unas gotas del indicador.

Interpretación:

Reacción positiva: Alcalina. Coloración rojo-rojiza que indica la utilización del citrato.

Reacción negativa: Neutra. Coloración anaranjada (igual al control).

3.6.4.4. Reducción de nitratos a nitritos

El ciclo del nitrógeno es un proceso donde este elemento sufre diversas transformaciones entre la forma más oxidada (NO_3^-) y la más reducida (NH_4^+). La fuente inicial de nitrógeno en el ecosistema es el nitrógeno molecular (N_2) de la atmósfera que por varios procesos se convierte en nitrato (NO_3^-) donde puede ser absorbido por las plantas o acumularse libre en el suelo. A su vez, puede reducirse mediante varios procesos asimilatorios (el nitrógeno es adquirido por

microorganismos) como disimilatorios (el nitrógeno se pierde de los microorganismos). Entre los procesos disimilatorios se encuentran la DNRA (reducción disimilatoria para formar amonio), la respiración del nitrato para formar nitrito, la reducción disimilatoria para obtener gas (desnitrificación) y la anammox, acrónimo de oxidación anóxica del ion amonio, que implica la oxidación del amoníaco con nitrito como aceptor de electrones obteniendo nitrógeno gaseoso.

Las bacterias pueden reducir los nitratos por tres vías diferentes: asimilación (los nitratos son reducidos a amonio mediante una serie de reacciones que incluyen el nitrito $[\text{NO}_2^-]$ como intermediario), desasimilación (los nitratos $[\text{NO}_3^-]$ son utilizados como aceptores finales de electrones en condiciones críticas o ausencia de O_2) y desnitrificación (las bacterias convierten los nitratos $[\text{NO}_3^-]$ en productos gaseosos tales como nitrógeno gas $[\text{N}_2]$ y óxido de nitrógeno $[\text{N}_2\text{O}]$, aunque también se puede acumular nitrito $[\text{NO}_2^-]$ como intermediario. La capacidad reductora de nitratos se verificó según lo indicado por Gordon y col. (1973).

Técnica: En esta prueba se detecta una respiración anaerobia: la que utiliza nitrato como aceptor final de electrones. Los nitratos se reducen a nitritos y algunas especies bacterianas reducen los nitritos a productos gaseosos (N_2 y N_2O). Las enzimas responsables de ambas reducciones se denominan nitrato y nitrito reductasa, respectivamente. El ensayo se realizó utilizando un caldo de nitratos que se reparte en tubos con tapa a rosca. Para *P. larvae* se empleó medio J líquido adicionado con NO_3K (Gordon et al., 1973). La reducción de nitratos a nitritos se detectó al añadir al medio líquido incubado durante 3 y 7 días a 37 °C, los reactivos de Griess-Ilosvay (nitratos A y nitratos B; empleando el kit comercial Britania[®], que contienen alfa-naftil-amina y ácido sulfanílico, respectivamente). Estos compuestos junto a los nitritos originados por la bacteria dan lugar a un compuesto diazoico de color rojo. Si no aparece coloración se añade Zinc metálico (Zn), que reduce los nitratos a nitritos, de manera que si la bacteria no ha reducido los NO_3^- al añadir polvo de Zn se producirá una coloración roja. En el caso de que no se origine coloración significa que el microorganismo ha reducido los nitratos a N_2 o bien a NH_4^+ .

3.6.5. Pruebas adicionales para identificar otras especies de *Paenibacillus*, *Bacillus* y *Brevibacillus* aisladas de miel y restos larvales.

Para identificar al resto de las especies esporuladas aisladas según lo explicado en el punto 3.5, se efectuaron todas las pruebas detalladas para la identificación de *P. larvae* (3.6.1; 3.6.2; 3.6.3 y 3.6.4) como así también las siguientes pruebas de acuerdo con lo descrito por Gordon y col. (1973) y Park y col. (1983).

3.6.5.1. Detección de inclusiones lipídicas

Las bacterias pueden acumular diversos tipos de depósitos de reserva para usarlos en condiciones adversas, razón por la cual, en el citoplasma de ciertos grupos bacterianos pueden encontrarse diferentes inclusiones de reserva. Dentro de las inclusiones lipídicas, un lípido de

reserva frecuentemente presente en algunas especies de *Bacillus* y *Pseudomonas* es el polímero poli-beta-hidroxibutírico que se detecta por tinción celular mediante colorantes liposolubles, como el Sudán Black.

Para una primera diferenciación de las bacterias del "grupo cereus" conformado por las especies *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycooides* y *Bacillus wehenstephanensis* se observó la presencia de inclusiones lipídicas mediante la técnica descrita por Harmon y col (Harmon *et al.*, 1991). Estas inclusiones lipídicas también se encuentran en otras especies de *Bacillus*, como por ejemplo *B. megaterium*.

Preparación del colorante:

Solución de Sudán Black B: 0,3 g en 100 ml. de etanol al 70%

Xilol

Safranina O: solución acuosa al 0.5% p/v

Técnica:

Se preparó un frotis bacteriano, a partir de cultivos de al menos 48 h, se secó al aire y se fijó por 3 pasajes a la llama. Se cubrió con solución de Sudán Black B durante 10 min. y se aclaró con unas gotas de xilol. Se secó con papel secante y se cubrió con safranina durante 30 s, se enjuagó con agua corriente durante 2 s, se secaron y se observaron al microscopio bajo objetivo de inmersión (X 100).

Resultado:

Las células vegetativas se tiñen de color rojo y las inclusiones lipídicas de color azul-negro.

3.6.5.2. Determinación de la presencia de inclusiones cristalinas

Esta coloración se utilizó para diferenciar cepas de *B. thuringiensis* del resto del "grupo cereus" y se basa en la tinción diferencial de inclusiones cristalinas visibles al microscopio óptico durante la esporulación. Las cepas de *B. thuringiensis* poseen diversos plásmidos que contienen genes que codifican para proteínas insecticidas, como por ejemplo las δ -endotoxinas también llamadas proteínas Cry. Estas proteínas son sintetizadas y ensambladas en cuerpos de inclusión parasporales durante la fase estacionaria de su ciclo de crecimiento (Höfte & Whiteley, 1989).

Para visualizar las inclusiones cristalinas parasporales, se realizó una tinción específica empleando la metodología de Hannay (1953). Los aislamientos se desarrollaron en agar nutritivo e incubaron a 30°C durante 24 h. Luego fueron llevados a temperatura ambiente por 3 días momento en que se efectuó la tinción.

Colorante: Fucsina fenicada de Ziehl (3.1.1.)

Técnica:

Se realizó un frotis bacteriano, se secó al aire y se fijó por 3 pasajes a la llama. Se cubrió con metanol durante 30 s, se secó al aire y se cubrió con solución de fucsina fenicada, se expusieron a la llama hasta observar desprendimiento de vapor. Se enjuagó con agua corriente, se secó y examinó bajo objetivo de inmersión (X 100)

Resultado: Cristales de color morado con forma piramidal, romboidal, cúbica o amorfos, fuera o en el interior de la célula bacteriana como inclusiones parasporales.

3.6.5.3. Producción de lecitinasa

Las lecitinasas son lipasas capaces de actuar sobre la lecitina, sustancia orgánica nitrogenada y fosfatada, contenida principalmente en la yema de huevo, produciendo un precipitado de ácidos grasos libres, que se visualiza como halos opacos alrededor de las colonias bacterianas.

Técnica: Se preparó agar nutritivo como medio basal adicionado con solución de yema de huevo estéril al 5 %. Las placas se sembraron en posición central e incubaron a 30°C, evaluando de halos opacos luego de 2, 4 y 7 días de incubación

Interpretación:

Reacción positiva: Presencia de un precipitado de ácidos grasos alrededor de las colonias.

Reacción negativa: No se observan halos rodeando a la siembra bacteriana.

3.6.5.4. Actividad tirosinasa

El pardeamiento enzimático es una reacción de oxidación en la que interviene como substrato el oxígeno molecular, catalizada por la enzima tirosinasa.

Técnica: Los aislamientos se sembraron como una estría única en posición central, en placas de agar nutritivo suplementado con L-Tirosina al 0,5%. Las placas se incubaron a 30°C durante 7 días.

Interpretación

Reacción positiva: Formación de un precipitado marrón rodeando y por debajo de la estría que indica la producción de melanina.

Reacción negativa: No hay formación de precipitado ni alteración de color del medio de cultivo.

3.6.5.5. Actividad hemolítica

Las hemolisinas son enzimas que lisan los hematíes o glóbulos rojos de la sangre. Esta reacción puede observarse en forma de halos transparentes alrededor de las colonias bacterianas cuando se cultivan en medios con sangre. Se han descrito 5 hemolisinas denominadas: alfa, beta, gamma, delta y delta-variante que producen diferentes tipos de hemólisis.

Técnica:

Los aislamientos de *P. larvae* se sembraron en agar base Columbia (Britania®) suplementado con 5 % de sangre ovina estéril y se incubaron a 37 °C y se evaluó a las 24, 48, 72 y 96 h. Los aislamientos de otras especies bacterianas esporuladas se sembraron en agar nutritivo suplementado con 0,15M de ClNa + 5 % de sangre ovina y se incubaron a 30 °C, evaluando a las 24, 48 y 72 h.

Interpretación:

Se evaluaron los distintos tipos de hemólisis según se detalla a continuación:

Alfa hemólisis: Parcial destrucción de los glóbulos rojos cerca de la colonia, acompañado de una coloración verde marrón del medio, dado que el grupo heme de la hemoglobina es oxidado a biliverdina.

Beta hemólisis: Se observa como una zona clara, incolora alrededor de la colonia por destrucción completa de los glóbulos rojos.

Hemólisis beta discontinua: Se observa un pequeño halo de células parcialmente lisadas adyacente a la

colonia bacteriana, rodeada por una zona de hemólisis completa

Gamma hemólisis: *Se produce cuando la hemólisis es incompleta y se observa como una decoloración en la superficie de las colonias, pero sin formación de biliverdina.*

Alfa-beta hemólisis: *Colonias que presentan alfa hemólisis primaria, que es una hemólisis alfa que se extiende de la colonia hacia abajo con beta hemólisis*

Ausencia de hemólisis: *No se observa ninguna de las reacciones descritas anteriormente.*

3.6.5.6. Hidrólisis del almidón

El almidón es un biopolímero que está compuesto por dos glucanos, la amilosa y la amilopectina. Los microorganismos que excretan amilasas hidrolizan esos polímeros hasta oligo o monosacáridos que son las fuentes de energía para su desarrollo. La hidrólisis de almidón puede detectarse en medios sólidos conteniendo almidón determinando la producción de la exoenzima α -amilasa.

Medio de cultivo:

Medio J sin glucosa + 1,5% de almidón soluble. Una vez esterilizado se volcó en cajas de Petri y se reservaron en heladera durante 48 hs, para incrementar la opacidad.

Técnica:

Se sembró por duplicado y probó con lugol luego de 5 y 10 días de incubación a la temperatura óptima de crecimiento de cada especie.

Interpretación:

Reacción (+): Áreas traslúcidas rodeando a las colonias.

Reacción (-): Coloración azul del medio, no hubo hidrólisis puesto que el lugol reacciona con el almidón inalterado.

3.6.5.7. Hidrólisis de gelatina

Esta prueba se emplea para determinar si los microorganismos sintetizan la exoenzima proteolítica gelatinasa que licúa la gelatina.

Medio de cultivo:

Agar nutritivo adicionado + 4 % de gelatina en tubos tapa a rosca mantenidos en heladera.

Técnica:

Los aislamientos se sembraron en profundidad mediante un hilo de siembra de platino y se incubaron a la temperatura óptima de crecimiento durante 7 días, utilizando un control negativo (sin siembra). Para realizar la lectura, se colocan a 4 °C durante 30 minutos.

Interpretación:

Reacción positiva: *Se observa una licuefacción del medio en contraste con el testigo que permanece inalterado.*

3.6.5.8. Producción de indol

El indol es uno de los productos de degradación del metabolismo del aminoácido triptofano. La presencia de la enzima triptofanasa en la bacteria provoca la hidrólisis del triptófano y su desaminación, produciendo indol, ácido pirúvico y amoníaco.

Medio de cultivo:

Caldo J con doble cantidad de triptona y sin glucosa.

Reactivo: paradimetilaminobenzaldehído 5 g + isoamiloalcohol 75 ml + HCl concentrado 25 ml.

Técnica:

Luego de 14 días de incubación se agregó 2 ml por tubo del reactivo de indol (Britania) y se agitó en vortex.

Interpretación: Color rosado-rojo indica presencia de indol.

3.6.6. Empleo de pruebas bioquímicas miniaturizadas: Galerías API 50 CH y complemento con API 20E.

En caso necesario se emplearon Galerías API 50 CH y el medio API 50CHB y API 20E (Biomeriex®) de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

3.7. Cepario de trabajo de *Paenibacillus larvae*

El cepario que se utilizó para realizar esta tesis estuvo conformado por cepas de *P. larvae* aisladas de escamas, restos larvales, abejas adultas o mieles en el laboratorio (n=413) según lo detallado en 3.2.; cepas de Colecciones Internacionales (n=21) y cepas enviadas al laboratorio por otros investigadores como cultivo (n=21). Los listados de todas las cepas de *P. larvae* empleadas (n= 455) se detallan en los Apéndices I y II.

Con fines comparativos se incluyeron cepas de *P. larvae* del grupo *ex pulvifaciens* según lo explicado en el apartado 3.3.2.4. Estas cepas (n=5) provenían de Colecciones Internacionales o fueron cedidas por otros investigadores y se detallan en el Apéndice III.

3.8. Cepario de trabajo de especies de *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Brevibacillus*

Se conformó una colección de aislamientos de otras especies esporuladas aeróbicas y microaerofílicas comúnmente presentes en miel y larvas de abejas según lo explicado en 3.5. la cual se detalla en el Apéndice II.

3.9. Cepas provenientes de Colecciones Internacionales

Las cepas de *P. larvae* provenientes de Colecciones Internacionales se listan en el Apéndice III. El resto de las cepas empleadas durante el desarrollo de esta Tesis provenientes de Colecciones Internacionales o provistas por laboratorios de referencia se detallan en el Apéndice IV junto con su correspondiente numeración, la temperatura óptima de desarrollo y el medio de cultivo empleado para su cultivo y mantenimiento.

3.10. Prevalencia de esporas de *Paenibacillus larvae* en mieles de la Provincia de Buenos Aires.

Se efectuó un monitoreo al azar de la distribución de esporas viables de *P. larvae* a partir de muestras de mieles de productores apícolas de los distintos partidos de la Provincia de Buenos Aires durante 3 años consecutivos (1999-2000-2001) de acuerdo con la metodología descrita en el punto 3.2.3. El tamaño muestral fue de 394 muestras definido para una certeza del 95%. Para calcular el tamaño de muestra, se consideró la siguiente fórmula (Cantatore de Frank, 1980):

$$n = \frac{K}{C} * p * q$$

donde:

n = tamaño de la muestra

K = valor que corresponde a la C.N.S. (confiabilidad del 95%)

C = certeza deseada

p = probabilidad de hallar el evento

q = probabilidad de no hallar el evento

Asumiendo un nivel de confianza del 95% y una certeza de 0,05, el tamaño de la muestra será de 394 mieles.

Se efectuaron 4 repeticiones de cada muestra de miel y se calculó el promedio de los valores de ufc por placa de aislamiento, los cuales se diferenciaron según la siguiente escala:

Nivel 0: Ninguna ufc detectable en la placa

Nivel 1: Entre 1 y 20 ufc por placa

Nivel 2: Entre 21 y 50 ufc por placa

Nivel 3: Entre 51 y 199 ufc por placa

Nivel 4: Entre 200 y 999 ufc por placa

Nivel 5: 1.000 o más c.f.u. por placa

Para determinar diferencias estadísticamente significativas, se empleó como estadístico la prueba de chi cuadrado de Pearson a un valor de $P > 0,05$ (Cantatore de Frank, 1980).

4. Resultados y Discusión

4.1. Observación directa a partir de restos larvales

Se detectaron esporas de *P. larvae* en 106 muestras de restos larvales y/o escamas, las cuales presentaron movimiento Browniano cuando se observaron mediante la técnica del *Hanging drop*. Al efectuar una tinción simple con fucsina de una submuestra del mismo material, se visualizaron las esporas bacterianas del patógeno de forma oval con dimensiones de 0,6-0,8 μm de ancho X 1,3-1,5 μm de largo, sólo la pared de la spora se tiñó de un color rojizo violáceo intenso mientras que la parte central apareció con una coloración rojiza más tenue. Cuando se efectuaron observaciones a partir de larvas de menos de 10 días de infección, se observaron únicamente formas vegetativas con largos flagelos con disposición peritrica en lugar de las esporas del patógeno.

Cuando se efectuaron observaciones mediante la técnica de *Hanging drop* modificada, sólo las esporas de *P. larvae* presentaron movimiento Browniano, este se manifestó en las áreas donde el agua forma glóbulos con el aceite. Las esporas y células vegetativas de otras especies bacterianas asociadas con la loque europea permanecieron fijas al vidrio. Ocasionalmente, algunas esporas bacterianas pueden aparentar cierto movimiento, entonces se consideró el tamaño de las mismas, habida cuenta que *P. larvae* es la especie (patógena de abejas) que posee esporas más pequeñas (0,6 - 0,8 μm X 1,3 - 1,5 μm) (Shimanuki & Knox, 1991).

En el 80 % de las muestras provenientes de Argentina (n= 54) se encontraron esporas de *Paenibacillus alvei* junto con *Paenibacillus larvae*. Cuando se observaron esporas de *P. alvei*, las mismas fueron más grandes (0,8 X 2,0 μm) y la pared celular se tiñó de un color rojo más intenso en comparación con *P. larvae*. La presencia simultánea de ambas especies estaría contradiciendo la creencia generalizada de que *P. larvae* sólo aparece en cultivo puro en larvas sintomáticas (Bailey & Lee, 1962; Gochnauer *et al.*, 1975). Esto no se encontró cuando se observaron escamas o material viscoso provenientes de otros países (n= 52) con excepción de algunas muestras de Uruguay y EE.UU.

En muestras provenientes de larvas afectadas por loque europea y coloreadas con nigrosina (3.1.3) se observaron las formas vegetativas de *M. plutonius* como cocos lanceolados, en disposición simple y/o en cadena o en cúmulos (Figura 25 A). En la mayoría de los casos observados (94 %) se detectó la presencia de esporas de *Paenibacillus alvei* y, ocasionalmente, *Brevibacillus laterosporus* (2%). En estos casos, las esporas aparecían brillantes y las formas vegetativas y esporangios grisáceos sobre el fondo negro de la preparación como lo descrito por

Shimanuki & Knox (1991). *Brevibacillus laterosporus* y *Achromobacter eurydice* se consideran microorganismos secundarios habitualmente presentes en larvas afectadas por loque europea y, cuando se detecta su presencia, se toma como evidencia presuntiva de la existencia de esta enfermedad (Shimanuki & Knox, 1991). La observación de esporas de *P. alvei* en restos larvales también se ha empleado como indicador de loque europea (Hornitzky & Wilson, 1989; Shimanuki & Knox, 1991), pero, al mismo tiempo, se lo ha considerado un microorganismo saprobio que vive a expensas de larvas muertas (Hornitzky & Karlovskis, 1989).

4.2. Caracterización de los aislamientos estudiados

Se obtuvieron 54 aislamientos de *P. larvae* de restos larvales y/o escamas con síntomas clínicos de la enfermedad y 252 aislamientos de mieles provenientes de distintas localidades geográficas de la Argentina según lo detallado en el Apéndice I.

A partir de material de panales afectados remitidos por investigadores de otros países, se obtuvieron 3 aislamientos de Alemania, 5 de Francia, 5 de Italia, 9 de N. Zelanda, 6 de Polonia, 11 de Sudáfrica, 4 de Suecia, 1 de Túnez y 8 de Uruguay (Apéndice I).

Cuando se trabajó con material de restos larvales y escamas, en todas las muestras en las que se observó la presencia de esporas de *P. larvae* por microscopía (n=106) se obtuvieron, en medio MYPGP adicionado con ácido nalidíxico, aislamientos bacterianos con las características fenotípicas de *P. larvae*. El desarrollo bacteriano fue observado al cabo de un período de 48-72 hs de incubación en microaerofilia a 37 ± 1 °C, en forma de cobertura completa de las placas de aislamiento por lo que se purificaron por re-estrías en medio MYPGP con el agregado de 9 µg/ml de ac. nalidíxico e incubación en aerobiosis a 37 ± 1 °C durante 24-48 h para obtener colonias individuales de cada aislamiento. Las colonias puras presentaron coloración blanco grisácea y un tamaño de aproximadamente 3-4 mm de diámetro a las 48 hs de desarrollo (Figura 13). Estos resultados coinciden con los datos aportados por la bibliografía para esta especie (Gordon *et al.*, 1973). No obstante, las cepas PL SAGm289, PL SAGm290, PL SAG10230 y PL SAG10754 mostraron colonias redondeadas de color anaranjado claro (Figura 14) en concordancia con las colonias pigmentadas excepcionalmente observadas por otros investigadores (Drobnikova *et al.*, 1993, Neuendorf *et al.*, 2004). La incorporación de 9 µg/ml de ácido nalidíxico al medio de cultivo resultó satisfactoria para lograr obtener cultivos puros de *P. larvae* dado que las colonias móviles de la bacteria saprobio *P. alvei* terminan sobredesarrollando las placas de aislamiento si se emplea MYPGP basal. Los resultados aquí expuestos demostraron la existencia de poblaciones mixtas de esporas bacterianas de *P. larvae* y *P. alvei*, tanto en material viscoso como en escamas

procedentes de cuadros de panal de cría afectados por loque americana, corroborando observaciones previas (Alippi, 1991, 1992a, 1992b). Una situación similar se ha descrito en Australia, en donde también se halló la presencia de esporas de *P. alvei* junto con *P. larvae* (Hornitzky & Karlosvkis, 1989; Hornitzky & Wilson, 1989). La alta frecuencia de esporas de *P. alvei* halladas en las muestras analizadas estaría indicando que esta especie sería un colonizador común del apiario y se multiplicaría y esporularía sobre larvas muertas por loque europea, loque americana, cría ensacada u otras causas.

Se obtuvieron 252 aislamientos de *P. larvae* de mieles provenientes de distintas localidades geográficas de la Argentina y 55 aislamientos de mieles comerciales provenientes de otros países productores (1 de Brasil, 3 de Canadá, 1 de Chile, 5 de España, 17 de EE.UU., 7 de Francia, 18 de Italia, 1 de Panamá y 2 de Sudáfrica (Apéndice I).

Fueron remitidas como cultivo 42 cepas (2 de Argentina, 2 de Bélgica, 2 de Chile, 10 de EE.UU., 3 de Inglaterra, 2 de Japón, 4 de República Checa, y 13 de Colecciones Internacionales de origen desconocido).



Figura 13: Colonias de *P. larvae* desarrolladas en agar MYPGP suplementado con 9 µg/ml de ácido nalidíxico.

La totalidad de las cepas de *P. larvae* estudiadas (n=455) resultaron bacilos Gram (+) (Figura 17) que presentaron esporas elipsoidales en posición terminal o subterminal con engrosamiento del esporangio (Figura 18). Los aislamientos presentaron reacción negativa tanto para catalasa (Figura 19) como para citocromo-oxidasa (Figura 20) y V-P. Ninguna cepa utilizó citrato y la mayoría de los aislamientos (99 %) redujo nitrato a nitrito (Figura 21). Todas las cepas

provenientes de Argentina presentaron actividad nitrato-reductasa, con respecto a las provenientes de otros países, sólo 4 cepas de Francia (PL228, PL229, PL 231, PL288) y 1 de EE.UU. (NRRLB-3555) presentaron actividad negativa. Se observó utilización de glucosa y trehalosa visualizada como producción de ácido en aerobiosis pero no arabinosa, ni xilosa en la totalidad de las cepas analizadas y, resultados variables en cuanto a la utilización de d(+) manitol y salicina.

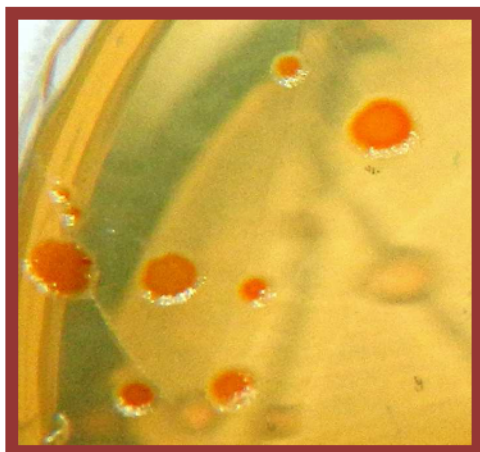


Figura 14: Colonias pigmentadas de *P. larvae* desarrolladas en agar MYPGP suplementado con 9 µg/ml de ac. nalidixico.

Adicionalmente, se estudiaron 5 cepas de *P. larvae* pertenecientes al ex grupo *pulvifaciens* provenientes de Colecciones Internacionales (Apéndice III). Todas las cepas de este grupo resultaron bacilos Gram (+), presentaron esporas elipsoidales en posición terminal o subterminal con engrosamiento del esporangio y reacción negativa o débil de catalasa y negativa para citocromo-oxidasa. Se observó utilización de d(+) manitol, glucosa y trehalosa pero no de salicina ni xilosa.



Figura 15: Cepa ATCC 13537 perteneciente al ex grupo *pulvifaciens* desarrollada en MYPGP.

Todas las cepas estudiadas presentaron reacción de hemólisis positiva al cultivarlas en Columbia suplementado con sangre ovina. Dentro de la colección analizada se observaron colonias bacterianas pigmentadas de una coloración variable entre el anaranjado y el rojo intenso al cultivarlas tanto en agar MYPGP (Figura 15) como en Columbia suplementado con sangre ovina. Todos estos resultados son coincidentes con los descritos por otros autores (Genersch *et al.*, 2006; Neuendorf *et al.*, 2004)

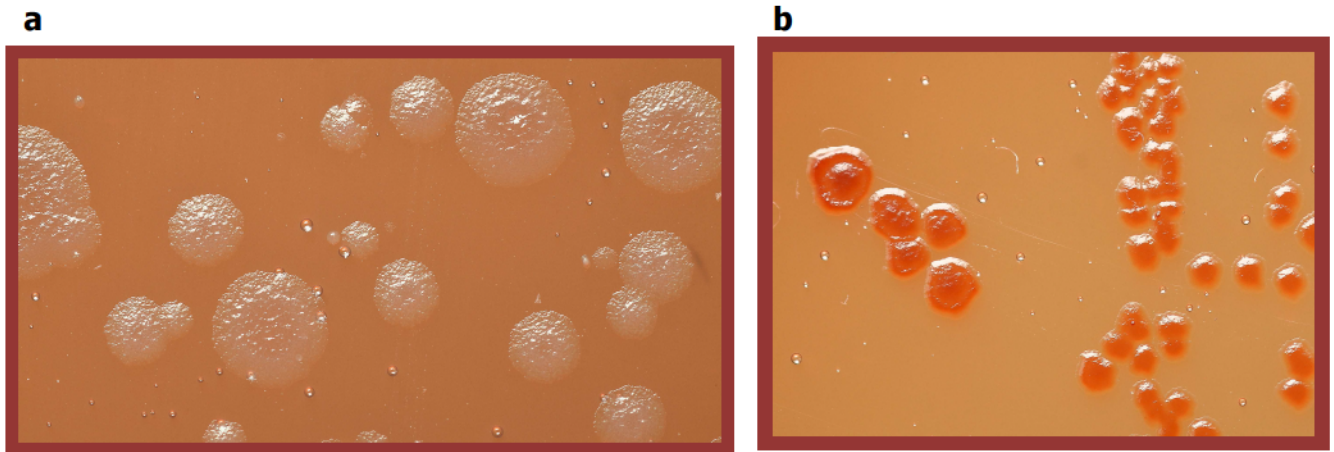


Figura 16: Colonias de *P. larvae* desarrolladas en agar Columbia suplementado con 5% de sangre bovina a) Cepa PL ATCC 9574 y b) PL SAG m290



Figura 17: Tinción de Gram



Figura 18: Tinción de esporas

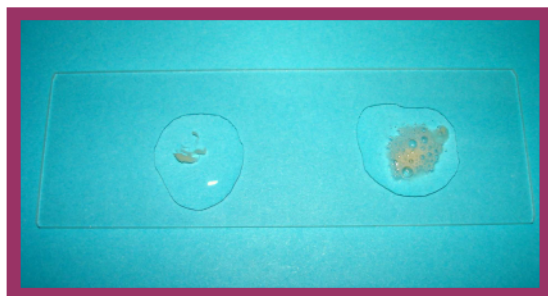


Figura 19: Prueba de catalasa:
Izquierda reacción negativa (*P. larvae*)
Derecha: reacción positiva (*P. alvei*)

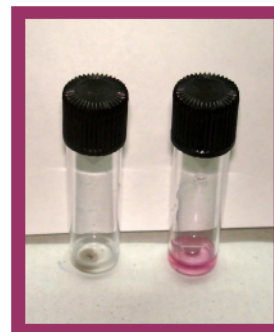


Figura 20: Reacción de citocromo-oxidasa:
Izquierda: Negativa (*P. larvae*)
Derecha: Positiva (*P. alvei*)

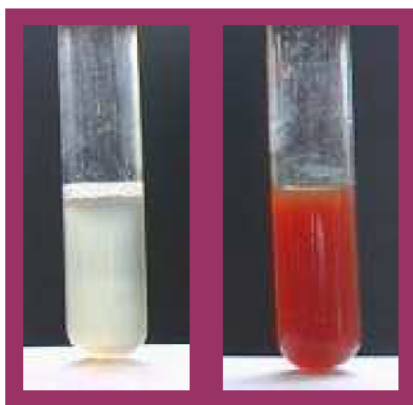


Figura 21: Actividad de nitrato-reductasa:
Izquierda Reacción negativa (PL228) - Derecha: Reacción positiva (PL 2)

Además, se realizaron aislamientos de otras especies bacterianas esporuladas aerobias (3.5), se obtuvieron 129 aislamientos de *Bacillus cereus* (Fig. 28), 62 de *Paenibacillus alvei* (Figura 23), 52 de *Bacillus megaterium* (Figura 29), 8 de *Bacillus mycoides*, 5 de *Bacillus thuringiensis*, 6 de *Lysinibacillus sphaericus*, 5 de *Brevibacillus laterosporus* (Figura 26), 5 de *Bacillus circulans*, 6 de *Bacillus subtilis* (Figura 30), 1 de *Bacillus polymyxa*, 2 de *Bacillus licheniformis* (Figura 31) y 1 de *Bacillus pumilus*. Se identificaron de acuerdo con las técnicas descritas en 3.6.5 y posterior confirmación mediante el empleo de galerías API 20E y API 50CH y software Apiweb® (3.6.6)

Los aislamientos identificados como *Paenibacillus alvei* (n= 65) resultaron Gram variable (Gram positivos a las 24 h), positivos para las reacciones de catalasa, oxidasa, utilización de glucosa, V-P, almidón, gelatina y producción de indol pero negativos para L-arabinosa, xilosa y d-manitol, utilización del citrato y reducción de nitratos a nitritos, no

presentaron inclusiones lipídicas ni cristales parasporales lo cual coincide con la descripción para la especie (Gordon *et al.*, 1973; Parry *et al.*, 1983; Priest *et al.*, 1988).

Todos los aislamientos identificados como *Bacillus cereus* sensu estricto (n= 129) resultaron Gram (+), presentaron inclusiones de poli- β -hidroxibutirato pero ausencia de inclusiones cristalinas, catalasa positivos e hidrolizaron gelatina pero no utilizaron L-arabinosa ni xilosa ni produjeron indol. Dentro de las diferencias metabólicas propias de la especie (Gordon *et al.*, 1973), el 71% fermentó glucosa siguiendo la vía butilén glicólica (reacción V-P positiva), un 84% degradó almidón a través de producción de α -amilasas, el 86% redujo nitratos a nitritos, el 64 % resultó positivo para actividad tirosinasa, y el 91 % presentó β - hemólisis, algunos con patrón discontinuo. No obstante, también se encontraron algunas cepas con características atípicas para la especie, tal es el caso de lecitinasa, (4 %), manitol (14 %) y hemólisis (5 %) negativas. La existencia de cepas de *B. cereus* atípicas ya había sido observado por Pirttijärvi y colaboradores (1996, 1998, 1999) en aislamientos provenientes de muestras ambientales y de la industria láctea. Con el mismo perfil metabólico que las cepas de *B. cereus*, se identificaron 5 aislamientos de conteniendo inclusiones cristalinas que se identificaron como *B. thuringiensis* y 8 cepas que por morfología de colonias se incluyeron en el grupo de *Bacillus mycoides*, ambas especies junto con *B. anthracis*, *Bacillus pseudomycoides* y *Bacillus weihenstephanensis* constituyen el grupo *B. cereus sensu lato*.

Todas las cepas de *Bacillus megaterium* (n= 52) resultaron Gram positivas o Gram variables, presentaron inclusiones de poli- β -hidroxibutirato pero ausencia de inclusiones cristalinas, oxidasa negativas, fermentaron L-arabinosa y d-manitol y resultaron catalasa y gelatinasa positivas; con respecto a las reacciones de V-P, hidrólisis del almidón, reducción de nitratos, utilización de xilosa, actividad tirosinasa, producción de lecitinasas, y actividad hemolítica, las cepas mostraron resultados variables pero siempre dentro de las características propias de la especie (Gordon *et al.*, 1973; Parry *et al.*, 1983; Priest *et al.*, 1988).

Los 5 aislamientos de *Bacillus circulans* presentaron reacción de Gram variable (positiva en cultivos de 24 h), no presentaron inclusiones de poli- β -hidroxibutirato, resultaron catalasa positivos, oxidasa positivos, utilizaron glucosa, L-arabinosa, xilosa y d-manitol, hidrolizaron almidón, pero no utilizaron indol ni presentaron actividad tirosinasa; con respecto a la utilización de citrato y la reducción de nitratos a nitritos los resultados

dependieron de la cepa probada.

Los 2 aislamientos de *Bacillus licheniformis* estudiados compartieron las mismas características que la cepa de referencia *B. licheniformis* NRRL B-1001, resultando Gram positivos, no presentaron inclusiones de poli- β -hidroxibutirato, catalasa positivos, utilizaron glucosa, L-arabinosa, xilosa y d-manitol, hidrolizaron almidón, utilizaron citrato y redujeron el nitrato pero resultaron negativos para indol, oxidasa y actividad tirosinasa.

El aislamiento de *P. polymyxa* mv46 compartió las mismas características presentadas por la cepa de referencia NRRL B-510 resultando Gram positivo, no presentó inclusiones de poli- β -hidroxibutirato, catalasa positivo, utilizó glucosa, L-arabinosa, xilosa y d-manitol, hidrolizó almidón y gelatina, redujo el nitrato pero resultó negativo para oxidasa, utilización de citrato, producción de indol, actividad tirosinasa y lecitinasa.

El aislamiento de *Bacillus pumilus* m350 compartió las características presentadas por la cepa de referencia ATCC 7061 resultando Gram positivo, no presentó inclusiones de poli- β -hidroxibutirato, utilizó glucosa, L-arabinosa, xilosa, d-manitol y citrato, hidrolizó gelatina, fue positivo para V-P, y resultó negativo para oxidasa, tirosinasa, lecitinasa, hidrólisis del almidón y reducción de nitratos.

Las 5 cepas de *Lysinibacillus sphaericus* estudiadas también presentaron un idéntico patrón metabólico coincidente con la descripción dada por la bibliografía (Ahmed *et al.*, 2007, Gordon *et al.*, 1973, Parry *et al.*, 1983; Priest *et al.*, 1988), resultando Gram positivos, catalasa positivos, no presentaron inclusiones de poli- β -hidroxibutirato, y dando reacciones negativas para el resto de las reacciones ensayadas (V-P, citrato, indol, almidón, gelatina, glucosa, d-manitol, L-arabinosa, xilosa, tirosinasa, oxidasa y nitratos).

Con respecto a los 6 aislamientos de *Bacillus subtilis* los mismos fueron Gram positivos, no presentaron inclusiones de poli- β -hidroxibutirato, catalasa positivos, utilizaron glucosa, L-arabinosa, xilosa y d-manitol, hidrolizaron almidón y gelatina, utilizaron citrato, produjeron acetil-metil carbinol (V-P positivo) y redujeron nitratos pero no presentaron actividad tirosinasa, oxidasa ni lecitinasa en coincidencia con los resultados obtenidos con la cepa ATCC 10783.

Finalmente, las cepas de *Brevibacillus laterosporus* (n= 5) resultaron Gram variables (Gram positivas a las 24 h) catalasa positivas, negativas para V-P, utilizaron glucosa, d-manitol pero no L-arabinosa ni xilosa, como tampoco citrato ni indol, no hidrolizaron almidón, redujeron nitratos y presentaron actividad tirosinasa.

La posterior confirmación mediante el empleo de galerías API 20E y API 50CH y software Apiweb[®] arrojó, en todos los casos, valores de identificación del programa (ID) mayores al 90%. Dicha identificación fue complementada con características adicionales observadas por microscopía: forma, dimensiones y ubicación de las esporas y células vegetativas bacterianas y presencia de inclusiones lipídicas. Como controles para todas las pruebas ensayadas, se emplearon las cepas de Colecciones Internacionales citadas en el Apéndice III.

4.3. Observaciones por microscopía electrónica de barrido

Mediante los estudios efectuados por MEB fue posible diferenciar entre sí a todas las especies bacterianas encontradas en diversas muestras de apiario por el análisis de la configuración superficial de sus esporas y células vegetativas. Las esporas de *P. larvae* exhibieron una superficie lisa y altamente refráctil sin restos de esporangio visibles, con forma elipsoidal y de aproximadamente 0,6 μm de diámetro por 1,3 μm de largo en promedio (Figura 22 B), mientras que las células vegetativas presentaron forma de bacilo de longitud variable entre 0,5-0,6 μm de ancho X 2,5-5 μm de largo y con flagelos peritricos conformados en "haces gigantes" (en inglés *giant whips* o *flagellar bundles*) con una longitud equivalente a 8 o 10 veces el largo de la célula bacteriana (Figura 23), lo que se ajusta a las características que han sido descritas para la especie desde las primeras observaciones de White (White, 1907, 1920).

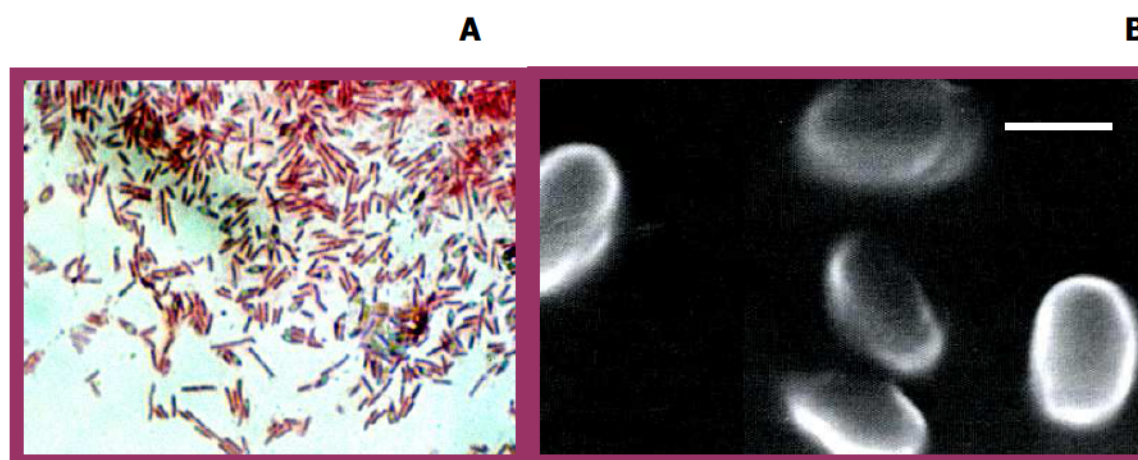


Figura 22: Esporas de *Paenibacillus larvae* cepa PL7 vistas al MO (A) y al MEB (B), respectivamente. Barra: 0,6 μm .



Figura 23: Células vegetativas de *P. larvae* cepa PL7 vistas por MEB mostrando los haces de flagelos característicos. Barra: 10 µm

Las esporas de *P. alvei* presentaron forma cilíndrica con extremos redondeados, con dimensiones de 0,8-0,9 µm de ancho X 1,8-2,5 µm de largo, ubicadas en posición central con respecto al esporangio (Figura 24 A), las mismas, mostraron un mayor tamaño comparadas con las de *P. larvae*. En las observaciones realizadas por MEB, las esporas de *P. alvei* presentaron estrías paralelas longitudinales en su superficie (Figura 24 B). Por otra parte, las células vegetativas fueron difíciles de remover en las preparaciones para MEB, razón por la cual se encontraron frecuentemente con una disposición de ordenamiento lado a lado (Figura 24 B).

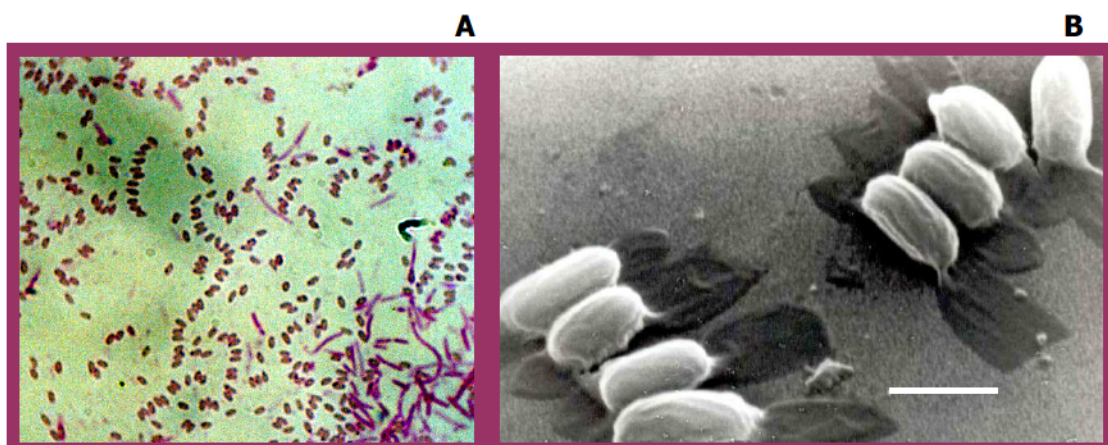


Figura 24: Esporas de *Paenibacillus alvei* cepa mv44 vistas al MO y al MEB respectivamente. Barra: 1,8 µm

Las formas vegetativas de *M. plutonius* se observaron como cocos lanceolados que aparecen aislados o en cadenas cortas de un tamaño promedio de 0,6 μm X 1 μm y, ocasionalmente, en cúmulos dentro del material larval afectado (Figura 25).

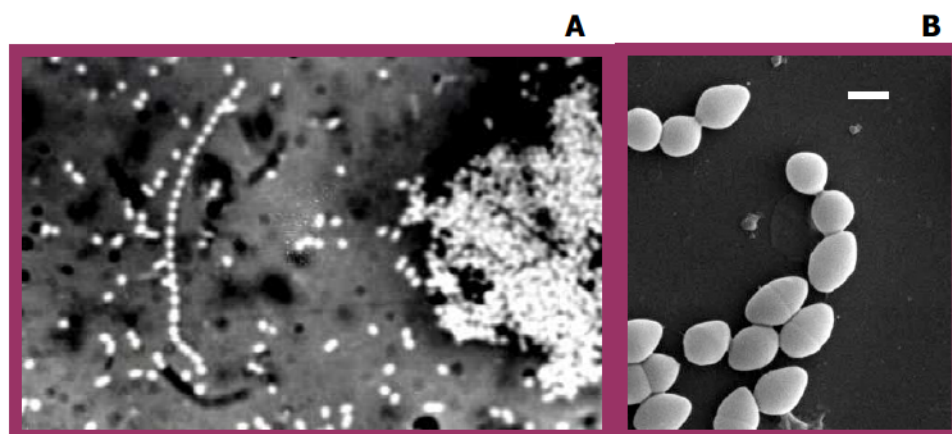


Figura 25: Morfología de *Melissococcus plutonius* de preparados directos de restos larvales por ME (A) y MEB (B), respectivamente. Barra: 1 μm

B. laterosporus presentó esporas ovales con un borde más acentuado formando una protuberancia en forma de C (Figura 26 A) de un tamaño de 0,9-1,3 μm X 1,5-1,9 μm . Estas esporas engrosaron el esporangio en posición centro-lateral semejante a una "canoa" y, observadas al MEB presentaron una configuración superficial característica con estrías ramificadas bien marcadas (Figura 26 B) que ha sido citada como una característica típica de esta especie (Bradley & Franklin, 1958; Bulla *et al.*, 1969; Gordon *et al.*, 1973).

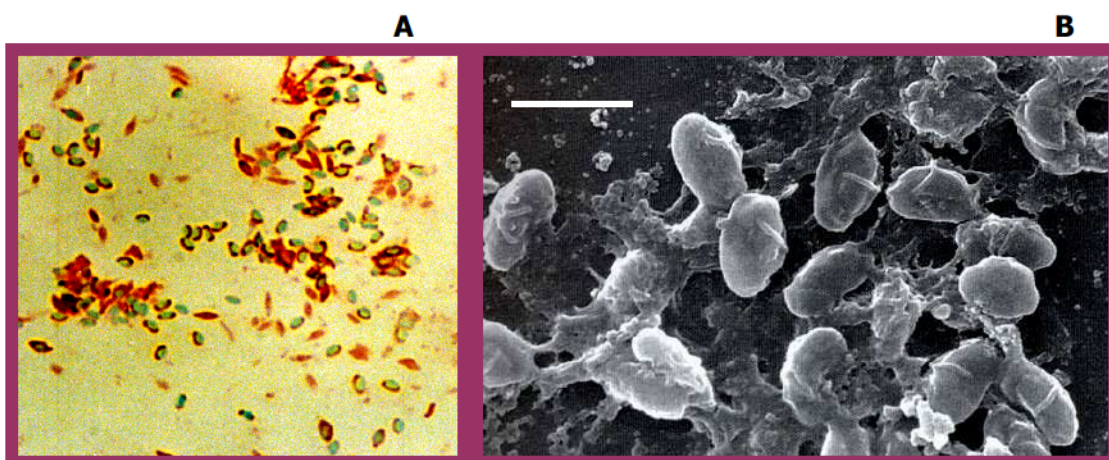


Figura 26: Esporas de *Brevibacillus laterosporus* cepa BLA170 y directamente de restos larvales afectados por LE, vistas al MO (A) y al MEB (B), respectivamente. Barra: 1,75 μm .

Paenibacillus apiarius presentó esporas rectangulares con paredes gruesas, que engrosaron el esporangio en posición central (Figura 27 A), de un tamaño de 0,8-1,1 μm de ancho X 1,5-2,0 μm de largo. Observadas al MEB las esporas mostraron forma rectangular y una cubierta aparentemente rígida (Figura 27 B).

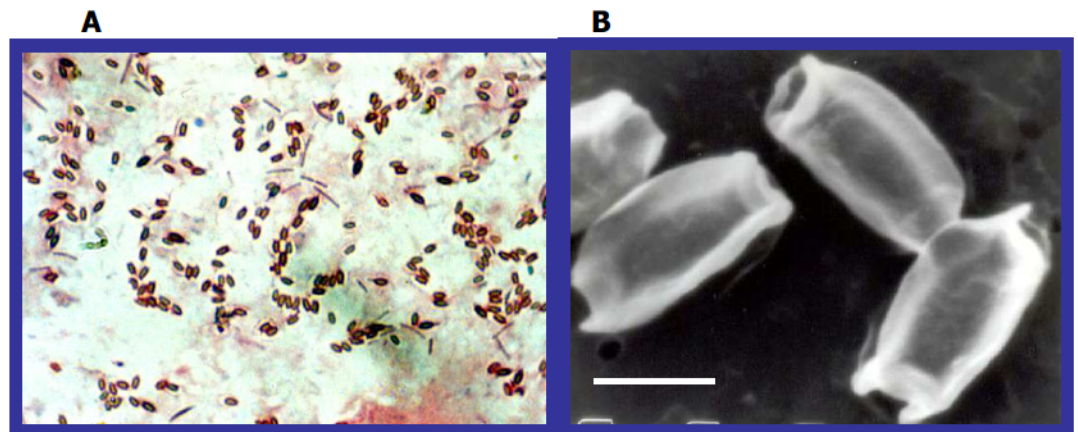


Figura 27: Esporas de *Paenibacillus apiarius* ATCC 29575 vistas al MO (A) y al MEB (B), respectivamente. Barra: 1,2 μm .

Las cepas de *Bacillus cereus* presentaron inclusiones lipídicas en sus células vegetativas; las esporas tenían forma oval, no engrosaron el esporangio y se dispusieron en posición central (Figura 28 A), midiendo 1,5-1 μm de ancho X 1,2- 2 μm de largo. Vistas al MEB mostraron la presencia de un exosporio característico con estrías ramificadas (Figura 28 B).

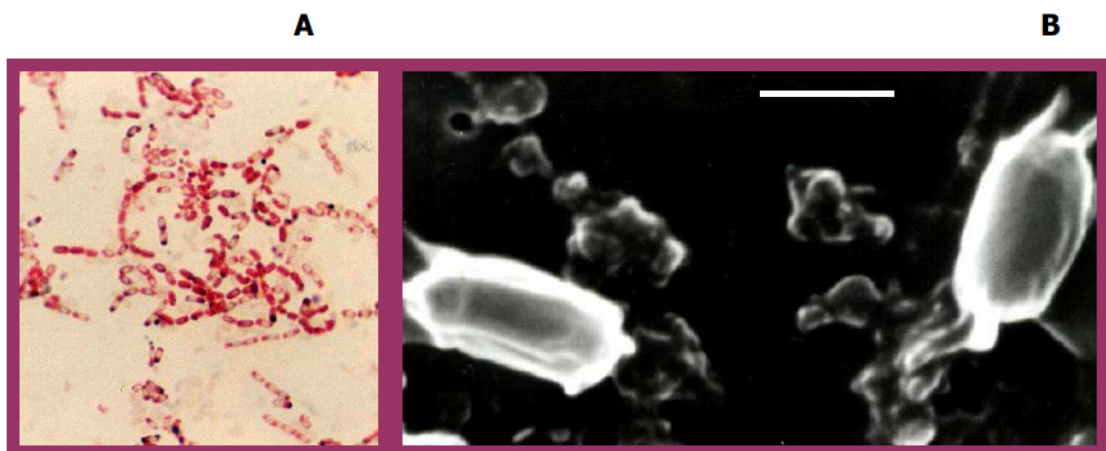


Figura 28: Esporas de *Bacillus cereus* cepa cm8 vistas al MO (A) y al MEB sobre membrana Nucleopore® (B), respectivamente. Barra: 1,0 μm .

Las cepas de *Bacillus megaterium* también presentaron inclusiones lipídicas en sus células vegetativas, mientras que sus esporas de forma elipsoidal y disposición central no engrosaron esporangio (Figura 29 A) y sus dimensiones fueron de 1-1,2 μm de ancho X 1.2-2 μm de largo. Vistas al MEB mostraron estrías longitudinales poco marcadas (Figura 29 B).

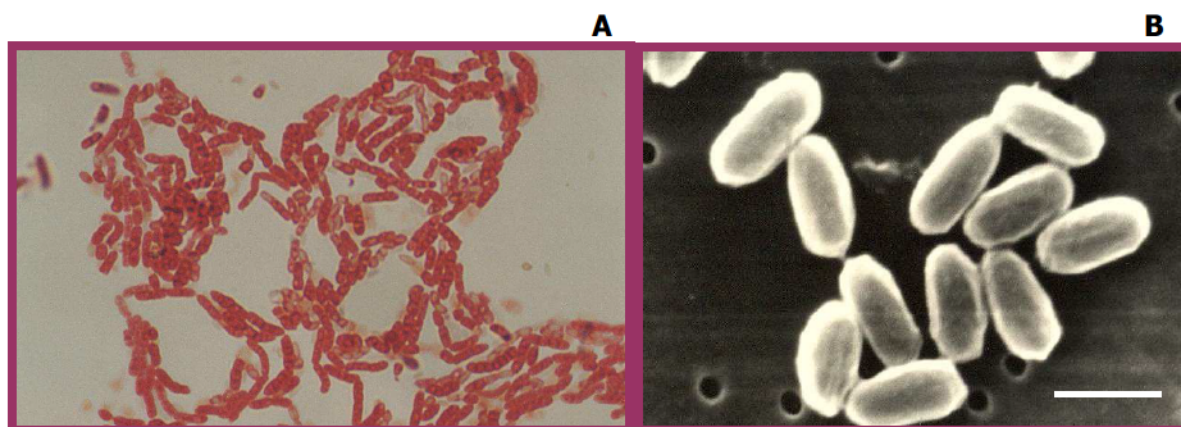


Figura 29: Esporas de *Bacillus megaterium* cepa m13 vistas al MO (A) y al MEB sobre membrana Nucleopore® (B), respectivamente. Barra: 2 μm .

Los aislamientos de *Bacillus subtilis* presentaron esporas cilíndricas con extremos redondeados ubicadas en posición central o centro-lateral con respecto al esporangio que no sufre deformaciones o sólo levemente (Figura 30 A). Las dimensiones de las esporas variaron entre 0,8-0,9 μm de ancho X 1,2-1,5 μm de largo (Figura 30 B).

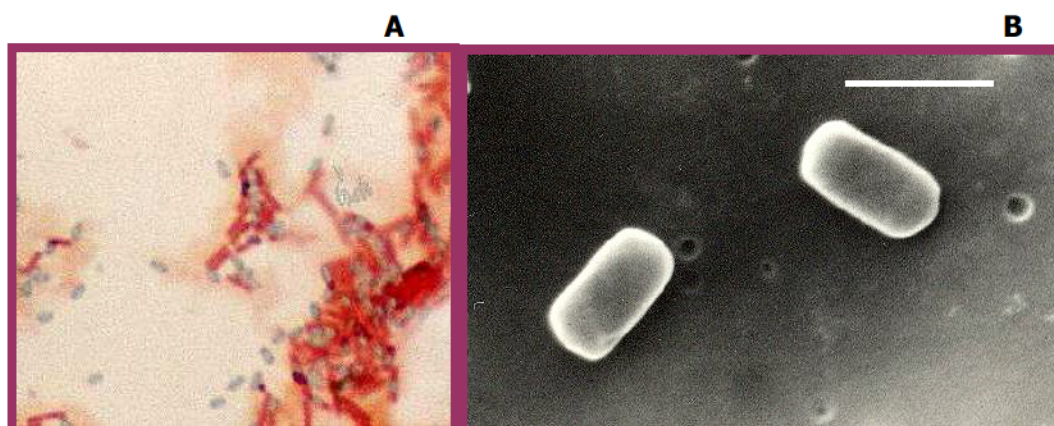


Figura 30: Esporas de *Bacillus subtilis* cepa m351 vistas al MO (A) y al MEB sobre membrana Nucleopore® (B), respectivamente. Barra: 1,5 μm .

Bacillus licheniformis presentó esporas elipsoidales o cilíndricas en posición central que no deformaron el esporangio vistas al MO (Figura 31 A). Al MEB (Figura 31 B) se visualizó una estría longitudinal poco profunda. Sus dimensiones variaron entre 0,6-0,9 μm de ancho X 1,1-1,8 μm de largo.

La configuración superficial de las esporas observada por MEB resultó coincidente con lo descrito por otros autores para cada una de las especies analizadas (Bradley & Franklin, 1958; Bulla *et al.*, 1969).

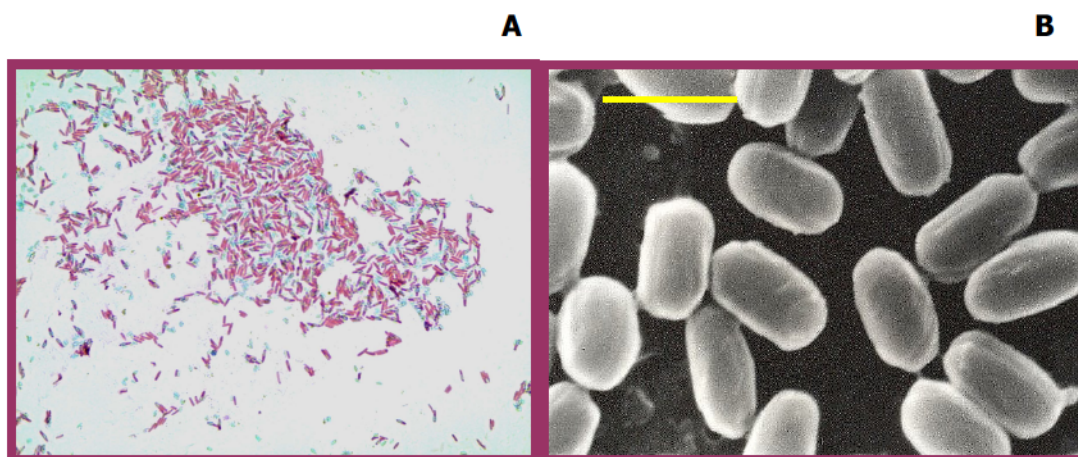


Figura 31: Esporas de *Bacillus licheniformis* cepa m39b vistas al MO (A) y al MEB sobre membrana Nucleopore® (B), respectivamente. Barra: 1 μm .

4.4. Análisis de la prevalencia de *P. larvae* en mieles de la Provincia de Buenos Aires.

Con respecto a los aislamientos de muestras de mieles provenientes de distintos partidos de la Provincia de Buenos Aires analizadas cosechadas durante 3 años consecutivos (1999-2000-2001), de las 394 muestras, 219 contenían esporas viables de *P. larvae* (55 %) dentro de un rango variable que osciló entre la detección de 1 u.f.c por placa de aislamiento (nivel 1) hasta cobertura total (nivel 5). Paralelamente, en 298 muestras (76%) se detectaron esporas viables de otras especies bacterianas como se observó en las placas de TSA preparadas para cada muestra en paralelo y, en algunos casos, en la misma placa de TSA se halló más de una especie. El agregado de la combinación de los antibióticos ac. nalidíxico y ac. pipemídico al medio MYPGP permitió obtener colonias de *P. larvae* e inhibir mayormente el desarrollo de las bacterias esporuladas presentes en la miel.

Cada colonia de *P. larvae* obtenida en una placa de medio de cultivo equivale a 3 esporas germinativas/ml de miel que corresponde aproximadamente a 1,4 g estimando la densidad promedio de la miel. Estos valores representan un nivel mínimo de detección de la técnica empleada en los medios semi-selectivos (Apartado 3.2.3). El número más alto de colonias de *P. larvae* que se puede contar en una placa de 9 cm de diámetro es de 1.000, empleando una cámara cuenta colonias tipo Quebec. Habida cuenta de que solamente germinan en el medio MYPGP entre el 6 y el 7 % de las esporas totales de *P. larvae* (Dingman & Stahly, 1983), tomando el valor más bajo del 6%, un conteo de 1 u.f.c/placa y un conteo de 1000 u.f.c/placa equivaldrían a 50 esporas/g y 50.000 esporas/g, respectivamente (Apartado 3.2.3).

La frecuencia de esporas de *P. larvae* fue del 55 % ($n=219$) en promedio, siendo de 68 % para 1999 ($n = 160$); de 47 % para 2000 ($n = 102$); y de 46 % para 2001 ($n = 132$). Los valores promedio de contaminación de esporas en miel para los 3 años del estudio mostraron una reducción constante (Tabla 2), probablemente debido a un mejoramiento en las prácticas de manejo por parte de los apicultores de la Provincia, a pesar del alto número de esporas encontrados en algunas mieles (Figura 32 y Anexo II).

Tabla 2: Comparación de los niveles de infección durante los 3 años de muestreo

Niveles de infección	Número de muestras por año			TOTAL	P
	1999	2000	2001		
Nivel 1	51	54	71	176	0,138
Nivel 2	29	6	35	70	< 0,0005
Nivel 3	14	8	14	36	0,368
Nivel 4	21	11	9	41	0,049
Nivel 5	30	21	2	53	< 0,0005
Nivel 6	15	2	1	18	< 0,0005
TOTALES	160	102	132	394	

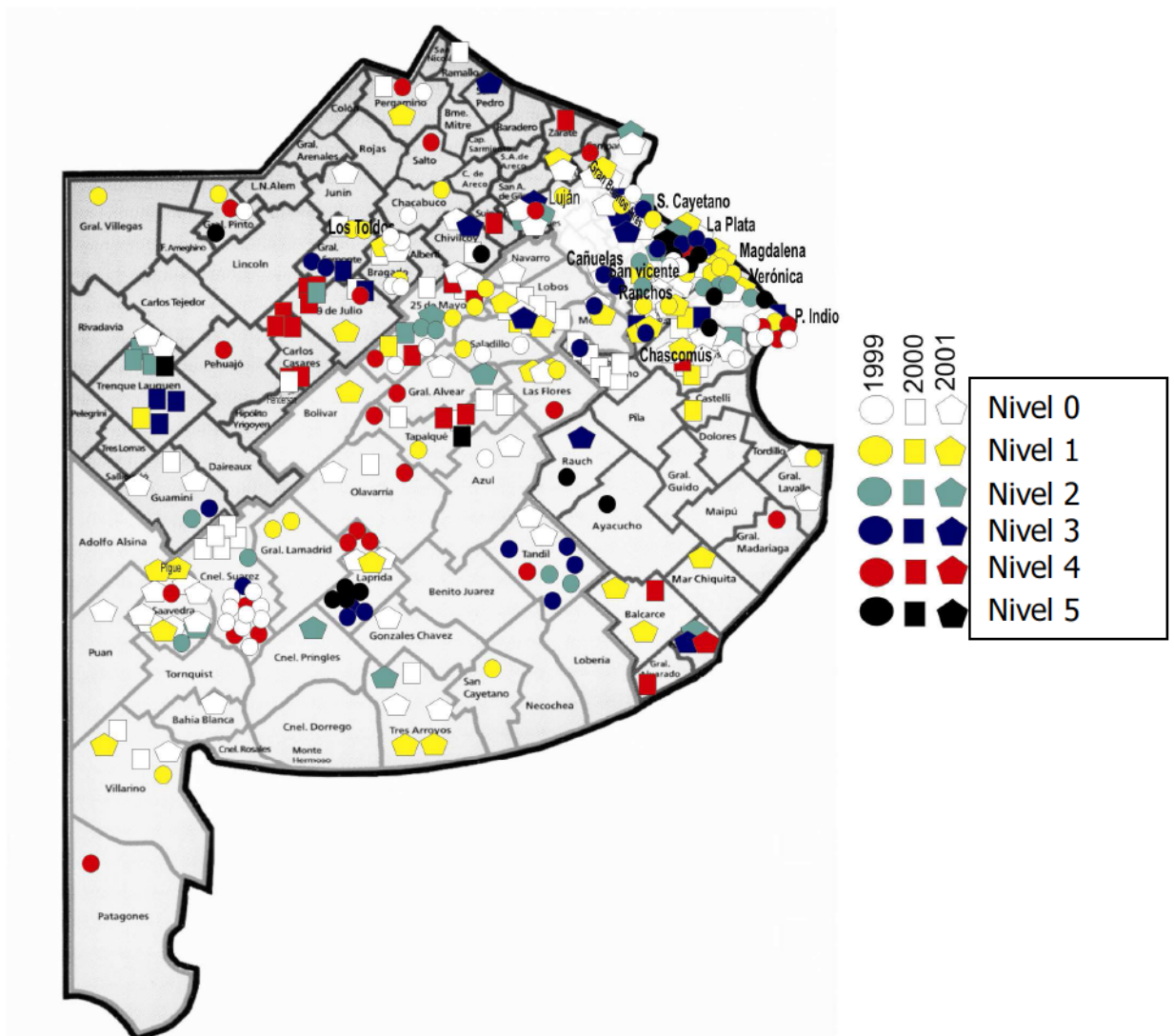


Figura 32: Incidencia de esporas de *P. larvae* en mieles durante los años 1999 (círculos), 2000 (cuadrados) y 2001 (pentágonos) en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Para cada uno de los 3 años los colores representan: Blanco: Nivel 0 no se detectaron esporas de *P. larvae*; Amarillo: Nivel 1: entre 1 y 20 ufc por placa de aislamiento (equivalentes a entre 50 y 1.000 esporas/g de miel); Verde: Nivel 2: entre 21 y 50 ufc por placa (equivalentes a 1.050 y 2.500 esporas/g de miel); Violeta: Nivel 3: entre 51 y 199 ufc por placa (equivalentes a 2.550 y 9.950 esporas/g de miel); Rojo: Nivel 4: entre 200 y 999 ufc por placa (equivalentes a 10.000 y 49.950 esporas/g de miel) y Negro: Nivel 5: 1.000 o más ufc por placa (equivalentes a 50.000 o más esporas/g de miel).

Dentro de las 219 muestras positivas la concentración de esporas de *P. larvae* varió entre la detección de una colonia aislada (Nivel 1) hasta una cobertura completa de las placas de aislamiento (Nivel 5). Hornitzky y Clark (1991) correlacionaron el número de ufc obtenidas en cultivo con los niveles de infección de loque americana en las colmenas del

apiario de donde provenía esa miel, encontrando que el rango 1 (equivalente a nuestro nivel 1) daba una probabilidad del 60% de observar síntomas clínicos en las colmenas del apiario; el rango 2 (equivalente a nuestro nivel 2) daba el 80% de probabilidad de encontrar síntomas en ese apiario y el rango 3 (equivalente a nuestros niveles 3, 4 y 5) aumentaba esta probabilidad a un nivel del 100%.

Se propone al menos 3 razones posibles por las cuales una prueba de aislamiento de esporas *in vitro* a partir de miel no se correlaciona con lo observado a campo (positivo *in vitro* vs. ausencia de síntomas clínicos de la enfermedad) como: a) Un pillaje reciente de miel contaminada con esporas proveniente de una colmena afectada y que se almacenó en la colmena sana; b) una alta capacidad de limpieza de la colmena que elimina rápidamente las larvas afectadas y en el proceso las esporas pasan a la miel o c) un tratamiento reciente con antibióticos que eliminan los síntomas pero al no afectar a las esporas estas pasan a la miel.

A la inversa, nunca se han encontrado falsos negativos, si una colmena exhibe síntomas clínicos siempre se encuentran esporas viables en miel. No obstante, en algunas ocasiones existe una imposibilidad de detectar colonias de *P. larvae* por sobredesarrollo de otras bacterias esporuladas presentes en la muestra de miel, razón por la cual esa miel no debería registrarse como negativa. Con respecto al aislamiento de otras especies esporuladas, las observaciones en las placas duplicadas conteniendo TSA, si bien en algunas placas se aisló más de una especie, se observó que las especies de mayor prevalencia en mieles de la Provincia de Buenos Aires fueron *Paenibacillus alvei* (40%), *Bacillus cereus sensu stricto* (28%) y *Bacillus megaterium* (14%). Paralelamente, y, en menor proporción (6% en total) se halló a *Brevibacillus laterosporus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis*, *Paenibacillus polymyxa*, *Lysinibacillus sphaericus* y *Bacillus pumilus*. Con respecto a la eficiencia de los medios semi-selectivos MYPGP A y MYPGP B, sólo 14 placas (4%) mostraron sobrecrecimiento de otras especies esporuladas. En estas, se identificó a *Lysinibacillus sphaericus* y *Bacillus circulans* que pueden desarrollar en presencia de la combinación de antibióticos empleada y también se aislaron algunas cepas resistentes de *B. laterosporus*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* y *P. polymyxa*, respectivamente. De todas formas se considera que la eficiencia de los medios semi-selectivos fue alta, ya que de un total de 394 muestras de miel, se obtuvieron 219 aislamientos de *P. larvae* y 161 muestras arrojaron resultados negativos sin contaminación

bacteriana a pesar de que había presencia de bacterias esporuladas en las muestras como se determinó en paralelo en las placas de TSA. En ninguna de las muestras analizadas se hallaron esporas del grupo *P. larvae* "ex *pulvificiens*" o del fenotipo de colonias pigmentadas concluyendo que ninguno de estos dos grupos de cepas está presente en la Provincia de Buenos Aires. Este resultado es coincidente con el resto de las muestras de larvas infectadas o mieles analizadas provenientes de otras regiones de la Argentina.

La alta prevalencia de *P. alvei* en mieles de la Prov. de Bs. As. (40%) coincide con resultados obtenidos en un estudio previo (Alippi, 1995) y con lo observado por otros investigadores analizando mieles de Australia (Djordjevic *et al.*, 2000; Hornitzky & Clark, 1991). Según Snowdon y Cliver (1996), los conteos normales de bacterias esporuladas aeróbicas oscilan entre 0 y 200 ufc/g de miel habiendo grandes variaciones en cuanto al número de especies y cantidad de acuerdo con la muestra de miel. Entre las de mayor prevalencia procedentes de plantas procesadoras de miel se han citado *Bacillus cereus*, *B. coagulans*, *B. megaterium* y *Paenibacillus alvei*, y distintas especies de *Clostridium* (Kokubo *et al.*, 1984).

En un estudio de mieles comerciales en Argentina, se halló que un 23% contenía especies de *Bacillus*, con mayor prevalencia de *B. cereus* (26%) y *B. pumilus* (13%), respectivamente (Iurlina & Fritz, 2005), datos coincidentes con los de Tysset y colaboradores (1970) que citan a *B. cereus* y *B. pumilus* como las especies más prevalentes. Por otra parte, *B. cereus* ha sido encontrado en el 48% de las mieles analizadas por Piana y colaboradores (1991).

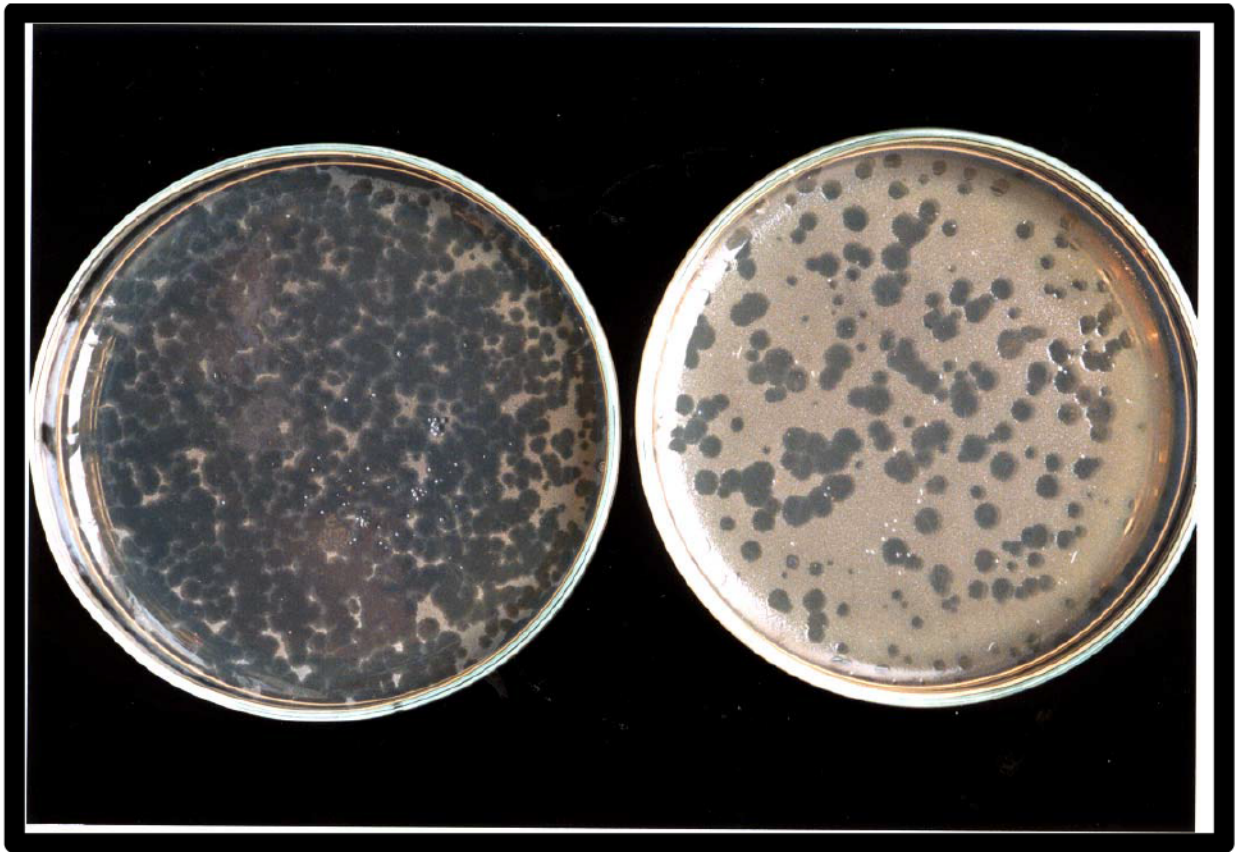
Muchos microorganismos aparecen asociados con componentes específicos del ecosistema, por ejemplo, la mayoría de las bacterias esporuladas encontradas en los ambientes vinculados con las colmenas (abejas, polen, flores, superficies vegetales, miel, suelo, etc.) aparecen frecuentemente entre los aislamientos de la miel, donde el género *Bacillus* es predominante ya que se ha aislado de muy variados nichos ecológicos. Independientemente del origen geográfico y/o floral de las mieles analizadas, las especies esporuladas aerobias encontradas con mayor frecuencia han sido *P. larvae*, *P. alvei*, *B. cereus*, *B. megaterium* y *B. pumilus*. Mientras que *P. larvae* y *P. alvei* están asociados con enfermedades de las abejas, *B. cereus* y *B. megaterium* son especies ubicuas frecuentes en todo tipo de suelos, sus esporas sobreviven la distribución en polvos y aerosoles siendo vehiculizadas desde estos lugares a otros hábitats como las superficies florales.

Paralelamente, *B. megaterium* junto con *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. circulans* y *P. alvei* son las especies predominantes en los tractos digestivos de larvas, abejas adultas y heces (Gilliam, 1997).

Nota: Los resultados de este capítulo se resumen en las siguientes publicaciones:

- **Alippi, A.M. (2004).** Capítulo 48: Microbiología de la miel, pp. 357-364. En: Temas de Zoonosis II. (Eds. Cachione R., Durlach, R. y Larghi, O.). Asociación Argentina de Zoonosis, Buenos Aires, Argentina, 440 pp.
- **Alippi A.M., Reynaldi, F.J., López, A.C., De Giusti, M.R. & Aguilar O.M. (2004).** Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae larvae* and incidence of American Foulbrood in Argentinean honeys from Buenos Aires Province. *Journal of Apicultural Research* 43: 135-143. INGLATERRA. ISSN 0021-8839.
- **De Graaf, D.C. Alippi, A.M., Brown, M., Evans, J.D.; Feldlaufer, M., Gregorc, A., Hornitzky, M., Pernal, S.F., Schuch, D.M.T., Titèra, D., Tomkies, V. and Ritter, W. (2006).** Under the microscope. Diagnosis of American foulbrood disease in honeybees: A synthesis and proposed analytical protocols. *Letters in Applied Microbiology*, 43: 583-590. UK. ISSN 0266-8254.
- **de Graaf D.C., Alippi A.M., Antúnez K., Aronstein K.A., Budge G., De Koker D., De Smet L., Dingman D.W., Evans J.D., Foster L.J., Fünfhaus A., Garcia-Gonzalez E., Gregorc A., Human H., Murray K.D., Nguyen B.K., Poppinga L., Spivak M., Van Engelsdorp D., Wilkins S. & Genersch, E. (2013).** Review Article: Standard methods for American foulbrood research. *Journal of Apicultural Research* 52 (1). DOI 10.3896/IBRA.1.52.1.11. ISSN 0021-8839.

Capítulo III



**Tipificación mediante
el bacteriófago PPl1c**

Tipificación mediante el bacteriófago pPPL1c

1. Introducción

Los bacteriófagos o “fagos” son virus que infectan a las bacterias a las que utilizan como reactor para multiplicarse. Los bacteriófagos fueron descubiertos de forma independiente por los microbiólogos Frederick W. Twort (1915) y Félix d’Hérelle (1917). Twort y D’Hérelle fueron los primeros en reconocer virus específicos para las bacterias, por lo que D’Hérelle acuñó el término bacteriófago que significa “devorador de bacterias”. Posteriormente, Adams (1959) los definió como “microbios autónomos análogos a los virus que afectan a los animales y a las plantas y que son parásitos obligados de las bacterias”.

Se han descrito cerca de 5.500 bacteriófagos que infectan a una gran diversidad de bacterias y, taxonómicamente se los agrupó en el orden *Caudovirales* (fagos con cola) (Ackermann, 2007). Los bacteriófagos constituyen el sistema biológico más simple y abundante de la naturaleza. Desde un punto de vista estrictamente numérico, se estima que su población global es de aproximadamente 10^{31} partículas fágicas sobre la tierra, coexistiendo en relación 10:1 con las bacterias a las que infectan. Se han descubierto fagos que infectan a todos los procariontes descritos hasta el momento adaptándose a todos los nichos ecológicos de sus hospedadores bacterianos. Tal magnitud de fagos ejerce un importante papel ecológico, puesto que generan variabilidad en los genomas, mediante transferencia genética, e intervienen de esta forma en la evolución de sus hospedadores, afectando, incluso, los niveles de materia orgánica en la biosfera (Brüssow y Hendrix, 2002; Chibiani-Chennoufi *et al.*, 2004).

A partir de la década del '30, se utilizaron los fagos como modelo para investigar muchos aspectos de la Virología general, como la estructura de los viriones, la morfogénesis, la genética y la replicación. Adicionalmente, los fagos también han sido tomados como modelo para el estudio de la genética bacteriana y los mecanismos de control de la expresión génica, debido a que los huéspedes bacterianos son fácilmente cultivables y manejables en el laboratorio.

Los fagos han tenido un rol protagónico en el desarrollo de la biología molecular, especialmente por proveer una herramienta para la transferencia horizontal de genes de interés entre bacterias y como vectores de ADN clonado. En la mayoría de sus propiedades básicas, tienen características similares a las de otros virus, conteniendo ADN monocatenario (como por

ejemplo los fagos ϕ X174 y M13); ADN dicatenario (como los fagos T3, T4 y λ), ARN de doble cadena segmentados (como el fago θ 6) y ARN de cadena sencilla (como el fago MS2) dentro de su cubierta proteica.

1.1. Morfología de los viriones

Las partículas infecciosas, al igual que en otros virus, se llaman viriones y básicamente consisten en un segmento de material genético rodeado por una envoltura proteica que lo protege del ambiente y, en algunos casos, le sirve como vehículo de transmisión de una célula hospedadora a otra. Los viriones tienen tamaños que oscilan entre 20 y 200 nm, por lo que para realizar análisis morfológicos se tiene que recurrir a la observación mediante el microscopio electrónico. Los fagos presentan diferentes morfologías (Figura 33) y poseen distintas formas de llevar a cabo el proceso infeccioso.

1.2. Ciclos de multiplicación de los bacteriófagos

Los bacteriófagos pueden poseer dos tipos de ciclo de vida diferentes, que a su vez pueden intercambiarse: a) Lítico o virulento y b) Lisogénico o atemperado. Los fagos líticos o virulentos son fagos que provocan la lisis de las células hospedadoras, liberando una nueva progenie fágica en un proceso conocido como ciclo lítico. Estos fagos sólo pueden multiplicarse en bacterias matando a la célula por lisis al término del ciclo de vida bacteriana. Durante la fase de eclipse las partículas de fago no infeccioso se pueden encontrar ya sea en el interior o en el exterior de la célula bacteriana. Cuando el ácido nucleico del fago penetra a la célula bacteriana, se apodera de la maquinaria biosintética del huésped para elaborar mARNs y proteínas fago-específicas. Existe una expresión ordenada de la síntesis macromolecular dirigida por el fago, tal como se observa en las infecciones por virus animales. Los mARNs tempranos codifican para las proteínas tempranas, las cuales intervienen en la síntesis de ADN del fago y para inhibir la biosíntesis de ADN, ARN y proteínas del huésped. En algunos casos las proteínas tempranas literalmente degradan el cromosoma bacteriano. Posteriormente, los mARNs codifican para las proteínas tardías que son las proteínas estructurales que conforman al fago y las responsables de la lisis de la célula bacteriana. Durante la fase de acumulación intracelular, el ácido nucleico y las proteínas estructurales que los constituyen, se ensamblan y las partículas infecciosas se acumulan dentro de la célula. Como consecuencia, se produce una lisis bacteriana y los fagos intracelulares se liberan al medio, el número de partículas liberadas por

bacteria infectada puede llegar a 1.000.

Los fagos lisogénicos o temperados son aquellos que pueden entrar en un estado quiescente en la célula. En este estado quiescente la mayoría de los genes del fago no se transcriben; el genoma del fago existe en un estado reprimido denominado "profago" porque no es un fago pero posee el potencial para producir fagos. En la mayoría de los casos el ADN del fago realmente se integra en el cromosoma del huésped y se replica junto con el cromosoma bacteriano y se transmite a las células hijas. La célula que alberga un profago no se ve negativamente afectada por la presencia del mismo y el estado lisogénico puede persistir indefinidamente. A la célula que alberga un profago se le conoce como lisógena o lisogénica. En cualquier momento en que la bacteria lisogénica quede expuesta a condiciones adversas, el estado lisogénico puede ser terminado y el profago puede comenzar un ciclo lítico que conducirá a la lisis celular. Este proceso se conoce como inducción.

1.2.1. Ciclo lítico

El primer paso en el proceso de infección es la **adsorción del fago** a la célula bacteriana **(a)**. Este paso es reversible y está mediado por las fibras de la cola, o por alguna estructura análoga, en aquellos fagos que carecen de cola, para unirse a receptores específicos en la célula bacteriana. La adsorción del virión depende de la existencia de receptores específicos en la bacteria los cuales pueden estar integrados a la pared celular o no dependiendo del tipo de bacteria. En el primer caso son somáticos y, en el segundo se adsorben a nivel flagelar o en los "pili" bacterianos (Bradley, 1967). El segundo evento se denomina **unión irreversible o inyección del genoma fágico (b)** La inyección es el proceso mediante el cual el ADN se transfiere desde la cabeza del fago hasta el interior del citoplasma bacteriano a través de la cola hueca. La partícula fágica vacía, permanecerá en el exterior, a diferencia de los virus animales donde las partículas virales se introducen en la célula. Poco después de la inyección del ADN viral se detiene la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas del hospedador y comienza a degradarse su genoma. La maquinaria metabólica del hospedador se pone al servicio del virus, sintetizando sus ácidos nucleicos y proteínas. Posteriormente se realiza el proceso de **(c) transcripción** en función del tiempo que transcurre entre la infección y el momento en que se detecta el ARN correspondiente. Por último se produce la **(d) replicación del ADN** que se considera el evento que marca la transición de las funciones virales tempranas a las tardías. De hecho, los ARNm tardíos se suelen definir como aquellos que se sintetizan tras la replicación,

realizándose la transcripción a partir de las copias del genoma sintetizadas *de novo*. La replicación del ADN vírico da lugar a una única molécula lineal de *dsADN*, denominada concatémero, que contiene varias copias del genoma fágico una a continuación de la otra. Posteriormente se produce la **(e) Biosíntesis de las proteínas estructurales** donde el ARNm tardío dirige la síntesis de tres tipos diferentes de proteínas; proteínas estructurales, que son las piezas que van a componer la cabeza y la cola; proteínas que participan en el ensamblaje del virión, sin pasar a formar parte de su estructura. Por ejemplo, las denominadas proteínas de andamio, que participan en el ensamblaje de las cápsides y son eliminadas una vez concluida su construcción; y además de las proteínas estructurales el ARNm tardío también codifica las proteínas responsables de la lisis celular y la liberación de los fagos. Por último el ciclo lítico termina con la **Lisis celular y liberación de los viriones (f)**. Generalmente, la lisis celular requiere la acción de dos enzimas codificadas por el genoma fágico: la lisina, que actúa degradando el péptidoglucano de la pared celular de forma similar a la lisozima, y la holina, que provoca la desorganización de la membrana celular, generando poros que permiten el acceso de la lisina a la pared celular (Brüssow & Desiere, 2001).

1.2.2. Ciclo lisogénico.

Tras la adsorción y la penetración del ADN, procesos que no presentan diferencias respecto a los fagos virulentos, los fagos atemperados son capaces de establecer una relación estable con el hospedador, el ADN viral se integra como un profago en el genoma bacteriano, pudiendo replicarse junto a éste durante numerosas generaciones. Las células lisogenizadas presentan inmunidad frente a la infección, es decir, no pueden ser reinfectadas por el mismo virus. Aparte de la inmunidad y de algunos casos concretos de conversión lisogénica (Cluzel *et al.*, 1987), en general, exhiben un fenotipo normal. En el caso de los fagos que afectan bacterias lácticas de los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus*, la mayoría de las cepas son lisogénicas (Ventura *et al.*, 2006). En determinadas condiciones, el profago puede comenzar un ciclo lítico que, como tal, conduce a la destrucción de la célula hospedadora liberándose nuevos viriones. Este proceso conocido como inducción puede producirse espontáneamente o provocarse con luz UV o con mutágenos como la mitomicina C. Los genes implicados en el establecimiento y mantenimiento de la lisogenia están agrupados en el llamado módulo de lisogenia. Estos módulos tienen una organización genética muy similar, no sólo entre los

bacteriófagos que infectan bacterias lácticas, sino entre todos los fagos Siphoviridae que infectan bacterias Gram positivas de bajo contenido en G+C (Lucchini et al., 1999).

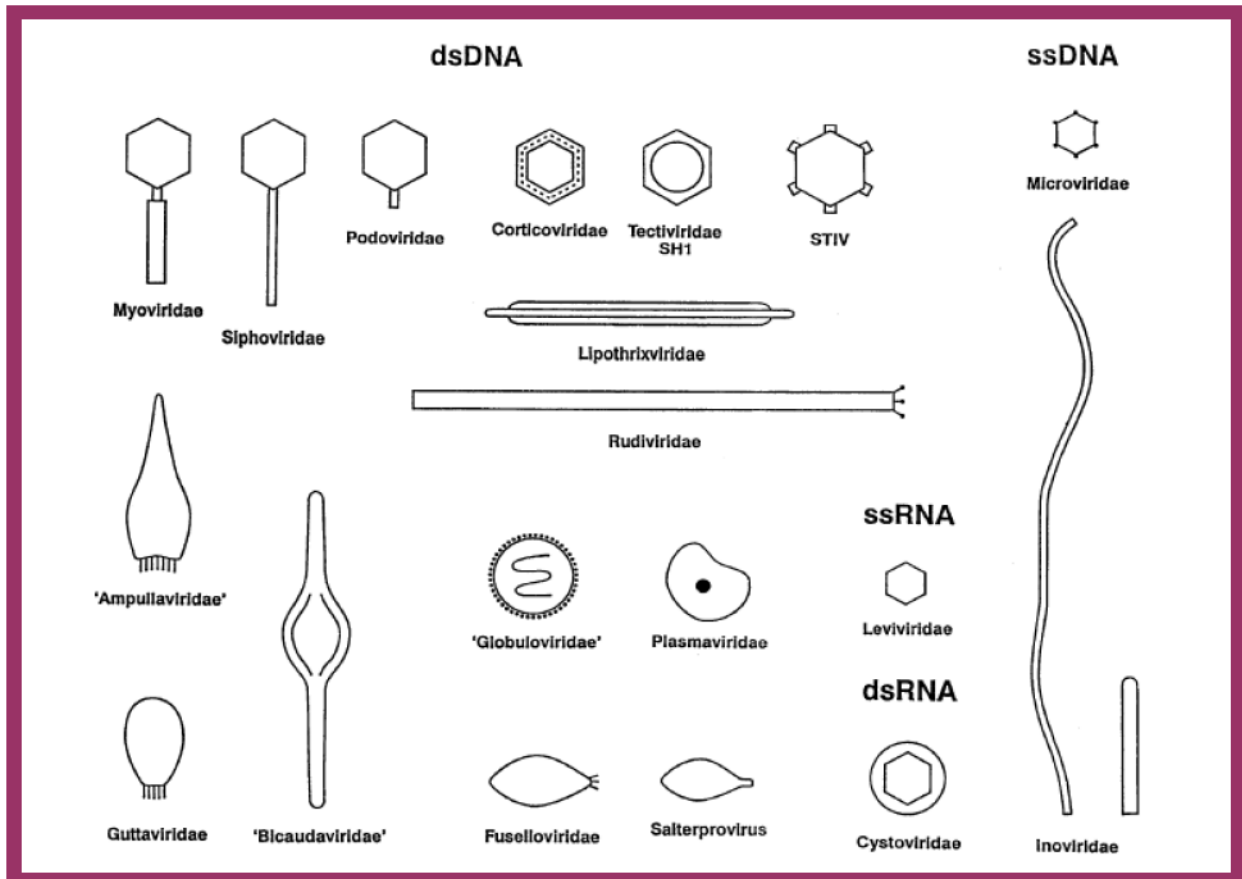


Figura 33: Tipos morfológicos de los bacteriófagos. Tomado de Ackermann, 2007.

Se conoce como interruptor genético al mecanismo que determina que, tras la infección de un fago atemperado, se desencadene el ciclo lítico o el ciclo lisogénico. En la mayoría de los casos se basa en dos proteínas codificadas por el genoma viral y que actúan como reguladores de la transcripción, como por ejemplo CI y CRO, ampliamente estudiadas en el fago lambda (λ) que infecta a *Escherichia coli*. CI reprime la expresión de los genes líticos provocando el establecimiento del ciclo lisogénico y es responsable de la inmunidad, ya que también inhibe la síntesis de ARN de otros viriones que intenten infectar la misma célula. Por el contrario, CRO inhibe la expresión de los genes lisogénicos tempranos, incluido CI y activa la expresión de los genes líticos. Debido a que el represor es capaz de reprimir la transcripción de CRO, existe una competición entre ambas proteínas, cuyo resultado determina cuál de los dos ciclos, lítico o lisogénico, se lleva a cabo. Si el vencedor de la competición es el represor CI, el ADN del fago,

tras circularizarse, se integra en el cromosoma de la célula bacteriana por recombinación sitio-específica entre el sitio de unión del fago, llamado attP, y el sitio de unión del genoma bacteriano, llamado attB. Ambos sitios comparten una secuencia común o *core*, de entre 9 y 40 pb, a través de la cual se produce la sinapsis y el intercambio de las hebras de ADN siguiendo el modelo de Campbell (1992). Este proceso está catalizado por la integrasa, un enzima codificado por un gen fágico denominado *int*. Es bastante común que la integración del ADN fágico se realice dentro de genes de tARNs del hospedador, no obstante, no suele afectar la eficacia biológica de los lisógenos ya que el *core* (secuencia común a attP y attB) solapa con el extremo 3' del gen, de forma que tras la integración la secuencia original se restaura, obteniéndose un gen híbrido pero funcional (Alvarez *et al.*, 1998; Dupont *et al.*, 1995).

La integración da lugar a la formación de dos sitios de unión híbridos en las intersecciones de los genomas fágico y bacteriano. Estos sitios de unión, llamados attL y attR, comparten el mismo *core* que attP y attB y van a permitir que la integración sea un proceso reversible, de tal forma que cuando se produce la inducción, tiene lugar una recombinación sitio-específica entre ellos, escindiéndose el profago del genoma bacteriano e iniciando así el ciclo lítico. En el fago λ , un gen adyacente a *int*, el gen *xis*, codifica una escisionasa que, unida a la integrasa, es la que cataliza la escisión del profago (Alvarez *et al.*, 1998).

1.3. Tipificación mediante bacteriófagos

Todos los bacteriófagos, en mayor o menor medida, son específicos en su rango de hospedantes. Generalmente, lo son para una especie en particular y/o para especies estrechamente relacionadas; pero en otros casos la especificidad es tan alta que pueden emplearse para diferenciar cepas bacterianas dentro de una misma especie, esto se denomina tipificación ("*phage typing*"). Esta alta especificidad de algunos fagos puede emplearse en el laboratorio para diferenciar bacterias patógenas de especies no patógenas estrechamente relacionadas. Esta sensibilidad puede incrementarse mediante el empleo de un fago reportero, que es un fago modificado por ingeniería genética que lleva un gen que codifique para una enzima fácil de detectar como es el caso de la luciferasa (Dale & Park, 2010).

1.4. Bacteriófagos de los géneros *Paenibacillus* y *Bacillus*

Todos los bacteriófagos que afectan al género *Paenibacillus* conocidos hasta la fecha

pertenecen al orden de los Caudovirales, los cuales poseen una cápside o cabeza de composición proteica, con simetría icosaédrica que está unida, a través de un cuello, a una cola cuya longitud y capacidad de contracción sirven para diferenciar tres familias: Myoviridae, con colas contráctiles compuestas por una vaina y un tubo central, Siphoviridae con colas largas, no contráctiles y Podoviridae con colas cortas (Figura 33) (Ackermann, 2006). En el extremo de la cola se encuentran frecuentemente estructuras de fijación a la célula hospedadora como placas basales, espinas o fibras. Sin embargo, su tamaño se encuentra cerca del límite de resolución del microscopio electrónico dificultando su estudio. Los fagos pertenecientes a la familia Podoviridae son los fagos más pequeños que han sido aislados capaces de infectar miembros del género *Bacillus* siendo también los más pequeños que contienen un ADN de doble cadena. Los bacteriófagos que infectan a las especies de *Bacillus* y *Paenibacillus* son comunes en el suelo y muchas cepas pertenecientes a estos géneros son naturalmente lisogénicas para uno o más profagos. Con muy pocas excepciones, los fagos que afectan a este grupo poseen rangos de especificidad muy estrechos y los más estudiados han sido los asociados con *B. subtilis*, como el fago lítico $\phi 29$ perteneciente a la familia Podoviridae. La infección comienza con la adsorción del fago a la bacteria mediante el reconocimiento de receptores presentes en la pared bacteriana y a continuación se produce la inyección del genoma del fago. El genoma de $\phi 29$ consiste en un ADN lineal de doble cadena de 19.285 pb con una proteína terminal unida covalentemente a los extremos 5'. La direccionalidad de la inyección es siempre desde el extremo derecho al extremo izquierdo y el proceso tiene lugar en dos etapas (González-Huici *et al.*, 2004; 2006). En la primera etapa se produce la inyección de aproximadamente un 65% del genoma del fago mediada muy probablemente por la presión generada en el interior de la cápside, en la segunda etapa se produce la inyección del resto del genoma con la ayuda de proteínas del fago codificadas por genes del extremo derecho del ADN. En el interior de la bacteria se llevan a cabo los procesos de replicación y transcripción del ADN.

La replicación se lleva a cabo por un mecanismo denominado *replicación mediada por proteína* en el que la proteína terminal unida a los extremos actúa como cebador en el inicio de la replicación. La transcripción del ADN del fago tiene lugar en una etapa temprana y una tardía, denominadas así en función del momento en que se produce durante el ciclo infectivo. La transcripción tardía da lugar, entre otras, a las proteínas responsables de la lisis de la célula infectada. Así, su activación provoca la liberación al medio de partículas infectivas de $\phi 29$ capaces de iniciar un nuevo ciclo de infección. Cuando el $\phi 29$ infecta células que se encuentran en las etapas iniciales del proceso de esporulación no provoca la lisis de la bacteria, sino que el

genoma del fago permanece inactivo y es atrapado en el interior de la pre-espora lo que genera una estrategia de infección alternativa (Sonenshein, 1970). Una vez que las condiciones ambientales son favorables de nuevo para el desarrollo de la bacteria, la espora germina y es entonces cuando el fago inicia su ciclo lítico. Si bien el $\phi 29$ es considerado un virus lítico, también desarrolla la estrategia de infección alternativa (Moreno, 1979). Esta estrategia de infección alternativa requiere por un lado la supresión del desarrollo del ciclo lítico del fago y por otro lado un mecanismo que se encargue de la segregación del genoma del fago al interior de la pre-espora. Kawamura e Ito (1974) describieron que tanto la transcripción como la replicación de $\phi 29$ están reprimidas cuando el fago infecta células que están iniciando la esporulación.

Dentro del género *Bacillus*, se han citado otros bacteriófagos capaces de mediar una transducción generalizada en diversas especies de *Bacillus* incluyendo *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis* (Halgasova *et al.*, 2010; Vary *et al.*, 1982). La transducción ofrece una ventaja inmediata sobre la transformación en que es aplicable para un mayor número de cepas de este género bacteriano y géneros relacionados. Adicionalmente, algunos fagos pueden transducir fragmentos de ADN mucho más grandes que los que se intercambian por la vía de la transformación lo que facilita el "linking" de marcadores distantes.

1.4.1. Bacteriófagos de *Paenibacillus larvae*

Se han aislado y caracterizado algunos bacteriófagos atemperados de distintas cepas de *P. larvae*: PBL1, PBL0.5, PBL2 y PBL3 (Bakhiet & Stahly, 1988, Carpana, 1991; Dingman *et al.*, 1984) dónde cada cepa bacteriana de la cual el fago fue aislado resultó inmune a la acción del mismo pero resultaron sensibles a fagos aislados de otras cepas. Asimismo, otras cepas de *P. larvae* probadas contra estos fagos también resultaron inmunes o resistentes por lo que no resultaron útiles para la identificación de la especie.

La caracterización realizada del genoma del bacteriófago PBL1 mostró que este está compuesto de ADN de doble hebra con un peso molecular de 24.1×10^6 con un contenido de G + C del orden del 41,5% (Dingman *et al.*, 1984). Las observaciones por MET mostraron que el fago tenía una cápside oval sin ningún tipo de angularidad de aproximadamente $95,9 \pm 2,6$ nm de largo X $52,5 \pm 1,9$ nm de ancho y largas colas no contráctiles de $131,8 \pm 1,5$ nm de largo X $9,4 \pm 0,6$ nm de ancho y una placa de base sin fibras aparentes (Dingman *et al.*, 1984). Posteriormente, en EE.UU. se aisló un fago mutante al cual se denominó PPL1c y que presumiblemente deriva de un fago temperado.

2. Objetivos específicos:

- 2.1. Evaluar si el bacteriófago PPL1c es una herramienta útil para diferenciar a *Paenibacillus larvae* de otros géneros de bacterias Gram positivas esporuladas presentes en las mieles y productos de la colmena.
- 2.2. Tipificar cepas de *Paenibacillus larvae* de diferentes orígenes geográficos mediante el fago PPL1c .

3. Materiales y Métodos

3.1. Cepas bacterianas y bacteriófagos

El bacteriófago PPL1c, es un mutante espontáneo aislado de un sobrenadante de medio de cultivo de la cepa de *P. larvae* NE aislada por el Dr. Donald P. Stahly (Department of Microbiology, College of Medicine, University of Iowa, Iowa, USA) de una escama de loque americana provista por los Dres. David Knox y H. Shimanuki (Bioenvironmental Bee Laboratory, Beltsville, Maryland, USA). El fago PPL1c es un fago mutante presumiblemente derivado del fago temperado presente en el cultivo de la cepa *P. larvae* NE. La cepa de *P. larvae* NRRL B-3555 (Syn = PL 103 Syn= LMG 16243) se empleó como cultivo indicador (CI) de este fago y para producir *stocks* del mismo. Adicionalmente se probaron cepas de *P. larvae* aisladas en EE.UU. cedidas gentilmente por el Dr. D.P. Stahly e indicadas con un asterisco en las tablas de resultados 3 y 4. El resto de las cepas bacterianas empleadas en este capítulo están detalladas en el listado de cepas del Capítulo II de esta tesis (Apéndices I, II, III y IV).

3.1.1. Medios de cultivo, condiciones de cultivo y ensayos de lisis en placa.

Se emplearon los siguientes medios de cultivo para el desarrollo de las cepas bacterianas: agar MYPGP; Caldo MYPGP, agar blando MYPGP, agar fondo MYPGP, en todos los casos, sin el agregado de antibióticos (Dingman & Stahly, 1983; Dingman *et al.*, 1984). También se utilizó diluyente para fagos (Buffer A) (Fink *et al.*, 1981).

Agar MPYGP:

Fórmula: 15 g de extracto de levaduras; 10 g de caldo Muller-Hinton (Britania®); 2 g de glucosa; 3 g de K_2HPO_4 ; 1 g de piruvato de sodio; 20 g de agar bacteriológico; agua destilada c.s.p. 1.000 ml; pH 7,0

Agar blando MYPGP:

Fórmula: Igual al anterior pero con una concentración final de agar bacteriológico de 6 g por litro (0,6 %)

Agar fondo MYPGP:

Fórmula: Igual al anterior pero con una concentración final de agar bacteriológico de 10 g por litro (1%)

Caldo MPYGP:

Fórmula: Igual al anterior pero sin el agregado de agar.

Diluyente para fagos (Buffer A)

Fórmula: NaCl 0,1M (NaCl 0,5844 g en 100 ml de agua destilada) + $MgCl_2$ 0,01M (0,2033 g en 100 ml de agua destilada); Tris 0,01M (0,12114 g en 100 ml de H_2O) + gelatina bacteriológica 0,07%. El pH se ajustó a 7 con HCl.

En todos los casos los medios y buffers se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 15 minutos y fueron fraccionados de la siguiente forma: agar MYPGP y agar fondo MYPGP: en frascos tapa a rosca con 200 ml de medio. Caldo MYPGP: en tubos tapa a rosca con 5 ml de caldo. Agar blando MYPGP: En tubos tapa a rosca con 2, 4 y 10 ml de medio cada uno. Diluyente para fagos: en tubos tapa a rosca con 5 ml cada uno.

Los cultivos bacterianos se incubaron en tubos con tapa a rosca conteniendo caldo MYPGP a 37 °C en agitación constante o en placas de agar MYPGP incubadas en aerobiosis a 37 °C.

Para los ensayos de formación de placas se empleó la técnica del agar superficial (*soft agar overlay*), para lo cual se prepararon placas de Petri de vidrio estériles de 9 cm de diámetro sembradas con 40 ml de agar fondo MYPGP, luego de que se solidificó la capa de agar, se cubrieron con 2 ml de agar blando (*soft agar*) MYPGP adicionado con 200 μ l del CI *P. larvae* NRRL B-3555 más 100 μ l de una dilución del fago PPL1c en diluyente para fagos (buffer A). El CI se preparó sembrando una alícuota de la cepa bacteriana en 5 ml de caldo MYPGP y se incubó bajo agitación constante a 37 °C durante 48-72 h hasta obtener un valor de DO de (A_{620nm}) del rango de 0.4 equivalente al valor 1 de la escala de Mc Farland. Las placas así sembradas se incubaron en aerobiosis a 37 °C durante 48 h, al cabo de las cuales se examinaron para detectar placas de lisis.

3.1.2. Preparación de soluciones de alto título del bacteriófago PPL1c.

Para obtener preparaciones del fago PPL1c conteniendo aproximadamente 10^{10} unidades formadoras de placas (UFP) por ml se emplearon placas que exhibían una lisis casi confluyente,

preparadas de la siguiente forma:

Se prepararon placas de agar fondo MYPGP y se dejaron solidificar abiertas en banco de flujo laminar por el término de 45 min. Paralelamente, a cada tubo conteniendo 4 ml de agar blando MYPGP fundido y mantenido a 45 °C en BM se le adicionó 500 µl de una suspensión del fago en diluyente para fagos conteniendo 10^4 UFP + 600 µl del CI *P. larvae* NRRL B-3555 (proveniente de un cultivo líquido de 48-72 h de incubación en agitación a 37 °C en fase logarítmica de crecimiento) como se detalló en el apartado anterior. Las placas se cubrieron delicadamente con esta preparación. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C hasta observar lisis confluyente o casi confluyente (Figura 34). En ese momento, se le agregó a cada placa 5 ml de diluyente para fagos (buffer A) frío, luego de lo cual, se incubaron toda la noche en heladera a 4 °C para permitir que el fago difunda en el buffer. El buffer conteniendo el fago se recolectó (con o sin la capa de agar superficial blando) y se centrifugó a 17.000 g durante 10 min para eliminar restos de células bacterianas y agar. Posteriormente, el sobrenadante se filtró a través de una membrana Millipore® de 0,22 µm de diámetro de poro. Las preparaciones del fago se mantuvieron en crioviales estériles de tapa a rosca a 4 °C como soluciones de alto título a una concentración mínima del orden de 10^9 UFP/ml.

3.1.3. Técnica de *spot-test* para determinar la susceptibilidad de las cepas bacterianas al fago PPL1c.

Se empleó la prueba del *spot-test* para determinar la susceptibilidad/resistencia de las distintas cepas de *P. larvae* (n= 396) estudiadas en comparación con otras especies bacterianas presentes en fuentes de apiario (n= 60) y del grupo de cepas consideradas anteriormente como *P. larvae* subsp. *pulvificiens* (n= 17).

Se usaron cultivos bacterianos desarrollados en caldo MYPGP en fase logarítmica de crecimiento incubados en agitación constante a su correspondiente temperatura óptima de desarrollo (para *P. larvae* 37 °C y para el resto a las temperaturas detalladas en la Tabla 5, Capítulo II). Se tomaron 200 µl de cada cultivo bacteriano y se mezclaron en vortex en un tubo tapa a rosca conteniendo 2 ml de agar blando MYPGP mantenido a 45 °C en BM. Cada mezcla se usó para cubrir delicadamente una placa de agar fondo MYPGP y se dejó solidificar en banco de flujo laminar con las tapas removidas. Luego se adicionaron gotas de 5 µl de la preparación del fago PPL1c en dos concentraciones (10^7 UFP/ml y 10^9 UFP/ml), respectivamente, efectuando 2 repeticiones de cada cepa con al menos 2 gotas de cada concentración por placa. Las gotas

se dejaron secar en banco de flujo y las placas se llevaron a estufa a la temperatura óptima de incubación de cada especie probada y se observaron al cabo de 24 y 48 h determinando la presencia de placas de lisis. Las observaciones se clasificaron como: (+) placas de lisis claras, placas de lisis turbias (+t) o completa ausencia de lisis (-) en el área ocupada por la gota. Con varias cepas se observaron placas turbias o semi-turbias (+t) debidas a la formación de pequeños puntos de lisis confluentes.

4. Resultados y Discusión

El bacteriófago PPL1c es un mutante virulento espontáneo del fago temperado PPL1. La pureza del fago, se aseguró sometiendo al mismo a varias purificaciones a partir de placas claras individuales. Las observaciones realizadas en el MET mostraron que ambos fagos eran muy similares, Tanto el PPL1 (Dingman *et al.*, 1984) como el PPL1c mostraron cabezas de forma oval, colas no-contráctiles y una placa de base con estructura de horquilla, sin fibras de cola aparentes compatible con la descripción de la familia *Siphoviridae* (Ackerman, 2004).

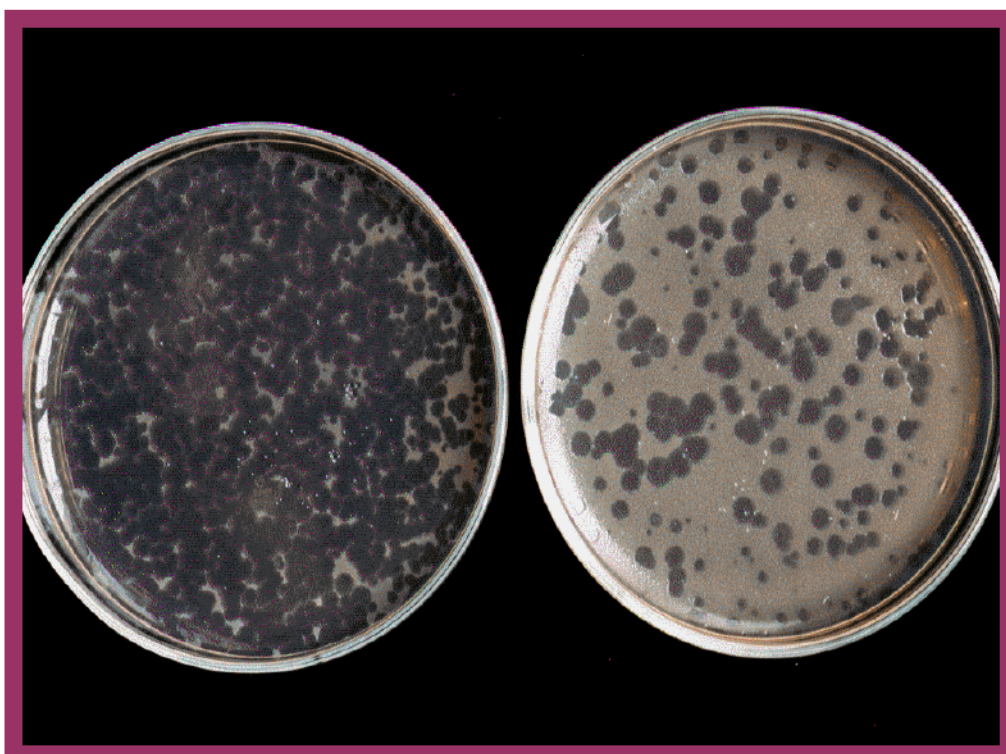


Figura 34: Obtención de stock de alto título del bacteriófago PPL1c empleando como cultivo indicador (CI) la cepa NRRL B- 3553. La placa de la izquierda presenta lisis casi confluyente y es la que se usa para obtener el stock.

De un total de 398 cepas de *P. larvae* evaluadas por medio del *spot test*, 391 (98 %) resultaron sensibles al fago; encontrándose sólo 7 cepas resistentes al fago (8 %): dos de Argentina (PL 9 y PL 61), una de Italia (PL42) y 4 de origen desconocido (SAG m289, SAG m290, SAG 10230, SAG 10367). Los resultados se resumen en la Tabla 3 en la que se observa que el grado de susceptibilidad de las cepas fue alto aun cuando las mismas provenían de distintos orígenes geográficos. En la Tabla 4 se resumen los resultados del *spot test* con otras especies de *Paenibacillus* y especies seleccionadas de los géneros *Bacillus* y *Brevibacillus* en donde se puede ver que ninguna de las cepas probadas (n=58) fueron susceptibles al fago.

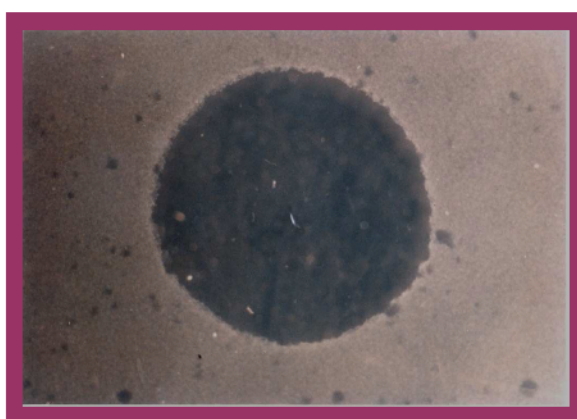


Figura 35: Spot test: Reacción positiva

Tabla 3: Resultados de las pruebas de *spot-test* para determinar susceptibilidad-resistencia de las cepas de *P. larvae* frente al bacteriófago PPL1c.

Cepa	Origen	Lisis con el fago PPL1c	
		10 ⁹ UFP/ml	10 ⁷ UFP/ml
NRRL B-3555 (PL 103) Cultivo Indicador *	USA	+	+
ATCC 9545 (PL 101)	USA	+	+
ATCC 25747 (PL 104)	USA	+	+
ATCC 25748 (PL 336)	USA	+t	+t
NRRL B-3554 *	USA	+	+
NRRL B-3558 *	USA	+	+
NRRL B-3650 *	USA	+	+
PL 1	Argentina	+	+
PL 2	Argentina	+	+
PL 3	Argentina	+	+
PL 4	Argentina	+t	+t

Cepa	Origen	Lisis con el fago PPL1c	
		10 ⁹ UFP/ml	10 ⁷ UFP/ml
PL 5	Argentina	+ t	+ t
PL 6	Argentina	+ t	+ t
PL 7	Argentina	+ t	+ t
PL 8	Argentina	+	+
PL 10	Argentina	+	+
PL 11	Argentina	+	+
PL 12	Argentina	+	+
PL 13	Argentina	+ t	+ t
PL 14	Argentina	+	+
PL 15	Argentina	+ t	+ t
PL 16	Argentina	+	+
PL 17	Francia	+	+
PL 18	Argentina	+	+
PL 19	Argentina	+	+ t
PL 20	Argentina	+	+ t
PL 21	Nueva Zelanda	+	+
PL 22	Nueva Zelanda	+	+
PL 23	Nueva Zelanda	+	+
PL 24	Nueva Zelanda	+	+
PL 25	Nueva Zelanda	+	+
PL 26	Nueva Zelanda	+	+
PL 26	Nueva Zelanda	+	+
PL 27	Argentina	+	+ t
PL 28	Argentina	+	+
PL 29	Nueva Zelanda	+	+
PL 30	Nueva Zelanda	+	+
PL 31	Nueva Zelanda	+	+
PL 32	Argentina	+	+
PL 33	Argentina	+	+
PL 34	Argentina	+	+
PL 35	Argentina	+ t	+ t
PL 36	Argentina	+	+
PL 37	Argentina	+ t	+ t
PL 38	Argentina	+	+ t
PL 39	Argentina	+	+ t
PL 40	Italia	+	+
PL 41	Italia	+	+
PL 43	Italia	+	+
PL 44	Italia	+	+

Cepa	Origen	Lisis con el fago PPL1c	
		10 ⁹ UFP/ml	10 ⁷ UPF/ml
PL 45	Francia	+	+
PL 46	Francia	+	+ t
PL 47	Francia	+ t	+ t
PL 48	Francia	+	+
PL 49	Francia	+	+
PL 50	Argentina	+	+
PL 51	Argentina	+	+ t
PL 52	Argentina	+	+
PL 53	Argentina	+	+ t
PL 54	Argentina	+ t	+ t
PL 55	Argentina	+	+
PL 56	Suecia	+	+
PL 57	Suecia	+	+ t
PL 58	Suecia	+	+ t
PL 59	Suecia	+	+
PL 60	Argentina	+	+ t
PL 62	Argentina	+	+
PL 63	Argentina	+	+
PL 64	Argentina	+	+
PL 65	Argentina	+	+
PL 66	Argentina	+	+
PL 67	Argentina	+ t	+ t
PL 68	Polonia	+	+
PL 69	Polonia	+	+
PL 70	Polonia	+	+
PL 71	Polonia	+	+
PL 72	Polonia	+	+
PL 73	Polonia	+	+
PL 74 (CCM 4483)	R. Checa	+	+ t
PL 75 (CCM 4484)	R. Checa	+	+
PL 76 (CCM 4485)	R. Checa	+	+
PL 77 (CCM 4486)	R. Checa	+	+
PL 78	Argentina	+	+
PL 79	Argentina	+	+ t
PL 80	Argentina	+ t	+ t
PL 81	Argentina	+	+
PL 82	Argentina	+	+
PL 83	USA	+	+ t
PL 84	USA	+	+ t

Cepa	Origen	Lisis con el fago PPL1c	
		10 ⁹ UFP/ml	10 ⁷ UPF/ml
PL 85	USA	+	+
PL 86	USA	+ t	+ t
PL 87	USA	+	+ t
PL 88	USA	+	+ t
PL 89	Alemania	+ t	+ t
PL 90	Alemania	+ t	+ t
PL 91	Alemania	+	+
PL 92	Argentina	+	+
PL 93	Argentina	+	+
PL 94	Argentina	+ t	+ t
PL 95	Inglaterra	+	+
PL 96	Inglaterra	+ t	+ t
PL 97	Inglaterra	+	+
PL 98	Argentina	+	+ t
PL 99	Argentina	+	+
PL 100	Túnez	+	+
PL 102	Argentina	+	+
PL 105	Argentina	+	+
PL 106	Argentina	+	+
PL 107	Argentina	+	+
PL 108	Argentina	+	+
PL 109	Argentina	+	+
PL 110	Argentina	+	+
PL 111	Argentina	+	+
PL 112	Argentina	+	+
PL 113	Argentina	+	+
PL 114	Argentina	+	+
PL 115	Argentina	+	+
PL 116	Argentina	+	+
PL 117	Argentina	+	+
PL 118	Argentina	+	+
PL 119	Argentina	+	+
PL 120	Argentina	+	+
PL 121	Argentina	+	+
PL 122	Argentina	+	+
PL 123	Argentina	+	+
PL 124	Argentina	+	+
PL 125	Argentina	+	+
PL 126	Argentina	+	+

Cepa	Origen	Lisis con el fago PPL1c	
		10 ⁹ UFP/ml	10 ⁷ UFP/ml
PL 127	Argentina	+	+
PL 128	Argentina	+	+
PL 129	Argentina	+	+
PL 130	Argentina	+	+
PL 131	Argentina	+	+
PL 132	Argentina	+	+
PL 133	Argentina	+	+
PL 134	Argentina	+	+
PL 135	Argentina	+	+
PL 136	Argentina	+	+
PL 137	Argentina	+	+
PL 138	Argentina	+	+
PL 139	Argentina	+	+
PL 140	Argentina	+	+
PL 141	Argentina	+	+
PL 142	Argentina	+	+
PL 143	Argentina	+	+
PL 144	Argentina	+	+
PL 145	Argentina	+	+
PL 146	Argentina	+	+
PL 147	Argentina	+	+
PL 148	Argentina	+	+
PL 149	Argentina	+	+
PL 150	Argentina	+	+
PL 151	Argentina	+	+
PL 152	Argentina	+	+
PL 153	Argentina	+	+
PL 154	Argentina	+	+
PL 155	Argentina	+	+
PL 156	Argentina	+	+
PL 157	Argentina	+	+
PL 158	Argentina	+	+
PL 159	Argentina	+	+
PL 160	Argentina	+	+
PL 161	Argentina	+	+
PL 162	Argentina	+	+
PL 163	Argentina	+	+
PL 164	Argentina	+	+
PL 165	Argentina	+	+

Cepa	Origen	Lisis con el fago PPL1c	
		10 ⁹ UFP/ml	10 ⁷ UFP/ml
PL 166	Argentina	+	+
PL 167	Argentina	+	+
PL 168	Argentina	+	+
PL 169	Argentina	+	+
PL 170	Argentina	+	+
PL 171	Argentina	+	+
PL 172	Argentina	+	+
PL 173	Argentina	+	+
PL 174	Argentina	+	+
PL 175	Argentina	+	+
PL 176	Argentina	+	+
PL 177	Argentina	+	+
PL 178	Argentina	+	+
PL 179	Argentina	+	+
PL 180	Argentina	+	+
PL 181	Argentina	+	+
PL 182	Argentina	+	+
PL 183	Argentina	+	+
PL 184	Argentina	+	+
PL 185	Argentina	+	+
PL 186	Argentina	+	+
PL 187	Argentina	+	+
PL 188	Argentina	+	+
PL 189	Argentina	+	+
PL 190	Argentina	+	+
PL 191	Argentina	+	+
PL 192	Argentina	+	+
PL 193	Argentina	+	+
PL 194	Argentina	+	+
PL 195	Argentina	+	+
PL 196	Argentina	+	+
PL 197	Argentina	+	+
PL 198	Argentina	+	+
PL 199	Argentina	+	+
PL 200	Argentina	+	+
PL 201	Italia	+	+
PL 202	Italia	+	+
PL 203	Italia	+	+
PL 204	Argentina	+	+

Cepa	Origen	Lisis con el fago PPL1c	
		10 ⁹ UFP/ml	10 ⁷ UFP/ml
PL 205	Argentina	+	+
PL 206	Argentina	+	+
PL 207	Argentina	+	+
PL 208	Argentina	+	+
PL 209	Argentina	+	+
PL 210	Argentina	+	+
PL 211	Argentina	+	+
PL 212	Canadá	+	+
PL 213	Canadá	+	+
PL 214	Canadá	+	+
PL 215	Argentina	+	+
PL 216	Argentina	+	+
PL 217	Argentina	+	+
PL 218	Argentina	+	+
PL 219	Argentina.	+	+
PL 220	Argentina	+	+
PL 221	Argentina	+	+
PL 222	Argentina	+	+
PL 223	Argentina	+	+
PL 224	Argentina	+	+
PL 225	Argentina	+	+
PL 226	Argentina	+	+
PL 227	Argentina	+	+
PL 228	Francia	+	+
PL 229	Francia	+	+
PL 230	Francia	+	+
PL 231	Francia	+	+
PL 232	Francia	+	+
PL 233	Argentina	+	+
PL 234	Argentina	+	+
PL 235	Argentina	+	+
PL 236	Argentina	+	+
PL 237	Argentina	+	+
PL 238	Argentina	+	+
PL 239	Argentina	+	+
PL 240	Argentina	+	+
PL 241	Argentina	+	+
PL 242	Argentina	+	+
PL 243	Argentina	+	+

Cepa	Origen	Lisis con el fago PPL1c	
		10 ⁹ UFP/ml	10 ⁷ UPF/ml
PL 244	Argentina	+	+
PL 245	Argentina	+	+
PL 246	Argentina	+	+
PL 247	Argentina	+	+
PL 248	Argentina	+	+
PL 249	Argentina	+	+
PL 250	Argentina	+	+
PL 251	Argentina	+	+
PL 252	España	+	+
PL 253	España	+	+
PL 254	España	+	+
PL 255	España	+	+
PL 256	España	+	+
PL 257	Argentina	+	+
PL 258	Argentina	+	+
PL 259	Argentina	+	+
PL 260	Argentina	+	+
PL 261	Argentina	+	+
PL 262	Argentina	+	+
PL 263	Argentina	+	+
PL 264	Argentina	+	+
PL 265	Argentina	+	+
PL 266	Argentina	+	+
PL 267	Argentina	+	+
PL 268	Argentina	+	+
PL 269	Argentina	+	+
PL 270	Argentina	+	+
PL 271	Argentina	+	+
PL 272	Argentina	+	+
PL 273	Argentina	+	+
PL 274	Argentina	+	+
PL 275	Argentina	+	+
PL 276	Argentina	+	+
PL 277	Argentina	+	+
PL 278	Argentina	+	+
PL 279	Argentina	+	+
PL 280	Argentina	+	+
PL 281	Argentina	+	+
PL 282	Argentina	+	+

Cepa	Origen	Lisis con el fago PPL1c	
		10 ⁹ UFP/ml	10 ⁷ UPF/ml
PL 283	Argentina	+	+
PL 284	Uruguay	+	+
PL 285	Uruguay	+	+
PL 286	Uruguay	+	+
PL 287	Uruguay	+	+
PL 288	Francia	+	+
PL 289	Japón	+	+
PL 290	Japón	+	+
PL 291	Uruguay	+	+
PL 292	Uruguay	+	+
PL 293	Uruguay	+	+
PL 294	Uruguay	+	+
PL 295	USA	+	+
PL 296	USA	+	+
PL 297	Argentina	+	+
PL 298	Argentina	+	+
PL 299	Argentina	+	+
PL 300	Argentina	+	+
PL 301	Chile	+	+
PL 302	Chile	+	+
PL 303	Argentina	+	+
PL 304	Bélgica	+	+
PL 305	Bélgica	+	+
PL 306	Argentina	+	+
PL 307	Argentina	+	+
PL 308	Argentina	+	+
PL 309	Argentina	+	+
PL 310	Argentina	+	+
PL 311	Argentina	+	+
PL 312	Argentina	+	+
PL 313	Argentina	+	+
PL 314	Argentina	+	+
PL 315	Argentina	+	+
PL 318	Chile	+	+
PL 319	Chile	+	+
PL 320	Tres Arroyos	+	+t
PL 321	Luján	+t	+t
PL 322	Tres Arroyos	+	+
PL 323	Delta	+	+t

Cepa	Origen	Lisis con el fago PPL1c	
		10 ⁹ UFP/ml	10 ⁷ UPF/ml
PL 324	E. de la Cruz	+	+t
PL 325	Rauch	+t	+t
PL 326	Chivilcoy	+	+t
PL 327	La Plata	+ t	+ t
PL 328	Roque Pérez	+	+t
PL 329	Las Flores	+	+t
PL 330	Las Flores	+	+t
PL 331	La Plata	+	+
PL 332	La Plata	+	+
PL 333	Magdalena	+	+
PL 334	Villarino	+	+
PL 335	Magdalena	+t	+t
PL 337	Río Colorado	+t	+t
PL 338	Ranchos	+	+t
PL 339	Chile	+	+
PL 340	Gorina	+	+
PL 341	Pergamino	+	+
PL 342	Pigüé	+	+
PL 343	Pigüé	+	+
PL 343	Pigüé	+t	+t
PL 345	9 de Julio	diminutas en toda la placa	diminutas en toda la placa
PL 346	Pigüé	+	+
PL 347	Bragado	+	+
PL 348	Gorina	+t	+t
PL 349	San Pedro	+	+
PL 350	Brandsen	+	+
PL 351	Henderson	+	+
PL 352	25 de Mayo	+	+
PL 353	Quilmes	+	+
PL 354	La Plata	+	+
PL 355	La Plata	+t	+t
PL 356	S. Miguel del Monte	+	+
PL 357	Chascomús	diminutas en toda la placa	diminutas en toda la placa
PL 358	S. Miguel del Monte	+	+
PL 359	Berisso	+	diminutas en toda la placa
PL 360	Berisso	+	+
PL 361	Berisso	+	diminutas en toda la placa
PL 362	Berisso	+	+
PL 363	Bolívar	+	+

Cepa	Origen	Lisis con el fago PPL1c	
		10 ⁹ UFP/ml	10 ⁷ UPF/ml
PL 364	Ranchos	+	+
PL 365	Salta	+	+
PL 366	La Plata	+t	+t
PL 367	Sierra de los Padres	+t	+t
PL 368	Buzios, Brasil	+t	+t
PL 369	Sierra de los Padres	+t	+t
PL 370	Gorina	+t	+t
PL 371	Laguna Salada	+	+
PL 372	Berisso	+t	+t
PL 373	Boston, USA	+t	+t
PL 374	Boston, USA	+	diminutas en toda la placa
PL 375	General Conesa	+	+
PL 376	Lincoln	+	+t
PL 377	Las Flores	+	+
PL 378	Haedo	+t	+t
PL 379	Haedo	+t	+t
PL 380	Brandsen	+t	+t
PL 381	Castelli	+t	+t
PL 382	La Plata	+	+
AK, Arkansas*	USA	+	+
AZ, Arizona*	USA	+	+
GA, Georgia*	USA	+	+
NC, North Carolina*	USA	+	+
NE, Nebraska*	USA	+	+
WI, Wisconsin*	USA	+	+
WV, West Virginia*	USA	+	+
SAG 11231	Desconocido	+	+
SAG 19754	Desconocido	diminutas en toda la placa	diminutas en toda la placa
PL 9	Argentina	-	-
PL 42	Italia	-	-
PL 61	Argentina	-	-
SAG m289	Desconocido	-	-
SAG m290	Desconocido	-	-
SAG 10230	Desconocido	-	-
SAG 10367	Desconocido	-	-

Referencias: (+) placas de lisis claras (+t) placas de lisis turbias (-) completa ausencia de lisis.

*Cepas cedidas por D. P. Stahly (Department of Microbiology, College of Medicine, University of Iowa, Iowa, USA)

Con respecto al grupo *ex. pulvifaciens*, se encontró que 12 de las 18 cepas probadas resultaron resistentes (ausencia de lisis) al fago y 5 mostraron placas turbias cuando se empleó la concentración de 10^9 UFP/ml, y sólo dos (CCM 38 y NRRL B-3670) de estas 5 cepas resultó efectivamente sensible a la infección por el fago ya que también mostró placas turbias al emplear la concentración de 10^7 UFP/ml (Tabla 4). Las 3 cepas restantes que presentaron sensibilidad exhibiendo placas turbias sólo frente a la concentración de 10^9 UFP/ml no mostraron placas de lisis visibles cuando se probó la concentración de 10^7 UFP/ml (Tabla 4).

Se procedió a comprobar si la producción de placas turbias se debió efectivamente a la lisis provocada por el fago y no a la presencia de sustancias antagónicas de tipo de las bacteriocinas o algún otro tipo de inhibidor del desarrollo bacteriano metabolizadas por el CI de *P. larvae* (NRRL B-3555) con actividad frente a cepas específicas de *P. larvae*. Con este fin, se cultivó al CI en medio MYPGP líquido durante 48-72 h en agitación constante a 400 rpm hasta que alcanzó la fase logarítmica de crecimiento. Se tomaron 600 μ l de CI y se homogeneizaron con 4 ml de agar blando MYPGP mantenido a 45 °C y se cubrió una placa de agar fondo MYPGP dejando solidificar en banco de flujo laminar. Luego se llevó a estufa a 37 °C durante 24 h y, al cabo de ese tiempo la placa se cubrió con 5 ml de buffer A (diluyente para fagos) y se incubó toda la noche en heladera a 4 °C con el fin de facilitar la difusión del compuesto antagónico (de existir) en el buffer. Al día siguiente, se recogió el buffer, se centrifugó a 17.000 g durante 10 min con el objeto de eliminar bacterias y restos de agar blando. El sobrenadante se filtró por Millipore® de 0,22 μ m de diámetro de poro y se guardaron alícuotas en crioviales estériles a 4 °C. Con esta suspensión se efectuó el spot test con aquellas cepas de *P. larvae* que hubieran dado placas semi-turbias o turbias con el fago PPL1c. Si empleando esta suspensión se observaba nuevamente placas de lisis semi-turbias, turbias o claras indicaría producción de bacteriocinas o algún otro tipo de inhibidor por parte del CI NRRL B-3555, si por el contrario la reacción fuera negativa, se confirmaría en base a los resultados obtenidos en la primera evaluación de *spot test* que el fago provocó una lisis pero sin producción infectiva. En todos los casos, ninguna de las cepas formó placas de lisis cuando se probó el filtrado del cultivo indicador, por lo que se concluyó que el mismo no produjo efecto antagónico.

Dentro del grupo *ex pulvifaciens*, sólo tres cepas (CCM 38, NRRL B-3670 y NRRLB-14152) entre las que presentaron placas turbias soportaron el crecimiento del fago. Los otros 3 aislamientos resultaron positivos con la concentración más alta del fago, formando placas turbias probablemente debido a una lisis bacteriana temprana o lisis desde afuera (*lysis from without*) inducida por un tipo de virión de alta multiplicidad de adsorción pero sin la producción

de fagos. Este fenómeno se produce cuando una determinada bacteria se infecta con un fago en una multiplicidad de infección (MDI) elevada y la adsorción de un gran número de fagos a la superficie de la bacteria provoca su lisis por una desestabilización de su estructura (Abedon, 2008). Este fenómeno se observa experimentalmente como una lisis del cultivo infectado sin aumento en el número de fagos. Esto es algo más que simplemente MDI de fagos de alta adsorción que conducen a la destrucción bacteriana. Normalmente, después de la inyección, la bacteria repara la zona lisada, pero si son muchos los fagos que infectan a la célula, la reparación no se lleva a cabo, hay debilitamiento de la pared celular y lisis bacteriana (lisis desde fuera) y no se forman fagos infectivos porque no hay replicación.

Tabla 4: Resultados de las pruebas de *spot-test* para determinar susceptibilidad-resistencia de las cepas de *P. larvae* (grupo *ex pulvificiens*) frente al bacteriófago PPL1c

Cepa	Lisis con el fago PPL1c	
	10 ⁹ upf/ml	10 ⁷ UPF/ml
ATCC 13537 (Syn= NRRL B-3688) Cultivo Tipo	+ t	-
NRRL B-3670 *	+ t	+ t
CCM 38	+ t	+ t
NRRL B-14152 *	+ t	-
ATCC 25368	+t	+t
NRRL B-14153 *	-	-
NRRL B-14154 *	+ t	-
NRRL B-14157 *	-	-
NRRL B-14159 *	-	-
NRRL B-14160 *	-	-
NRRL B-14161 *	-	-
NRRL B-14162 *	-	-
NRRL B-14163 *	-	-
NRRL B-14164 *	-	-
NRRL B-14166 *	-	-
NRRL B-14167 *	-	-
NRRL NRS-1683 *	-	-
NRRL NRS-1687 *	-	-

Referencias: (+) placas de lisis claras (+t) placas de lisis turbias (-) completa ausencia de lisis

*Cepas cedidas por D. P. Stahly (Department of Microbiology, College of Medicine, University of Iowa, Iowa, USA).

Paralelamente, con las 3 cepas que produjeron placas turbias sólo con altas concentraciones del fago PPL1c, es decir, ATCC 13537, NRRL B-14152 y NRRL B-14154, se efectuó el siguiente experimento: Se cortaron placas de lisis individuales formadas dentro de la

gota de cada *spot test* con un bisturí estéril y se transfirieron a tubos eppendorf conteniendo 1 ml de buffer A (diluyente para fagos), se centrifugaron a 17.000 g y se filtraron por Millipore® de 0,22 µm de diámetro para remover células bacterianas. Cada suspensión se probó contra la cepa bacteriana de la cual había derivado bajo la modalidad de *spot test* empleando gotas de 5 µl.

Tabla 5: Resultados de las pruebas de *spot-test* para determinar susceptibilidad/resistencia de cepas seleccionadas de los géneros *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Lysinibacillus* y *Virgibacillus* frente al bacteriófago PPL1c.

Género y especie	Designación	Lisis con PPL1c 10 ⁹ y 10 ⁷ UPF/ml
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	-
	m39b	-
	m54	-
	m71	-
<i>Bacillus circulans</i>	ATCC 4515	-
<i>Bacillus coagulans</i>	ATCC 35670	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	NRRL B-1001	-
	m39r	-
<i>Bacillus megaterium</i>	NRRL B-939	-
	m11	-
	m13	-
	m40	-
<i>Bacillus mycoides</i>	ATCC 10206	-
	m55	-
<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 7061	-
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 10783	-
<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 10792	-
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	CCT 31	-
	BLA 168	-
	BLA 169	-
	BLA 170	-
	BLA 172	-
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	ATCC 245	-
<i>Paenibacillus alginolyticus</i>	NRRL NRS-1347	-
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	NRRL B-14940	-
<i>Paenibacillus apiarius</i>	ATCC 29575	-
<i>Paenibacillus azotofixans</i>	NRRL B-14372	-
<i>Paenibacillus chibensis</i>	NRRL B-142	-
<i>Paenibacillus chondroitinus</i>	NRRL NRS-1351	-
<i>Paenibacillus curdolanolyticus</i>	NRRL B-23243	-
<i>Paenibacillus dendritiformis</i>	NRRL B-23299	-
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	NRRL B-14679	-
<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	NRRL NRS-1356	-
<i>Paenibacillus kobensis</i>	NRRL B-23246	-

<i>Paenibacillus alvei</i>	NRRL B-383	-
	Ba 37	-
	BA 173	-
	m44	-
	LP1	-
	PM2	-
	m50	-
	BA56	-
	m71	-
	m94	-
BA159	-	
P52	-	
<i>Paenibacillus lautus</i>	NRRL NRS-666	-
<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	NRRL B-2522	-
<i>Paenibacillus macerans</i>	ATCC 8244	-
	NRRL B-390	-
<i>Paenibacillus macquariensis</i>	NRRL B-14306	-
<i>Paenibacillus pabuli</i>	NRRL NRS-924	-
<i>Paenibacillus peoriae</i>	NRRL B-14750	-
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	NRRL B-510	-
<i>Paenibacillus popilliae</i>	ATCC 14706	-
<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	ATCC 11377	-
<i>Paenibacillus validus</i>	NRRL NRS-1000	-
<i>Virgibacillus panthotenticus</i>	ATCC 14576	-

Referencias: (+) placas de lisis claras (+t) placas de lisis turbias (-) completa ausencia de lisis

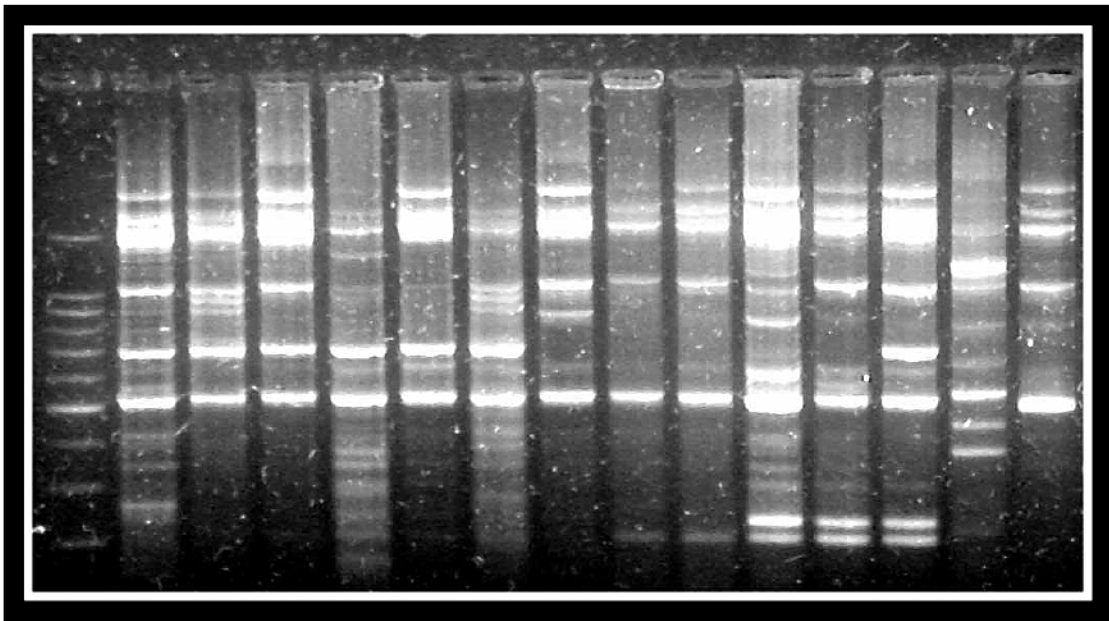
Solamente la cepa NRRL B-14152 indujo a la formación de placas claramente visibles dentro de la gota turbia, llegando a la conclusión de que sólo esta cepa soportaría el crecimiento del fago y, en el caso de las cepas restantes, el fago ocasionaría la muerte bacteriana pero las células bacterianas no soportarían la replicación del mismo (no se produciría progenie del fago).

Se propone que el fago PPL1c es una herramienta útil para la identificación de cepas de *P. larvae* como complemento de otras características fenotípicas y genotípicas.

Nota: Los resultados de este capítulo se resumen en las siguientes publicaciones:

- Stahly, D.P., Alippi, A.M., Bakhiet, N. Campana, C.F., Novak, C.C. & Cox, R. PPL1c, a virulent mutant bacteriophage useful for identification of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74: 295-296, 1999. USA, ISSN 0022-2011.
- De Graaf, D.C. Alippi, A.M., Brown, M., Evans, J.D.; Feldlaufer, M., Gregorc, A., Hornitzky, M., Pernal, S.F., Schuch, D.M.T., Titěra, D., Tomkies, V. and Ritter, W. (2006). Under the microscope. Diagnosis of American foulbrood disease in honeybees: A synthesis and proposed analytical protocols. *Letters in Applied Microbiology*, 43: 583-590. UK. ISSN 0266-8254.

Capítulo IV



Empleo de marcadores
moleculares de ADN en el
estudio de la variabilidad de
Paenibacillus larvae

Empleo de marcadores moleculares de ADN en el estudio de la variabilidad de *Paenibacillus larvae*

1. Introducción

1.1. Marcadores moleculares de ADN: generalidades

Como se explicó en la Introducción General, la información cuantitativa y cualitativa de la diversidad es un aspecto esencial de la ecología microbiana. Existe una amplia gama de marcadores moleculares que suelen utilizarse como indicadores o marcadores de diversidad, la que puede analizarse a nivel de especie, de poblaciones y dentro de las poblaciones a nivel de individuo (Caetano-Anollés & Gresshoff, 1998). Estos marcadores moleculares se caracterizan por conservarse en los distintos niveles jerárquicos de la clasificación y son neutros, es decir no son modificados por el ambiente. A nivel de especie, la identificación a nivel taxonómico y la categorización en especies es una información esencial para estudios de sistemática, ecología y evolución. Los marcadores moleculares muestran las diferencias entre organismos y esto permite reconocerlos y definir su categoría taxonómica en base a la relación de estos marcadores con los de especies estrechamente emparentadas. A nivel poblacional, los marcadores moleculares son eficientes indicadores de la diversidad que permiten caracterizar poblaciones microbianas (Caetano-Anollés & Gresshoff, 1998).

Existen diversos marcadores moleculares que se emplean para alcanzar un cierto nivel de clasificación filogenética, de género, especie, subespecie, biovar, patovar, biovariedad y cepa; además de poseer ventajas y desventajas con respecto a facilidad de aplicación, reproducibilidad, requerimiento de equipamiento altamente sofisticado y nivel de resolución (Caetano-Anollés & Gresshoff, 1998). En la Figura 36 se muestra un esquema del alcance resolutorio de los métodos más utilizados.

A continuación se describirán brevemente las herramientas más comúnmente empleadas para la identificación y caracterización de las bacterias ya sea para la discriminación inter-específica como intra-específica, mediante el empleo de ADN que se mencionarán o utilizarán en la presente tesis.

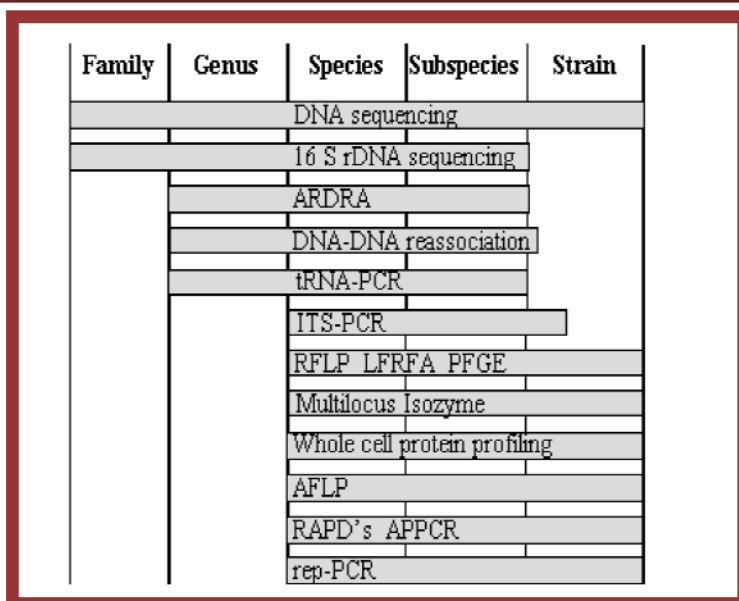


Figura 36: Resolución relativa de diferentes técnicas de identificación de microorganismos. Tomado de: De Bruijn (<https://www.msu.edu/~debruijn/>)

1.1.1. Secuenciación del ADN

La secuenciación de una región del ADN bacteriano es un método altamente confiable que puede reproducirse entre distintos laboratorios y no requiere condiciones especiales de cultivo. Una vez obtenida la secuencia, la misma se compara en las bases de datos para buscar homología o para compararla con otras secuencias ya obtenidas y establecer relaciones filogenéticas.

1.1.2. Análisis del operón ARNr

Los ribosomas son orgánulos complejos de ácidos nucleicos y proteínas donde se realiza la síntesis de las proteínas celulares y se encuentran conservados en los organismos.

La secuencia del operón 16S se trata de un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 pb, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el ADNr 16S se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla. Esta macromolécula presenta una serie de características que según Woese (1987) lo constituye en un cronómetro molecular definitivo:

- Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales.

- Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
- Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas a lo largo de toda la escala evolutiva.
- El tamaño relativamente largo de los ADNr 16S (1.540 pb) minimiza las fluctuaciones estadísticas.
- La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
- Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los genes que codifican los ADNr 16S, existen bases de datos amplias y en continuo crecimiento.

En las bacterias, los genes que codifican la síntesis proteica están organizados en tres operones (conjunto de genes que se transcriben a partir de la misma región promotora), el ARNr 23S (rrl), el 16S (rrs) y el 5S (rrf), separados por regiones espaciadoras o intergénicas (IG), y contiene además genes para uno o más ARN de transferencia (ARNt) (Gürtler & Stanisich, 1996).

1.1.3. Electroforesis en geles de campo pulsado (PFGE)

La electroforesis en geles de campo pulsado (PFGE) es una técnica utilizada para la separación de grandes moléculas de ADN mediante la aplicación de un gel de matriz de un campo eléctrico que cambia periódicamente de dirección. Resuelve fragmentos de gran tamaño al digerir el ADN genómico total con endonucleasas de baja frecuencia de corte. La variación de las secuencias nucleótidos se revela por el polimorfismo de los fragmentos obtenidos (Tenover *et al.*, 1995).

1.1.4. Técnicas que emplean la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (conocida como PCR por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*) permite amplificar más de un millón de veces un fragmento de ADN que, de acuerdo se utilicen oligonucleótidos cebadores de 15 o 20 pb al azar o de secuencias conocidas, conduce a la amplificación de regiones específicas o inespecíficas y desconocidas del genoma. Esta técnica fue ideada en la década del 80 por Kary B. Mullis por lo que ganó el premio Nobel de Química en el año 1993 y un desarrollo clave para el método fue

la identificación de polimerasas en organismos hipertermófilos como *Thermus aquaticus* que dio lugar al nombre de *Taq polimerasa*.

La reacción se lleva a cabo en una serie de ciclos (25-40) cada uno de los cuales incluye tres pasos que se ejemplifican en la Figura 37.

Desnaturalización: Consiste en la apertura de las hebras de ADN complementarias que se obtiene a alta temperatura (90-95 °C), esto hace que se rompan los puentes de hidrógeno intercatenarios y, por lo tanto, la separación de ambas cadenas. Para obtener la completa separación de la hebra de ADN esta temperatura debe mantenerse unos minutos.

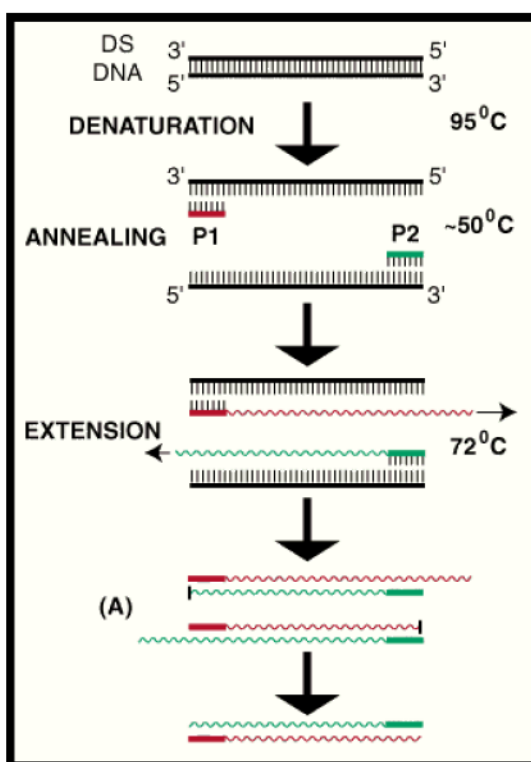


Figura 37: Representación esquemática de una reacción de PCR. Tomado de: <http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html>

Hibridación: También se denomina de emparejamiento (*annealing*). La temperatura se mantiene en rangos que pueden variar entre los 40 °C y los 60 °C y de esta manera los oligonucleótidos se unen a regiones homólogas.

Extensión: La *Taq polimerasa* incorpora nucleótidos en el extremo 3' del oligonucleótido cebador utilizando como molde la cadena de ADN simple previamente desnaturalizada. La temperatura a la cual se lleva a cabo este paso suele ser 72 °C a la cual la enzima alcanza su mayor actividad.

Agregando exceso de nucleótidos y oligonucleótidos la repetición de estos tres pasos -generalmente entre 30 y 35 veces- conduce a una amplificación exponencial de fragmentos de ADN delimitados por los cebadores. La mezcla de reacción debe contener la secuencia de ADN que se quiere amplificar (ADN molde), uno o dos oligonucleótidos sintéticos (P1 y P2) que servirán como cebadores, una ADN polimerasa termoestable (*Taq*), una solución tampón o *buffer* que mantiene el pH adecuado, un ión divalente (por lo general magnesio como MgCl₂) y los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato –dATP, dGTP, dCTP y dTTP– para polimerizar el nuevo ADN (Caetano-Anollés & Gresshoff, 1998).

1.1.4.1. Amplificación al azar de ADN polimórfico (marcadores RAPD)

Los marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) son un sistema de detección de polimorfismos en la secuencia de ADN, basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que consiste en amplificar al azar fragmentos del genoma. Esto se logra realizando la amplificación de ADN con uno o un conjunto de cebadores cortos y de secuencia arbitraria, que se hibridan a baja temperatura. Los fragmentos así obtenidos se separan por tamaño en una matriz de agarosa. De esta manera se genera una huella digital de cada individuo (*fingerprint*), ya que generalmente alguno de los fragmentos amplificados son polimórficos. Los polimorfismos se generan por diferencias en los genomas de los organismos. Las mutaciones, inserciones y deleciones dentro y entre los sitios de unión del cebador resultan en la amplificación de fragmentos de tamaño diferencial (Caetano-Anollés & Gresshoff, 1998).

1.1.4.2. Amplificación selectiva de fragmentos de restricción (AFLP)

La técnica de amplificación selectiva de fragmentos de restricción (AFLP) es una variante de los RAPDs y consiste en digerir el ADN genómico con dos enzimas de restricción, la especificidad se da por la secuencia que se genera con el sitio de restricción de las enzimas a lo que se adiciona secuencias de adaptadores. Esto determina que solo parte de los fragmentos generados por los cortes sean amplificados. Los fragmentos amplificados se separan y se visualizan en geles de poliacrilamida en dónde se observan los polimorfismos que son consecuencia de variaciones en los sitios de restricción debidos a resultados de arreglos genéticos como mutaciones, deleciones, inserciones y otros (Caetano-Anollés & Gresshoff, 1998).

1.1.4.3. Polimorfismos por restricción de la longitud de los fragmentos (RFLP)

Los polimorfismos por restricción de la longitud de los fragmentos (RFLP) consiste en cortar fragmentos de ADN con endonucleasas que reconocen "puntos o sitios de restricción". Actualmente, el RFLP se utiliza en combinación con la PCR (PCR-RFLP), así se detectan diferencias entre las secuencias de alelos. Los amplicones digeridos suelen resolverse mediante electroforesis (Caetano-Anollés & Gresshoff, 1998).

1.1.4.4. rep-PCR

En los genomas de las bacterias se han identificado tres familias de elementos repetitivos que comprenden la secuencia de 35-40 pb REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*), la secuencia de 124-127 pb ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) y el elemento BOX de 154 pb. Estas se encuentran distribuidas en distintas posiciones a lo largo del genoma bacteriano, lo cual resultó en el desarrollo de una metodología denominada rep-PCR para mostrar las variaciones entre los genomas debido a sus localizaciones relativas (Versalovic *et al.*, 1994). Los fragmentos amplificados se resuelven en geles de agarosa en donde se pueden observar los perfiles de bandas de ADN que identifican individuos y al conjunto de fingerprints se los conoce como *rep-fingerprint*. Los patrones de bandas obtenidos se pueden analizar visualmente o con programas de computación específicos (Figura 38).

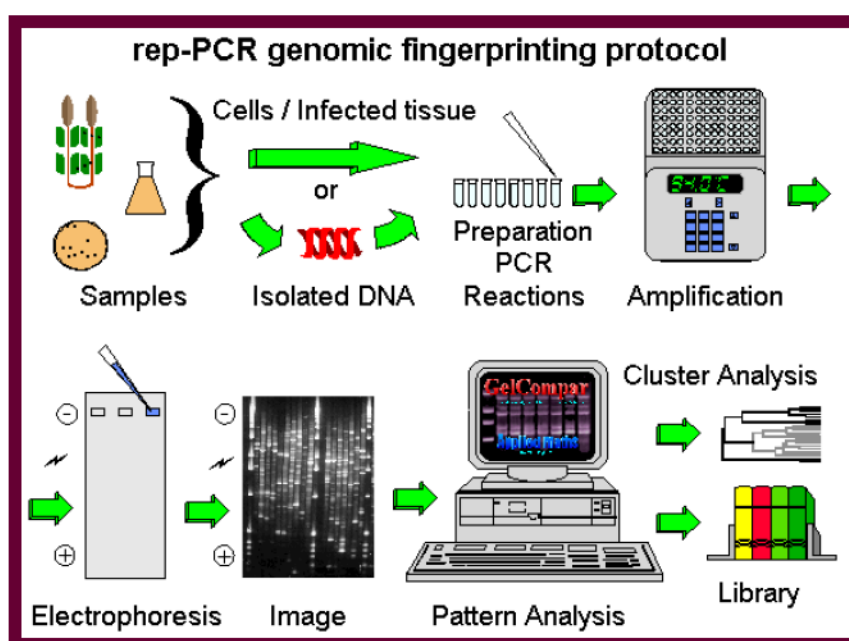


Figura 38: Representación esquemática de la técnica de rep-PCR. Tomado de De Bruijn (<https://www.msu.edu/~debruijn/>)

1.2. Marcadores moleculares de ADN empleados en el análisis de la diversidad de *P. larvae*.

Los primeros intentos para diferenciar aislamientos de *P. larvae* mediante marcadores moleculares de ADN fueron hechos por Hornitzky y Djordjevic (1992) empleando perfiles de SDS-PAGE y western blots pero no fueron de utilidad para la diferenciación de aislamientos del patógeno. Djordjevic y col. (1994) identificaron 5 tipos clonales de acuerdo con el nivel de similitud resultante de un análisis por REFP (*restriction endonuclease fragments patterns*) digiriendo ADN genómico total con la enzima *CfoI*, pero el elevado número de fragmentos obtenidos hacía extremadamente difícil la identificación de cada uno de ellos. Posteriormente, Heyndrickx y col. (1996) emplearon técnicas de RAPD, ARDRA y AFLP en estudios polifásicos para diferenciar entre 8 cepas de *P. larvae* (4 de ellas pertenecientes a la especie ex. *pulvificans*). Por su parte, Wu y col. (2005) usaron PFGE para estudiar la variabilidad intra-especie encontrando 12 tipos diferentes en una población de 44 cepas provenientes de Australia y Argentina y correlacionaron los tipos obtenidos con el origen geográfico de las muestras.

En nuestros trabajos demostramos por primera vez que, mediante el uso de la técnica de rep-PCR con los cebadores BOX A, es posible diferenciar tres genotipos dentro de la población de *P. larvae* (Alippi & Aguilar, 1998). Estudios posteriores de otros investigadores en Alemania permitieron diferenciar tres patrones de *fingerprints* empleando los cebadores BOXA1R y dos empleando los cebadores MBOREP1 (Neuendorf *et al.*, 2004). Subsecuentemente, mediante una combinación de estos patrones genéticos Genersch y Otten (2006) definieron 5 subgrupos genéticos a los cuales denominaron *AB*, *Ab*, *ab*, *aB*, y *aβ* que se correlacionaban con 4 subgrupos definidos mediante el empleo de cebadores ERIC (ERIC I, ERIC II, ERIC III y ERIC VI) (Ashiralieva & Genersch, 2004).

En los últimos años, el análisis molecular de la región intergénica (ITS) entre los genes 16S y 23S rDNA de 134 cepas provenientes de USA y 5 de Argentina y Chile, reveló la presencia de un único perfil de ITS-PCR conteniendo 3 regiones ITS verdaderas que indicaban la existencia de 3 tipos de operones ribosómicos (*rrn*) (Dingman, 2012), por lo que este análisis no sería una herramienta útil para revelar la diversidad poblacional en esta especie.

2. Objetivos específicos

- 2.1.** Confirmar mediante la secuencia de 16S rDNA la identidad de las cepas de *P. larvae* establecida en base a caracteres morfológicos y fisiológicos.
- 2.2.** Examinar la diversidad de las poblaciones de *P. larvae* mediante la técnica de rep-PCR empleando cebadores BOX A, REP y ERIC.
- 2.3.** Examinar la diversidad entre *P. larvae* y otras especies esporuladas presentes en las colmenas mediante la técnica de PCR-RFLP.

3. Materiales y Métodos

3.1. Obtención de ADN genómico total mediante extracción con fenol-cloroformo-isoamílico

El ADN genómico total se extrajo de acuerdo con la técnica descrita por Meade y col. (1982) modificada para bacterias Gram (+) (Alippi & Aguilar, 1998a) que se detalla a continuación:

Se emplearon cultivos de 48-72 h en el caso de *P. larvae* - y de 24 h cuando se trabajó con otras especies esporuladas- desarrolladas en medio MYPGP sólido. Se tomaron colonias bacterianas de toda la placa en el caso de *P. larvae* y 1-2 en el caso de las otras especies y se suspendieron en un microtubo de polipropileno (Tipo *Eppendorf*) conteniendo 600 µl de NaCl 1 M y se homogeneizaron por agitación en *vortex*. Posteriormente se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 4 minutos, eliminando el sobrenadante y lavando el *pellet* bacteriano con 700 µl de TES. Se homogeneizó la mezcla por agitación en *vortex* hasta resuspender totalmente el sedimento y se centrifugó durante 2 min a 14.000 r.p.m. A continuación se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 500 µl de TE (pH 8), se añadió 0,01 g de lisozima (Sigma®) homogeneizando suavemente y se incubó a 37 °C durante 30 minutos y, posteriormente a 60 °C en baño seco durante 15 minutos. Las muestras se llevaron a temperatura ambiente y se agregó 100 µl de sarcosyl pronasa por tubo mezclando suavemente por inversión y se incubó a 37 °C durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, se efectuó una extracción con 600 µl de fenol saturado homogeneizando primero en *vortex* y luego centrifugando a 14.000 r.p.m. durante 10 minutos. El sobrenadante se trasvasó a otro *Eppendorf* estéril y se centrifugó nuevamente 14.000 r.p.m. durante 6-8 minutos. Al sobrenadante de cada centrifugación se le efectuaron 2 extracciones

más pero esta vez con 300 µl de cloroformo-isoamílico. Se evaluó que no quedaran restos de fenol. En los casos en que se observó mucha interfase (color blanco) se tomó el sobrenadante de la primera extracción y al resto se le agregó 100 µl de TE, se agitó y centrifugó para recuperar ese sobrenadante.

El ADN se recuperó por precipitación en frío mediante el agregado de acetato de amonio hasta una concentración final de 0,3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. El tubo se golpeó con el dedo y se observó la aparición de la hebra de ADN. Luego se eliminó el etanol con micropipeta de forma que el ADN quede pegado a las paredes del tubo Eppendorf y se lo dejó secar para eliminar el alcohol residual. Se marcó el ADN con una fibra para reconocerlo al secarse y se lavó con 100 µl de etanol 70°, centrifugando y eliminando el alcohol 3 veces consecutivas. Finalmente el ADN se resuspendió en 100 µl de buffer TE pH 8,0 y se mantuvo en un baño seco a 42 °C 15 min, verificando que se resuspendiera totalmente. La concentración de ADN se determinó empleando un fluorómetro (Hoefler TKO 100) y las muestras se guardaron a -20 °C.

Preparación de las soluciones:

NaCl 1M:

Para preparar 100 ml pesar 5,8 g de NaCl y disolverlo en H₂O, esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min

EDTA (Ácido etilén diamino tetra-acético):

EDTA - 0,5 M (500 mM) pH 8,0 – Pesar 186,1 g de EDTA.2.H₂O y disolver en 800 ml de H₂O. Agitar vigorosamente en agitador magnético. Ajustar a pH 8.0 con NaOH (aproximadamente 20 g para ese volumen). Dispensar en alícuotas y esterilizar en autoclave durante 30 min. Precaución: la sal disódica de EDTA SOLO se solubilizará a pH 8,0. Para obtener 50 mM diluir 10 veces (ej. 1 ml de sol. 500 mM en 9 ml H₂O destilada).

Tris 1M:

Disolver 121 g de Tris en 800 ml de agua bidestilada. Ajustar al pH requerido con HCl. Para ajustar a pH 8,0 adicionar 42 ml de HCl concentrado. Para pH 7,5 adicionar 70 ml de HCl concentrado. Llevar a vf de 1.000 ml con agua bidestilada y esterilizar en autoclave durante 30 min. Almacenar a 4°C.

Tris 10 mM:

Añadir 5 ml de la sol. stock de Tris base 1 M a 490 ml de agua bidestilada. Ajustar el pH a 7,4 con unas gotas de HCl y llevar a vf de 500 ml con agua bidestilada. Esterilizar en autoclave durante 30 min y almacenar a 4°C.

TE (Tris EDTA):

10 mM tris + 10 mM EDTA

Tomar 495 ml de la sol. stock de buffer Tris 10 mM y añadir 1 ml de la sol. stock de EDTA 0,5 M. Ajustar el pH a 8,0 con unas gotas de HCl y llevar a vf de 500 ml con agua bidestilada. Esterilizar en autoclave durante 30 min y almacenar a 4°C.

TES (Tris EDTA ClNa):

10 mM tris pH 8,0 + 10 mM EDTA + 150 mM NaCl

TE + 1,75 g de NaCl para vf de 200 ml

Sarcosyl pronasa (10% de sarcosyl – 5 mg/ml de pronasa en buffer TE)

Sol. A: Disolver 2 g de sarcosyl en 10 ml de buffer TE

Sol. B: Disolver 100 mg de pronasa en 10 ml de H₂O bidestilada estéril e incubar a 37 °C durante 1 h para activarla.

Mezclar volúmenes iguales de A + B y conservar a -20 °C.

Acetato de amonio 10 M:

Pesar 77 g de acetato de amonio y agregar H₂O d.c.s.p. para 100 ml. Esterilizar por filtración.

Fenol saturado pH 8,0:

En un Erlenmeyer fundir 500 g de fenol a BM (no mayor a 68 °C) hasta que esté en fase líquida y agregar 500 ml de Tris 1 M (pH 8,0). Agitar vigorosamente la emulsión durante 30 min y extraer en ampolla de decantación eliminando la fase superior y se agrega nuevamente 500 ml de Tris 0,5 M (pH 8,0) agitando 30 min más hasta alcanzar un pH=8,0 en la fase fenólica. Se deja decantar y se elimina el sobrenadante. La fase fenólica se pasa a un frasco de color ámbar y se agrega 0,5 g de 8-hidroxiquinolina (concentración final del 0,1%). Se mantiene al abrigo de la luz a 4 °C. Todo el trabajo se realiza bajo campana de gases.

Solución de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1):

La solución se prepara en una botella estéril y en campana de gases.

Para preparar 250 ml mezclar 240 ml de cloroformo con 10 ml de alcohol isoamílico en un frasco estéril y agitar vigorosamente. Cubrir con papel aluminio y mantener al abrigo de la luz a 4 °C.

3.2. Obtención de ADN genómico total por extracción directa a partir de colonias bacterianas

Como alternativa para la obtención de ADN molde en la reacción PCR, se evaluó la posibilidad de emplear un protocolo rápido para la extracción directa de ADN a partir de colonias bacterianas, el cual se detalla a continuación:

Se tomaron 1-2 colonias bacterianas mediante ansas plásticas descartables de 1 µl y se colocaron dentro de un tubo *Eppendorf* (0,5 ml) conteniendo 300 µl de agua bidestilada estéril. Las muestras se homogeneizaron en *vortex* durante 1 min y se centrifugaron a 10.000 X g (equivalente a 14.000 r.p.m. en centrífuga *Eppendorf* microfuga) durante 4 minutos. Se descartó el sobrenadante y al *pellet* bacteriano se le agregó 150 µl de una resina de intercambio iónico (Chelex 100[®], BioRad) preparada en agua bidestilada estéril al 6% y mantenida en agitación constante. La muestra se calentó a 56 °C durante 15 minutos en baño seco, al cabo de los cuales se mezcló en *vortex* durante 30 s y se llevó a 99 °C durante 15 min para luego mezclar en *vortex* en caliente durante 1 min. Las células bacterianas y resina se precipitaron por centrifugación y el sobrenadante se empleó en el momento como molde de la reacción PCR. Las resinas sobrantes se conservaron a -20 °C.

Preparación del stock de resina Chelex100 (6% p/v)

En un frasco tapa a rosca apto para autoclave se colocaron 50 ml de agua bidestilada y un buzo magnético de agitación y se esterilizó a 121 °C durante 15 min. Una vez frío se le incorporó 3 g de resina Chelex 100 agitando en agitador magnético. El stock se guardó en heladera a 4 °C y se mantuvo en agitación constante en el momento de su uso.

3.3. Condiciones generales de PCR y electroforesis

Todas las amplificaciones realizadas durante esta tesis fueron efectuadas en alguno de los siguientes termocicladores: Biometra UNO Thermoblock o Eppendorf Mastercycle Personal. Las condiciones de PCR fueron variables de acuerdo con los *primers* utilizados.

La agarosa es un polímero lineal, que al fundirlo y dejarlo solidificar nuevamente, forma una matriz cuyo diámetro de poro depende de la concentración de agarosa. Al aplicar una corriente eléctrica al gel, los ácidos nucleicos migran al ánodo y se separan por tamaño. El tamaño de separación es inversamente proporcional a la concentración de agarosa empleada en el gel, es decir que si deseamos visualizar fragmentos más grandes se debe preparar una concentración menor y viceversa. El tamaño y la cantidad relativa de ácidos nucleicos se determina por tinción con bromuro de etidio o GelRed y examen del gel bajo luz UV. Los geles para electroforesis horizontal se prepararon a la concentración deseada de agarosa en 100 ml de *buffer* TBE 0,5X y se calentaron en microondas hasta su disolución. Luego de enfriar a 45-50 °C, se agregó bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml (SM stock de 10 mg/ml). En algunos casos se usó el colorante GelRed™ (Biotium, Inc.) empleando una mezcla de gel loading buffer 6 X (Inbio Highway) con una gota de GelRed por fosa de siembra en reemplazo del bromuro de etidio. Todos los geles fueron preparados en cubas de electroforesis de 7 X 10 cm; 8 X 25 cm; 10 X 15 cm o 18 X 25 cm (BIO-RAD, Argentina) y las fuentes de poder fueron PowerPac Basic (BIO-RAD, Argentina). El perfil de bandas obtenido fue fotodocumentado con una cámara digital Olympus (Camedia master 2.5) bajo iluminación ultravioleta (260 nm) utilizando un transiluminador (UPV) y el programa de adquisición de imágenes Digi Doc- it para la captura de las imágenes. Como patrones de peso molecular se emplearon *cien marker* [100 pb -1.000 pb] (Biodynamics); *mil marker* [500 pb-10.500 pb] (Biodynamics); 100 pb DNA Ladder [100 pb- 1.500 pb] (Promega); λ/*Hind*III [564 pb- 23.130 pb] (Thermo Scientific); λ/*Eco*RI [3.530 pb-21.226 pb] (Thermo Scientific); λ/*Eco*RI-*Hind*III [564 pb-21.226 pb] (Thermo Scientific); o pUC19-*Sau*IIIA (Stratagene) a razón de 2- 5 µl por fosa de siembra.

Preparación de las soluciones:

Preparación del colorante de siembra: Azul de bromofenol 0,25% p/v en H₂O + xilen-cianol 0,25% p/v + ficoll 15% p/v (o glicerol al 30%). Guardar a 4 °C.

Buffer TBE (Tris 89 mM, EDTANa₂ 2,5 mM; BO₃H₃ 89 mM, pH 8,2): Para 5X = 54 g Tris base, 27,5 g ac. bórico, 20 ml de EDTA (pH 8.0), agua destilada c.s.p. 1000 ml. Para 0,5 X = diluir 1:10 en agua destilada.

3.4. Amplificación de un fragmento de 973 pb del gen 16S ADNr

Para confirmar la identidad de las cepas de *P. larvae* estudiadas, se emplearon los *primers* específicos PI1/PI2 diseñados por Govan y col. (1999) que amplifican un fragmento específica del gen 16 S ADNr.

Las mezclas de reacción se prepararon en un vf de 25 μ l, conteniendo 2 μ l del sobrenadante de las preparaciones con resina, buffer de polimerasa Promega (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9,0 y Triton X-100), 25 mM de cada dNTP, 2 mM MgCl₂, 50 pmol/ μ l de cada cebador y 1 U de *Taq* polimerasa (Govan *et al.*, 1999).

Las secuencias de los cebadores y las condiciones de amplificación utilizadas (para el cicladador Eppendorf) se detallan a continuación:

PI1 5' AAGTCGAGCGGACCTTGTGTTTC 3'
PI2 5' GTCTATCTCAAACCGGTCAGAGG 3'

▪ Desnaturalización inicial	95 °C	7 min	} 30 ciclos
▪ Desnaturalización	93 °C	1 min	
▪ <i>Annealing</i>	55 °C	30 s	
▪ Extensión	72 °C	1 min	
▪ Extensión final	72 °C	5 min	

3.5. Obtención de perfiles de *fingerprints* de ADN mediante la amplificación genómica por rep-PCR con primers BOX, ERIC y REP

Las reacciones de rep-PCR se llevaron a cabo en un vf de 25 μ l, conteniendo 2,5 μ M de *primer* BOXA1R o 2 μ M para los *primers* ERIC (ERIC 1R y ERIC2) y REP (REP 1R y REP 2-1), respectivamente; buffer de polimerasa Promega (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9,0 y 0,1 % de Triton X-100); mezcla de desoxirribonucleótidos (dGTP, dTTP, dATP, dCTP) cada uno a una concentración de 2 mM; 3 mM de MgCl₂ y 1 U de *Taq* polimerasa (Promega). Como molde de ADN se empleó 10 μ l del sobrenadante de la preparación de resina según lo explicado en la sección 3.2 o 10 ng de ADN en el caso de la extracción con fenol-cloroformo-isoamílico (Sección 3.1).

A continuación se detallan las secuencias de los cebadores y las condiciones de amplificación (Louws *et al.*, 1994; Versalovic *et al.*, 1994). Cuando se empleó el ciclador

Biometra Uno, los tubos se cubrieron con una gota de aceite mineral.

BOXA1R 5' CTA CGG CAA GGC GAC GCT GACG 3'

▪ Desnaturalización inicial	95 °C	7 min	} 35 ciclos
▪ Desnaturalización	94 °C	1 min	
▪ <i>Annealing</i>	53 °C	1 min	
▪ Extensión	65 °C	8 min	
▪ Extensión final	65 °C	16 min	

Cuando se empleó el ciclador Eppendorf, se cambió la temperatura de extensión a 72 °C durante 2,5 min, se usaron 40 ciclos y la extensión final fue de 72 °C durante 10 min.

ERIC 1R 5' ATGTAA GCTCCTGGGGATTAC 3'

ERIC 2 5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3'

▪ Desnaturalización inicial	95 °C	7 min	} 35 ciclos
▪ Desnaturalización	94 °C	1 min	
▪ <i>Annealing</i>	52 °C	1 min	
▪ Extensión	65 °C	8 min	
▪ Extensión final	65 °C	16 min	

Cuando se empleó el ciclador Eppendorf, se cambió la temperatura de *annealing* a 50,2 °C y la de extensión a 72 °C y se usaron 40 ciclos y la extensión final fue de 72 °C durante 10 min.

REP 1R 5' IIIICGICGICATCIGGC 3'

REP 2-I 5' ICGICTTTATCIGGCCTAC 3'

▪ Desnaturalización inicial	95 °C	7 min	} 35 ciclos
▪ Desnaturalización	94 °C	1 min	
▪ <i>Annealing</i>	40 °C	1 min	
▪ Extensión	65 °C	8 min	
▪ Extensión final	65 °C	16 min	

Cuando se empleó el ciclador Eppendorf, se cambió la temperatura de *annealing* a 34 °C y la de extensión a 72 °C durante 2,5 min y se usaron 40 ciclos y la extensión final fue de 72 °C 10 min.

Los amplicones generados en la reacción se resolvieron por una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,6 % en buffer TBE 0,5 X a 80 V y 2 h de corrida. Se sembró una alícuota de 5 µl del producto de PCR obtenido. Los *fingerprints* generados se observaron exponiendo los geles de agarosa bajo luz UV, previa tinción del gel con bromuro de etidio, y se

compararon en forma visual. Las fotografías de los geles se digitalizaron y analizaron con el programa GelCompar (Applied Math, Korojic, Bélgica) empleando el algoritmo de agrupación UPGMA.

3.6. Análisis por RFLP de un fragmento del gen 16S ADNr amplificado por PCR para la diferenciación de *Paenibacillus larvae* y otras bacterias esporuladas

Se utilizaron los cebadores U1/U2 descritos por Ash y col. (1993) con los que se amplificó el fragmento de ADN 16S rADN. Estos cebadores se diseñaron sobre la base de regiones conservadas y amplifican un fragmento de alrededor de 1.100 pb que corresponde a la secuencia parcial del gen 16S rADN de especies de *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Virgibacillus*, *Lysinibacillus* y otros géneros de bacterias esporuladas Gram (+) estrechamente relacionados.

Las mezclas de reacción se prepararon en un vf de 25 µl, conteniendo 1,5 µl de la mezcla de desoxirribonucleótidos (dGTP, dTTP, dATP, dCTP) cada uno a una concentración de 2 mM, 1,25 µl de la mezcla de los dos cebadores (10 mM cada uno), 1,5 µl de buffer de polimerasa (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9,0 y 0,1 % de Triton X-100) (Promega), 1 µl de Mg₂Cl (25 µM) y 5 µl del sobrenadante de la preparación con resina (Apartado 3.2). La mezcla de reacción se pre-calentó a 94 °C antes de del agregado de 1 U de *Taq* polimerasa (Promega).

A continuación se detallan las secuencias de los cebadores y las condiciones de amplificación (Ash *et al*, 1993), empleando el termociclador Biometra Uno y cubriendo los tubos con una gota de aceite mineral.

U1 5´-CGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT- 3´

U2 5´-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA- 3´

▪ Desnaturalización inicial	94 °C	3 min	} 25 ciclos
▪ Desnaturalización	92 °C	1 min	
▪ Annealing	50 °C	1 min	
▪ Extensión	72 °C	5 min	
▪ Extensión final	72 °C	5 min	

El ADN amplificado fue analizado por una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0,8 % en buffer TBE 0,5 X sembrando una alícuota de 5 µl del producto de PCR obtenido.

Los fragmentos de 1,1 kB, se incubaron con las siguientes endonucleasas: *Alu I*, *Msp I*, *Hae III*, *Hinf I*, *Cfo I*, *Rsa I* y *Taq I* (Promega) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las mezclas de digestión se incubaron a 37° C toda la noche, excepto en el caso de la enzima *Taq I* cuya temperatura de incubación fue de 65 °C. Luego de la incubación, los patrones de RFLP obtenidos se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 2% en buffer TBE 5 X a 80 V durante 2 h y 30 min. Al finalizar la corrida el gel se tiñó con bromuro de etidio y se observaron las bandas de ADN fluorescentes cuando el gel se expuso a la luz UV. Los geles se fotodocumentaron digitalmente empleando el programa Digi Doc- it y se analizaron mediante el programa GelCompar empleando la opción "combined gels".

4. Resultados y Discusión

4.1. Obtención de ADN genómico total de *Paenibacillus larvae* y otras especies esporuladas

Cuando se empleó la técnica de extracción de ADN genómico total de cepas de *P. larvae* mediante extracción con fenol-cloroformo-isoamílico, el ADN obtenido debió usarse inmediatamente después de la extracción ya que observamos que al mantenerlo refrigerado al cabo de una semana no se obtenía amplificación alguna. Esto no ocurrió en el caso de las restantes especies de los géneros *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus* *Lysinibacillus* y *Virgibacillus*. Djordjevic y col. (1994) describieron una situación similar cuando analizaron por RFLP diversas cepas de *P. larvae* provenientes de cultivos en SBA. Cuando se usó el kit comercial *Wizard genomic DNA Purification kit* (Promega) de acuerdo con las especificaciones del fabricante para bacterias Gram (+), las preparaciones de ADN de *P. larvae* pudieron mantenerse durante más tiempo refrigeradas sin que este se degradara. La causa de la falla en la amplificación del ADN luego de cierto período de almacenamiento en el caso de *P. larvae*, probablemente se deba a una oxidación del ADN.

Con respecto a la técnica de extracción directa de ADN a partir de colonias bacterianas, la misma resultó efectiva, reproducible y considerablemente más rápida con respecto al resto de las técnicas ensayadas demostrando su utilidad para el análisis simultáneo de un gran número de muestras bacterianas, tanto en el caso de *P. larvae* como para el resto de las especies esporuladas Gram (+) presentes en los apiarios.

4.2. Amplificación de un fragmento de 973 pb del gen 16S rDNA

Se procedió a amplificar por PCR un fragmento de 973 pb que contiene la secuencia parcial del gen 16S rDNA de *P. larvae*, empleando los cebadores específicos diseñados por Govan y col. (1999) y el ADN molde de todas las cepas de *P. larvae* de la colección.

En todos estos casos resultó en la amplificación del fragmento esperado (Figura 39). Cuando el ADN molde provino de las otras especies de *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus* y *Virgibacillus* (90 cepas de 27 especies diferentes de *Paenibacillus*, 218 cepas de 9 especies de *Bacillus*, 7 aislamientos de *Brevibacillus laterosporus*, 5 cepas de *Lysinibacillus sphaericus* y 1 de *Virgibacillus panthotenticus*, no hubo amplificación alguna con excepción de las cepas de *P. larvae* pertenecientes al ex grupo *pulvifaciens*.

Esto permite concluir que la prueba discrimina a nivel específico dado que todas las cepas de *P. larvae* de nuestra colección amplificaron en dicha región, mientras que ninguno de los otros géneros y/o especies probadas mostraron producto de amplificación alguno.

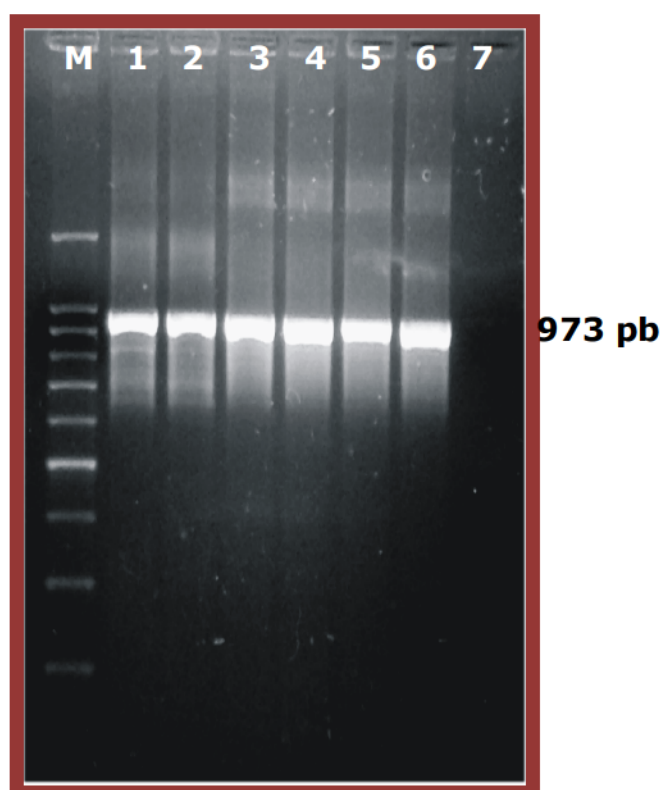


Figura 39: Producto de amplificación del gen 16S rDNA con los *primers* PI1 y PI2. Se muestran los productos de PCR separados en un gel de agarosa al 1,5%. El marcador de peso molecular (M) es 100 pb DNA Ladder (Promega). Los números de calles corresponden a las siguientes cepas de *P. larvae*: 1: PL3; 2: PL49; 3: PL63; 4: PL ATCC 9546; 5: PL ATCC 13537 (ex *pulvifaciens*); 6: PL CCM38 (ex *pulvifaciens*) 7: Blanco H₂O

4.3. Perfiles de rep-PCR *fingerprints*

4.3.1. Perfiles obtenidos con los cebadores BOX y REP

El análisis por rep-PCR de la colección de aislamientos de *P. larvae* empleando los cebadores BOX y REP mostró 4 perfiles de *fingerprints* a los cuales denominamos A, B, C y D (Figura 40 y Tabla 6). Con respecto al ex grupo *pulvificiens*, todas las cepas estudiadas provenientes de Colecciones Internacionales (n=5) (correspondientes al 1% del total) mostraron un perfil distintivo al cual denominamos E (Figura 40 y Tabla 7). Cada uno de estos perfiles genotípicos consistió en un número variable de bandas: El cebador BOX generó entre 9 y 11 amplicones con tamaños que oscilaron entre 200 pb y 2.100 pb. En el caso de las amplificaciones generadas por el cebador REP, estas generaron productos de amplificación de entre 12 y 15 bandas con tamaños que oscilaron entre 150 a 2.100 pb (Figura 43).

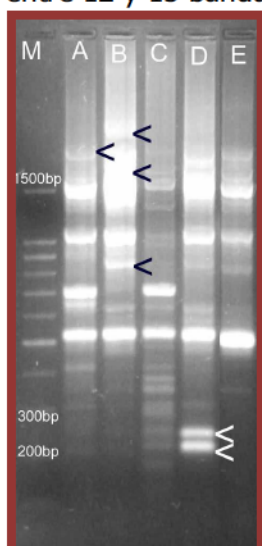
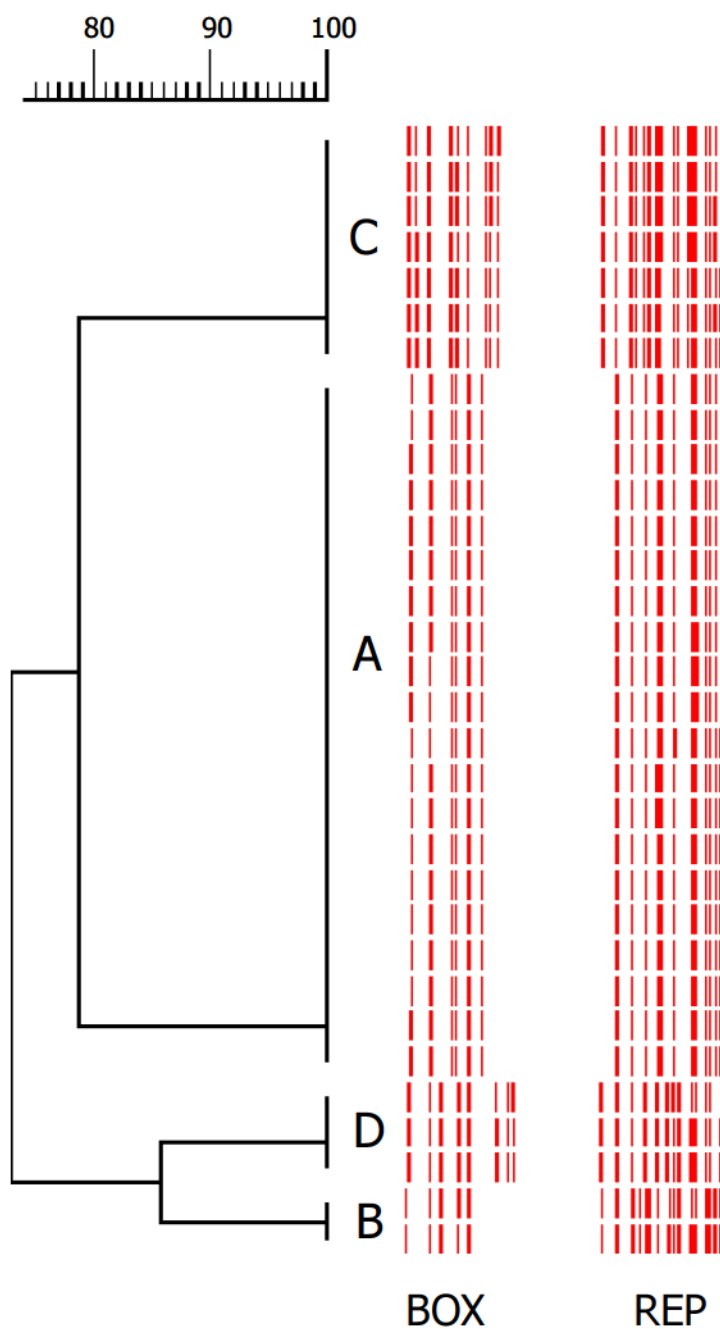


Figura 40: *Fingerprints* diferenciales obtenidos por BOX-PCR en la colección de aislamientos de *P. larvae* analizados. Las puntas de flecha indican las diferencias en las bandas. El marcador de peso molecular M utilizado fue 100 pb ladder, Biodynamics y la concentración de agarosa del 1,6%. El perfil E corresponde al ex grupo *pulvificiens* (cepa NRRL B-14154)

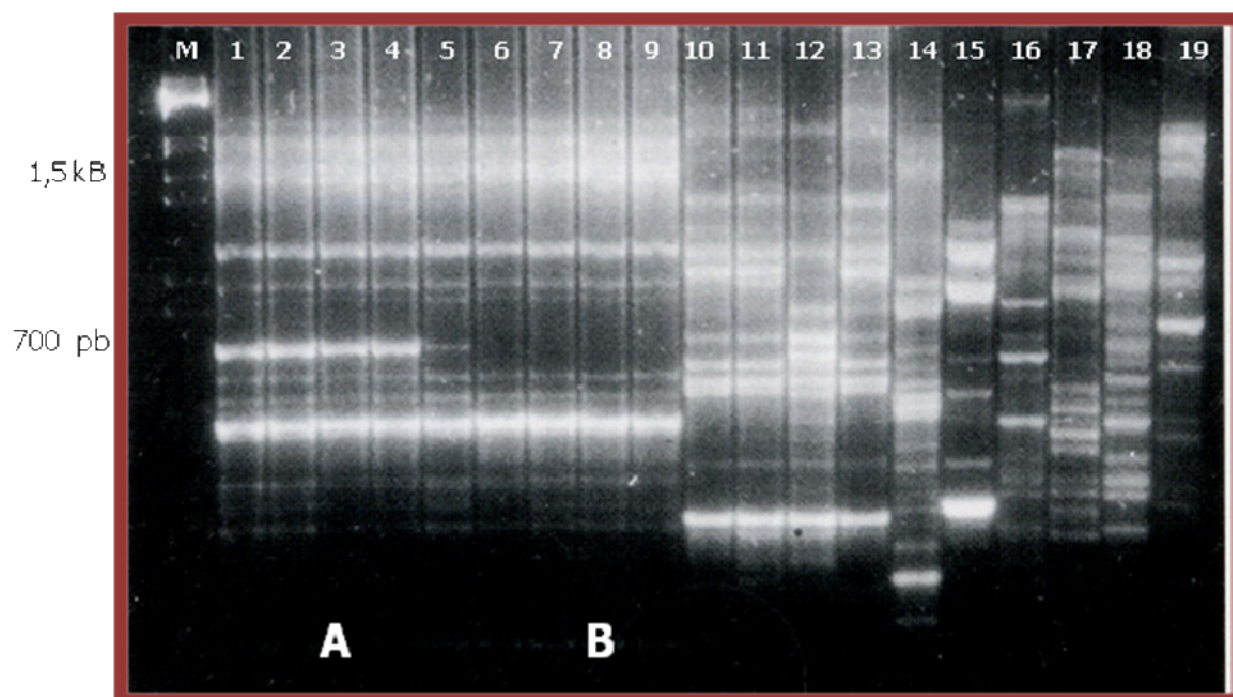
Empleando tanto los cebadores BOX como REP, de un total de 404 cepas analizadas de distintos orígenes geográficos, el 78 % (n=315) resultaron perfil A, el 13% (n=52) B, el 5% (n=22) C y el 4% (n=15) D (Tabla 6) con cada uno de los cebadores. Se construyó una matriz de agrupamiento con la cual se generó un dendrograma de similitud que incluyó cepas seleccionadas de *P. larvae* según los resultados de los *fingerprints* obtenidos por rep-PCR y primers BOX y REP empleando la opción *combined gels* del programa Gelcompar. Con la matriz de agrupamiento UPGMA y el coeficiente de correlación DICE (con una tolerancia del 3%), resultó en un dendrograma con 4 grupos (A, B, C y D) a niveles del 100% de similitud en cada uno de ellos (Figura 41). Mientras que los *clusters* B y D se agruparon entre sí a un nivel de similitud del 86%, los *clusters* A y C se agruparon a un nivel del 78%, y los 4 grupos juntos al nivel del 72%, revelando una mayor relación entre los genotipos A con C y B con D, respectivamente.

Figura 41: Dendrograma de similitud genotípica de cepas representativas de *P. larvae* de distintos orígenes geográficos según los resultados de los *fingerprints* obtenidos por rep-PCR y primers BOX y REP. El análisis se efectuó mediante la opción *combined gels* del programa Gelcompar empleando una matriz de agrupamiento UPGMA y el coeficiente de correlación DICE con un porcentaje de tolerancia del 3%. A, B, C y D indican los distintos perfiles observados en la población analizada.



Los resultados obtenidos por rep-PCR revelaron una alta homeogeneidad genética en las cepas de *P. larvae* de distintos orígenes geográficos. Ciertamente, con los cebadores BOX fue posible diferenciar muy claramente las cepas de *P. larvae* del resto de las especies esporuladas comúnmente presentes en los apiarios (Figura 42). Una situación similar fue observada por Louws y col. (1998) en cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* patógenas de tomate. Estos autores sólo hallaron 4 patrones por rep-PCR empleando los cebadores BOX y llegaron a la conclusión que las diferencias entre cepas pertenecientes a la misma subespecie presentaban patrones de rep-PCR *fingerprints* idénticos o casi idénticos entre si por lo que postularon que mediante BOX-PCR se podía diferenciar a la subespecie *michiganensis* de otras subespecies de *Clavibacter michiganensis* patógenas de otros hospedantes distintos al tomate (Louws *et al.*, 1998).

Figura 42: Patrones de *fingerprints* más frecuentes obtenidos por BOX-PCR de distintas especies de *Paenibacillus*, *Bacillus* y *Brevibacillus* spp. separados en un gel de agarosa al 1,5%. El marcador de peso molecular (M) es λ / *EcoRI-HindIII*. Líneas 1-9 cepas de *Paenibacillus larvae*: 1: PL13, 2 PL61, 3: PL33, 4: PL28, 5: PL89, 6: PL43, 7: PL58, 8: PL69 y 9: PL21; líneas 10-13: Cepas de *Paenibacillus alvei*: 10: m44, 11: PM2, 12: BA159, 13: LP1; líneas siguientes: 14: *Paenibacillus apiarius* ATCC 29575; 15: *Brevibacillus laterosporus* BLA 169; 16: *Bacillus pumilus* ATCC7061; 17: *Bacillus licheniformis* NRRLB-100; 18: *Bacillus cereus* ATCC11778; 19: *Bacillus subtilis* NRRLB-543.



Las diferencias entre los 4 perfiles obtenidos tanto con los cebadores BOX como con los

REP en los aislamientos de *P. larvae* están marcadas con puntas de flecha en las Figuras 40 y 43, y consistieron en una banda de 700 pb presente en el A y en el C y ausente en el B y el D y 2 bandas de 200 y 250 pb claramente visibles sólo en el genotipo D. Si bien muy similares, los genotipos A y C se diferenciaban por una banda de 1.300 pb presente en el A y ausente en el C. Cuando se amplificaron las cepas del ex grupo *pulvificiens* provenientes de colecciones internacionales, todas mostraron un perfil similar al D pero que no mostraban las bandas pequeñas de 200 y 250 pb, dicho perfil se denominó E (Figura 40). Estas diferencias que se mantuvieron al emplear los cebadores REP se visualizaban en forma clara cuando se emplearon los cebadores BOX (Figura 43).

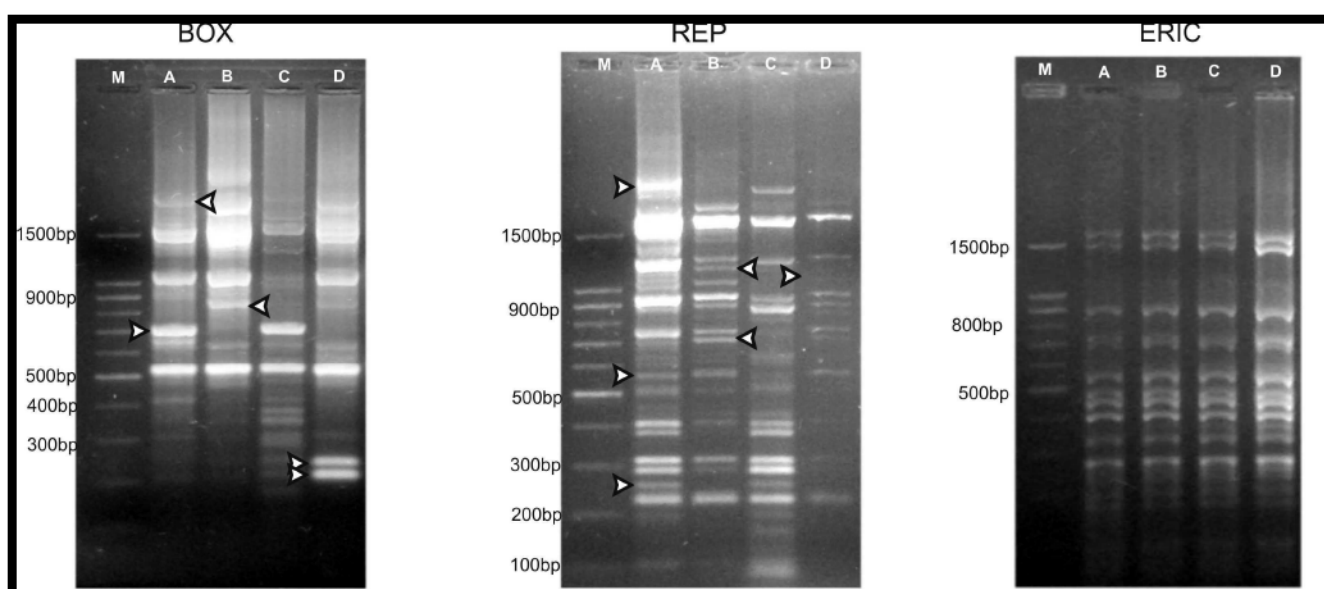


Figura 43: Perfiles representativos de rep-fingerprints empleando los cebadores BOX, REP y ERIC, respectivamente de los 4 genotipos de *Paenibacillus larvae* presentes en la Argentina (A, B, C y D). El marcador de peso molecular M utilizado fue 100 pb ladder, Biodynamics y la concentración de agarosa es del 1,6%. Cuando se emplearon los cebadores BOX y REP se encontraron diferencias entre los perfiles (marcadas con puntas de flecha), las cuales no se observaron cuando se emplearon los cebadores ERIC. Estos 4 perfiles de BOX y REP se corresponden con un único perfil ERIC I (Tabla 6).

4.3.2. Perfiles obtenidos con los cebadores ERIC

Cuando se emplearon los cebadores ERIC, con excepción de algunas de las cepas provenientes de Colecciones internacionales, todos los aislamientos obtenidos presentaron un único perfil consistente en 14 bandas en un rango de 100 pb y 2.000 pb (Figura 44) y que fue similar al perfil ERIC-I descrito para *P. larvae* por Genersch y col. (Genersch, 2010; Genersch & Otten, 2003; Genersch *et al.*, 2006; Peters *et al.*, 2006). Las amplificaciones con ADN

genómico de las estirpes enviadas de la Colección del SAG (Servicio Agrícola Ganadero de Chile) (n=5) presentaron un perfil diferente que se identificó como perfil ERIC-II (Figura 45), similar al descrito por Genersch y col. (Genersch, 2010; Genersch & Otten, 2003; Genersch *et al.*, 2006; Peters *et al.*, 2006). Este perfil se diferencia por presentar una banda de 2.800 pb (Figura 45). Las 5 cepas con perfil ERIC-II analizadas en esta tesis eran coincidentes con el perfil BOX-B (Tabla 6) y también poseían colonias pigmentadas de color entre anaranjado y rojo en medio MYPGP y en agar Columbia suplementado con sangre ovina como se describió en el Capítulo II. Estas cepas nos fueron remitidas por el SAG para su diagnóstico, pero se desconoce el país de origen de las mismas ya que fueron aisladas de mieles de importación provenientes de la UE. Las 5 cepas del grupo ex *pulvificiens* analizadas en esta tesis presentaron un perfil ERIC-IV (Tabla 7) que coincide con el descrito por Genersch y col. (Genersch *et al.*, 2006), quienes a su vez describen un cuarto perfil (ERIC-III) el cual no fue encontrado en los aislamientos analizados aquí.

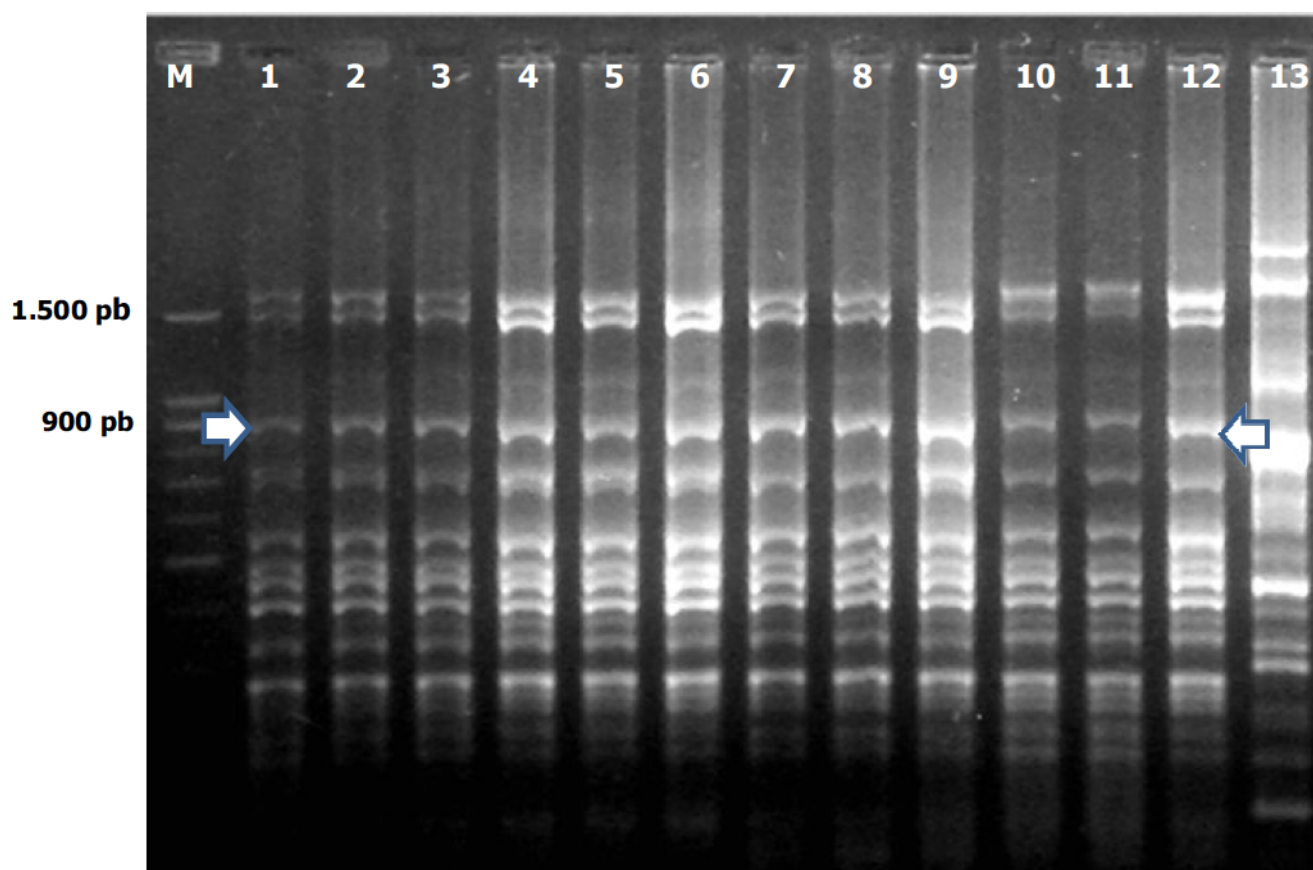


Figura 44: *Fingerprints* por ERIC-PCR de cepas de *P. larvae* resueltos en un gel de agarosa de 1,6%. M: marcador de peso molecular 100 pb ladder, Biodynamics; 1: PL ATCC25747 (PL104); 2: PL NRRL B-3555 (PL103); 3:PL90; 4:PL91; 5:PL250; 6:PL251; 7:PL49; 8:PL181; 9:PL200; 10:PL213; 11:PL184; 12: PL225 y 13: PL NRRL B-14154 (ex *pulvificiens*). Las flechas marcan la banda de 970 pb presente en el grupo *larvae* [perfil ERIC I (líneas 1 a 12)] y ausente en el ex *pulvificiens*, cepa NRRL B-14154 [(perfil ERIC IV) (línea 13)].

La principales diferencias entre los perfiles obtenidos por ERIC-PCR consisten en una banda de 970 pb presente en los genotipos ERIC-I y ERIC-II y ausente en el ERIC-IV (Figuras 44 y 45). Adicionalmente, el perfil ERIC-II posee una banda migrando en las 2.800 pb que no poseen los dos restantes (Figura 45).

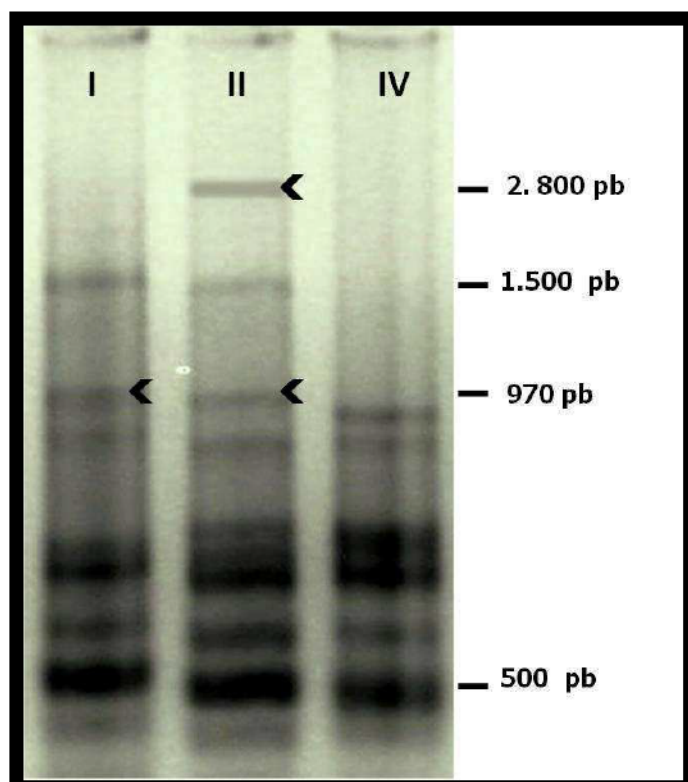


Figura 45: Fingerprints diferenciales por ERIC-PCR de cepas de *P. larvae* resueltos en un gel de agarosa al 0,9 %. Perfil I: PL 58, Perfil II: PL SAG10230 y Perfil IV: NRRL B-14154 (grupo ex *pulvifaciens*).

Genersch y col. (2006) también efectuaron una correlación entre los 4 genotipos obtenidos por ERIC-PCR y la pigmentación de las colonias de *P. larvae*, hallando que los genotipos ERIC-II y ERIC-III poseían colonias pigmentadas de color anaranjado a rojizo y los genotipos ERIC- I y ERIC-IV presentaban colonias de color blanco-grisáceo. De acuerdo con nuestros resultados, el genotipo ERIC-II presentó colonias pigmentadas y el ERIC-I colonias blanco-grisáceas, pero los resultados obtenidos para el grupo ex *pulvifaciens* discreparon con los de Genersch y col. (2006) ya que dentro del genotipo ERIC-IV hubo 4 cepas pigmentadas

(ATCC 13537, ATCC 25367, ATCC 25368 y NRRRL B-1454) y una no pigmentada (CCM38). Estas discrepancias pueden deberse a que la pigmentación de este grupo de cepas puede perderse luego de sucesivos sub-cultivos (Katznelson, 1950) ya que todos los aislamientos originales eran pigmentados.

Es probable que la clasificación del genotipo ERIC-II no haya sido correcta e incluso ignorado por muchos investigadores porque fenotípicamente no se corresponde con las colonias típicas de *P. larvae* que cita la bibliografía tradicional. Asimismo, también es factible que en muchos laboratorios haya sido descartado inadvertidamente al analizar mieles ya que para activar la germinación de las esporas de *P. larvae* se recomienda efectuar un shock térmico de 80 °C para eliminar las formas vegetativas de bacterias y hongos y activar la germinación de las esporas. Ha sido demostrado que las esporas de las bacterias con genotipo ERIC-II son muy sensibles al efecto del calor (Forsgren *et al.*, 2008). Según estos autores, las esporas de las cepas que se caracterizan por presentar el genotipo ERIC-I se activan y germinan predominantemente a temperaturas de 90 °C mientras que, contrariamente, aquéllas que se agrupan por tener el genotipo ERIC-II, pueden inactivarse completamente a temperaturas de 80 °C o más que es la habitual para el aislamiento de muestras conteniendo esporas de *P. larvae*. Si bien en este trabajo no se encontró ningún representante del genotipo ERIC-II, el mismo pudo haber pasado inadvertido en el análisis de mieles debido a la alta contaminación de las mismas con otras especies esporuladas Gram (+) que hizo imprescindible someter a las muestras a un shock térmico previo al aislamiento en medios semi-selectivos. No obstante, en los aislamientos a partir de larvas afectadas únicamente se encontró el genotipo ERIC-I ya que en este tipo de aislamientos el desarrollo de *P. alvei* es inhibido sólo con el agregado de ácido nalidíxico al medio de cultivo sin necesidad de efectuar un calentamiento a temperaturas de 80 °C o mayores.

Tabla 6: Perfiles de *fingerprints* de las cepas de *P. larvae* obtenidos por rep-PCR con los cebadores BOX, REP y ERIC.

CEPA	ORIGEN	BOX	REP	ERIC
PL 1	Argentina, Zárate, Bs. As.	A	A	I
PL 2	Argentina, Lobos, Bs. As.	A	A	I
PL 3	Argentina, Concordia, E. Ríos.	A	A	I
PL 4	Argentina, Punta Alta, Bs. As.	A	A	I
PL 5	Argentina, La Plata, Bs. As.	A	A	I
PL 6	Argentina, Lincoln, Bs. As.	A	A	I
PL 7	Argentina, Pigue, Bs. As.	A	A	I
PL 8	Argentina, Bs. As.	A	A	I
PL 9	Argentina, Olavarría, Bs.As.	A	A	I
PL 10	Argentina, Gral. Pico, La Pampa	A	A	I
PL 12	Argentina, Arroyito, Córdoba	A	A	I
PL 13	Argentina, Balnearia, Córdoba	A	A	I
PL 14	Argentina, San Martín, La Pampa	A	A	I
PL 15	Argentina, La Plata, Bs. As.	A	A	I
PL 16	Argentina, City Bell, Bs. As.	A	A	I
PL 18	Argentina, Bavio, Bs. As.	A	A	I
PL 19	Argentina, Tandil, Bs. As.	A	A	I
PL 23	Nueva Zelanda	A	A	I
PL 27	Argentina, Tornquist, Bs. As.	A	A	I
PL 32	Argentina, Alto Alegre, Córdoba.	A	A	I
PL 33	Argentina, Chascomús, Bs. As.	A	A	I
PL 34	Argentina, Valle Medio, R. Negro.	A	A	I
PL 40	Italia, Pescara	A	A	I
PL 41	Italia, Lecce	A	A	I
PL 46	Francia, Vanchuse.	A	A	I
PL 48	Francia, Var	A	A	I
PL 50	Argentina, Lincoln, Bs. As.	A	A	I
PL 51	Argentina, Lincoln, Bs. As.	A	A	I
PL 52	Argentina, Chascomus, Bs. As.	A	A	I
PL 53	Argentina, Chascomus, Bs. As.	A	A	I
PL 54	Argentina, Balcarce, Bs. As.	A	A	I
PL 55	Argentina, Balcarce, Bs. As.	A	A	I
PL 59	Suecia, Uppsala	A	A	I
PL 60	Argentina, Bolivar, Bs. As.	A	A	I
PL 61	Argentina, Bolivar, Bs. As.	A	A	I
PL 64	Argentina, Ranchos, Bs. As.	A	A	I
PL 65	Argentina, Las Flores, Bs. As.	A	A	I
PL 66	Argentina, Las Flores, Bs. As.	A	A	I

CEPA	ORIGEN	BOX	REP	ERIC
PL 67	Argentina, La Plata, Bs. As.	A	A	I
PL 70	Polonia, Grye	A	A	I
PL 71	Polonia, Grye	A	A	I
PL 72	Polonia, Grye	A	A	I
PL 73	Polonia, Skierne	A	A	I
PL 79	Argentina, Tres Arroyos, Bs. As.	A	A	I
PL 80	Argentina, Dufour, Bs.As.	A	A	I
PL 81	Argentina, Dufour, Bs.As.	A	A	I
PL 83	EE.UU., Arkansas (95961)	A	A	I
PL 84	EE.UU., Indiana (96039)	A	A	I
PL 85	EE.UU., N. York (95117)	A	A	I
PL 86	EE.UU. , Ohio (95105)	A	A	I
PL 87	EE.UU. , Ohio (95106)	A	A	I
PL 88	EE.UU., Ohio (95237)	A	A	I
PL 89	Alemania, Holzkirchen	A	A	I
PL 90	Alemania, Holzkirchen	A	A	I
PL 91	Alemania, Holzkirchen	A	A	I
PL 92	Argentina, Córdoba, M. Juarez	A	A	I
PL 93	Argentina, Córdoba	A	A	I
PL 94	Argentina, Stgo. del Estero	A	A	I
PL 98	Argentina	A	A	I
PL 99	Argentina	A	A	I
PL 100	Tunicia	A	A	I
PL 101	EE.UU, NRRLB-2605 / ATCC 9545	A	A	I
PL 102	Argentina	A	A	I
PL 103	EE.UU., NRRL B-3555	A	A	I
PL 104	EE.UU., Ohio, ATCC 25747	A	A	I
PL 105	Argentina, Magdalena, Bs. As.	A	A	I
PL 106	Argentina, La Plata, Bs. As.	A	A	I
PL 107	Argentina, Magdalena, Bs. As.	A	A	I
PL 108	Argentina, Magdalena, Bs. As.	A	A	I
PL 109	Argentina, Córdoba, M. Juarez	A	A	I
PL 110	Argentina, Magdalena, Bs. As.	A	A	I
PL 111	Argentina, Magdalena, Bs. As.	A	A	I
PL 112	Argentina, Rauch, Bs. As.	A	A	I
PL 114	Argentina, Guaminí, Bs. As.	A	A	I
PL 115	Argentina, Laprida, Bs. As.	A	A	I
PL 116	Argentina, Laprida, Bs. As.	A	A	I
PL 117	Argentina, Pta. Indio, Bs. As.	A	A	I
PL 118	Argentina, Los Toldos, Bs. As.	A	A	I
PL 119	Argentina, Saavedra, Bs. As.	A	A	I
PL 120	Argentina, Laprida, Bs. As.	A	A	I

CEPA	ORIGEN	BOX	REP	ERIC
PL 121	Argentina, Laprida, Bs. As.	A	A	I
PL 122	Argentina, Laprida, Bs. As.	A	A	I
PL 123	Argentina, Laprida, Bs. As.	A	A	I
PL 124	Argentina, Laprida, Bs. As.	A	A	I
PL 125	Argentina, Magdalena, Bs. As.	A	A	I
PL 126	Argentina, Laprida, Bs. As.	A	A	I
PL 128	Argentina, Laprida, Bs. As.	A	A	I
PL 129	Argentina, Laprida, Bs. As.	A	A	I
PL 130	Argentina, Laprida, Bs. As.	A	A	I
PL 131	Argentina, Ranchos, Bs. As.	A	A	I
PL 132	Argentina, Río Negro	A	A	I
PL 133	Argentina, Tandil, Bs. As.	A	A	I
PL 134	Argentina, Tandil, Bs. As.	A	A	I
PL 135	Argentina, Tandil, Bs. As.	A	A	I
PL 136	Argentina, Tandil, Bs. As.	A	A	I
PL 137	Argentina, Tandil, Bs. As.	A	A	I
PL 138	Argentina, Tandil, Bs. As.	A	A	I
PL 139	Argentina, Tandil, Bs. As.	A	A	I
PL 140	Argentina, Magdalena, Bs. As.	A	A	I
PL 141	Argentina, Tapalqué, Bs. As.	A	A	I
PL 142	Argentina, Chaco	A	A	I
PL 143	Argentina, Guaminí, Bs. As.	A	A	I
PL 144	Argentina, Tapalqué, Bs. As.	A	A	I
PL 145	Argentina, 25 de Mayo, Bs. As.	A	A	I
PL 146	Argentina, La Plata, Bs. As.	A	A	I
PL 147	Argentina, Magdalena, Bs. As.	A	A	I
PL 148	Argentina, La Plata, Bs. As.	A	A	I
PL 149	Argentina, Magdalena, Bs. As.	A	A	I
PL 150	Argentina, Saavedra, Bs. As.	A	A	I
PL 152	Argentina, C. de Patagones, Bs. As.	A	A	I
PL 153	Argentina, Sta. Teresita, Bs. As.	A	A	I
PL 154	Argentina, Bavio, Bs. As.	A	A	I
PL 156	Argentina, Prov. Bs. As.	A	A	I
PL 157	Argentina, Pehuajó, Bs. As.	A	A	I
PL 158	Argentina, 9 de Julio, Bs. As.	A	A	I
PL 159	Argentina, Gral. Belgrano, Bs. As.	A	A	I
PL 160	Argentina, Las Flores, Bs. As.	A	A	I
PL 161	Argentina, Los Toldos, Bs. As.	A	A	I
PL 162	Argentina, Los Toldos, Bs. As.	A	A	I
PL 163	Argentina, Los Toldos, Bs. As.	A	A	I
PL 164	Argentina, Cañuelas, Bs. As.	A	A	I
PL 165	Argentina, Lincoln, Bs. As.	A	A	I

CEPA	ORIGEN	BOX	REP	ERIC
PL 166	Argentina, Lincoln, Bs. As.	A	A	I
PL 167	Argentina, Cañuelas, Bs. As.	A	A	I
PL 168	Argentina, Chacabuco, Bs. As.	A	A	I
PL 169	Argentina, San Vicente, Bs. As.	A	A	I
PL 170	Argentina, Gral. Alvear, Mendoza.	A	A	I
PL 171	Argentina, Luján, Bs.As.	A	A	I
PL 172	Argentina, San Vicente, Bs. As.	A	A	I
PL 173	Argentina, Bragado, Bs. As.	A	A	I
PL 177	Argentina, Gral. Lavalle, Bs. As.	A	A	I
PL 178	Argentina, 25 de Mayo, Bs. As.	A	A	I
PL 179	Argentina, San Cayetano, Bs. As.	A	A	I
PL 180	Argentina, Salto, Bs. As.	A	A	I
PL 181	Argentina, P. Perón, Bs. As.	A	A	I
PL 185	Argentina, San Francisco, Bs. As.	A	A	I
PL 186	Argentina, Mercedes, Bs. As.	A	A	I
PL 187	Argentina, Olavarría, Bs. As.	A	A	I
PL 188	Argentina, Las Flores, Bs. As.	A	A	I
PL 189	Argentina, Verónica, Bs. As.	A	A	I
PL 190	Argentina, Verónica, Bs. As.	A	A	I
PL 191	Argentina, La Plata, Bs. As.	A	A	I
PL 192	Argentina, La Plata, Bs. As.	A	A	I
PL 193	Argentina, Gran Bs. As.	A	A	I
PL 195	Argentina, Chascomús, Bs. As.	A	A	I
PL 196	Argentina, La Plata, Bs. As.	A	A	I
PL 197	Argentina, Verónica, Bs. As.	A	A	I
PL 198	Argentina, Verónica, Bs. As.	A	A	I
PL 199	Argentina, Ayacucho, Bs. As.	A	A	I
PL 202	Italia	A	A	I
PL 203	Italia	A	A	I
PL 204	Argentina, Gral. Pinto	A	A	I
PL 205	Argentina, Gral. Pinto, Bs. As.	A	A	I
PL 206	Argentina, Gral. Pinto, Bs. As.	A	A	I
PL 207	Argentina, Gral. Pinto, Bs. As.	A	A	I
PL 208	Argentina, Huanguelen, Bs. As.	A	A	I
PL 209	Argentina, Gral. Pinto, Bs. As.	A	A	I
PL 210	Argentina, Huanguelen, Bs. As.	A	A	I
PL 211	Argentina, La Plata, Bs. As.	A	A	I
PL 212	Canadá, Toronto	A	A	I
PL 214	Canadá, Toronto	A	A	I
PL 215	Argentina, Delta, bs. As.	A	A	I
PL 216	Argentina, Ranchos, Bs. As.	A	A	I
PL 217	Argentina, Etcheverry, Bs. As.	A	A	I

CEPA	ORIGEN	BOX	REP	ERIC
PL 219	Argentina, C. Suarez, Bs. As.	A	A	I
PL 220	Argentina, C. Suarez, Bs. As.	A	A	I
PL 221	Argentina, América ,Bs. As.	A	A	I
PL 222	Argentina, Chivilcoy, Bs. As.	A	A	I
PL 223	Argentina, Bragado, Bs. As.	A	A	I
PL 224	Argentina, Bragado, Bs. As.	A	A	I
PL 226	Argentina, Urdampilleta, Bs. As.	A	A	I
PL 229	Francia	A	A	I
PL 231	Francia	A	A	I
PL 232	Francia	A	A	I
PL 233	Argentina, Brandsen, Bs. As.	A	A	I
PL 234	Argentina, Brandsen, Bs. As.	A	A	I
PL 235	Argentina, 25 de Mayo, Bs. As.	A	A	I
PL 236	Argentina, 25 de Mayo, Bs. As.	A	A	I
PL 237	Argentina, 25 de Mayo, Bs. As.	A	A	I
PL 238	Argentina, 25 de Mayo, Bs. As.	A	A	I
PL 239	Argentina, 25 de Mayo, Bs. As.	A	A	I
PL 240	Argentina, Trenque Lauquen, Bs. As.	A	A	I
PL 241	Argentina, Trenque Lauquen, Bs. As.	A	A	I
PL 242	Argentina, Trenque Lauquen, Bs. As.	A	A	I
PL 243	Argentina, Trenque Lauquen, Bs. As.	A	A	I
PL 244	Argentina, Trenque Lauquen, Bs. As.	A	A	I
PL 245	Argentina, Trenque Lauquen, Bs. As.	A	A	I
PL 246	Argentina, Trenque Lauquen, Bs. As.	A	A	I
PL 247	Argentina, Roque Perez, Bs. As.	A	A	I
PL 248	Argentina, Los Toldos, Bs. As.	A	A	I
PL 249	Argentina, Castelli, Bs. As.	A	A	I
PL 250	Argentina, Brandsen, Bs. As.	A	A	I
PL 251	Argentina, Brandsen, Bs. As.	A	A	I
PL 252	España	A	A	I
PL 257	Argentina, Tapalqué, Bs. As.	A	A	I
PL 258	Argentina, Tapalqué, Bs. As.	A	A	I
PL 259	Argentina, Tapalqué, Bs. As.	A	A	I
PL 260	Argentina, Carlos Casares, Argentina	A	A	I
PL 261	Argentina, Carlos Casares, Bs. As.	A	A	I
PL 262	Argentina, 9 de Julio, Bs. As.	A	A	I
PL 263	Argentina, 9 de Julio, Bs. As.	A	A	I
PL 264	Argentina, 9 de Julio, Bs. As.	A	A	I
PL 265	Argentina, C. Casares, Bs. As.	A	A	I
PL 266	Argentina, C. Casares, Bs. As.	A	A	I
PL 267	Argentina, 9 de Julio, Bs. As.	A	A	I
PL 268	Argentina, C. Casares, Bs. As.	A	A	I

CEPA	ORIGEN	BOX	REP	ERIC
PL 269	Argentina, C. Casares, Bs. As.	A	A	I
PL 270	Argentina, C. Casares, Bs. As.	A	A	I
PL 272	Argentina, Glew, Bs. As.	A	A	I
PL 273	Argentina, Lanús, Bs. As.	A	A	I
PL 274	Argentina, Cnel. Vidal, Bs. As.	A	A	I
PL 275	Argentina, Miramar, Alvarado, Bs. As.	A	A	I
PL 276	Argentina, Balcarce, Bs. As.	A	A	I
PL 277	Argentina, Zárate, Bs. As.	A	A	I
PL 278	Argentina, Punta Indio, Bs. As.	A	A	I
PL 280	Argentina, Chascomús, Bs. As.	A	A	I
PL 281	Argentina, Chascomús, Bs. As.	A	A	I
PL 282	Argentina, Chascomús, Bs. As.	A	A	I
PL 283	Argentina, La Plata, Bs. As.	A	A	I
PL 284 (NP2)	Uruguay , N. Palmira	A	A	I
PL 285 (A8)	Uruguay, Paysandu	A	A	I
PL 287 (NP 1)	Uruguay, N. Palmira	A	A	I
PL 288	Francia	A	A	I
PL 289	Japón P41	A	A	I
PL 290	Japón P42	A	A	I
PL 291 (G11)	Uruguay ,Paysandu	A	A	I
PL 292 (A7)	Uruguay, Paysandu	A	A	I
PL 293 (NP3)	Uruguay, N. Palmira	A	A	I
PL 294 (M3)	Uruguay	A	A	I
PL 295	EE.UU.	A	A	I
PL 296	EE.UU.	A	A	I
PL 297	Argentina, Quilmes, Bs. As.	A	A	I
PL 298	Argentina, Pta. Indio, Bs. As.	A	A	I
PL 299	Argentina, Tres Arroyos, Bs. As.	A	A	I
PL 300	Argentina, 25 de Mayo, Bs. As.	A	A	I
PL 302	Chile	A	A	I
PL 303	Argentina, La Plata, Bs. As.	A	A	I
PL 304	Belgica, West Flanders	A	A	I
PL 305	Belgica, Brabant	A	A	I
PL 306	Argentina, Mercedes, Bs. As.	A	A	I
PL 307	Argentina, Mercedes, Bs. As.	A	A	I
PL 308	Argentina, Cnel. Pringles, Bs. As.	A	A	I
PL 309	Argentina, Mercedes, Bs. As.	A	A	I
PL 313	Argentina, Roque Perez, Bs. As.	A	A	I
PL 314	Argentina, Roque Perez, Bs. As.	A	A	I
PL 315	Argentina, Roque Perez, Bs. As.	A	A	I
PL 316	Argentina, Mar Chiquita, Bs. As.	A	A	I
PL 317	Argentina, G. Alvear, Bs. As.	A	A	I

CEPA	ORIGEN	BOX	REP	ERIC
PL 320	Argentina, Tres Arroyos, Bs. As.	A	A	I
PL 321	Argentina, Luján, Bs. As.	A	A	I
PL 324	Argentina, Exaltación de la Cruz, Bs.As.	A	A	I
PL 325	Argentina, Rauch, Bs. As.	A	A	I
PL 326	Argentina, Chivilcoy, Bs. As.	A	A	I
PL327	Argentina, La Plata, Bs. As.	A	A	I
PL328	Argentina, Roque Perez; Bs. As.	A	A	I
PL329	Argentina, Las Flores, Bs. As.	A	A	I
PL330	Argentina, Las Flores, Bs. As.	A	A	I
PL331	Argentina, La Plata, Bs. As.	A	A	I
PL332	Argentina, La Plata, Bs. As.	A	A	I
PL333	Argentina, Magdalena, Bs. As.	A	A	I
PL334	Argentina, Villarino, Bs. As.	A	A	I
PL 335	Argentina, Magdalena, Bs. As.	A	A	I
PL 336	EE.UU. , Virginia, ATCC 25748	A	A	I
PL 337	Argentina, Río Colorado, R.Negro.	A	A	I
PL 338	Argentina, Ranchos	A	A	I
PL 340	Argentina, Gorina, Bs. As.	A	A	I
PL 341	Argentina, Pergamino, Bs. As.	A	A	I
PL 342	Argentina, Pigué, Bs. As.	A	A	I
PL 343	Argentina, Pigué, Bs. As.	A	A	I
PL 344	Argentina, Pigué, Bs. As.	A	A	I
PL 345	Argentina, 9 de julio, Bs As.	A	A	I
PL 346	Argentina, Pigue, Bs. As.	A	A	I
PL 347	Argentina, Bragado, Bs. As.	A	A	I
PL 348	Argentina, Gorina, Bs. As.	A	A	I
PL 349	Argentina, San Pedro, Bs. As.	A	A	I
PL 350	Argentina, Brandsen, Bs. As.	A	A	I
PL351	Argentina, Henderson, Bs. As.	A	A	I
PL352	Argentina, 25 de Mayo, Bs. As.	A	A	I
PL 353	Argentina, Quilmes, Bs. As.	A	A	I
PL 354	Argentina, La Plata, Bs. As.	A	A	I
PL 355	Argentina, La Plata, Bs. As.	A	A	I
PL 356	Argentina, S.M. del Monte, Bs. As.	A	A	I
PL 357	Argentina, Chascomús, Bs As.	A	A	I
PL 358	Argentina, San Miguel del Monte, Bs. As.	A	A	I
PL 359	Argentina, Berisso, Bs. As.	A	A	I
PL 360	Argentina, Berisso, Bs. As.	A	A	I
PL 362	Argentina, Berisso, Bs. As.	A	A	I
PL 363	Argentina, Bolivar, Bs. As.	A	A	I
PL 364	Argentina, Ranchos, Bs. As.	A	A	I
PL 365	Argentina, Salta	A	A	I

CEPA	ORIGEN	BOX	REP	ERIC
PL 366	Argentina, La Plata, Bs. As.	A	A	I
PL 367	Argentina, G. Pueyrredón, Bs. As.	A	A	I
PL 368	Brasil, Buzios	A	A	I
PL 369	Argentina, G. Pueyrredón, Bs. As.	A	A	I
PL 370	Argentina, La Plata, Bs. As.	A	A	I
PL 371	Argentina, G. Pueyrredón, Bs. As.	A	A	I
PL 372	Argentina, Berisso, Bs. As.	A	A	I
PL 375	Argentina, Gral. Conesa, Río Negro	A	A	I
PL 376	Argentina, Lincoln, Bs. As.	A	A	I
PL 377	Argentina, Las Flores, Bs. As.	A	A	I
PL 378	Argentina, Haedo, Bs. As.	A	A	I
PL 379	Argentina, Haedo, Bs. As.	A	A	I
PL380	Argentina, Brandsen, Bs. As.	A	A	I
PL381	Argentina, Castelli, Bs. As.	A	A	I
PL 382	Argentina, La Plata, Bs. As.	A	A	I
PL 394	EE.UU., Miami	A	A	I
PL 409	Argentina	A	A	I
PL 410	Argentina	A	A	I
PL 411	Argentina	A	A	I
PL412	Argentina	A	A	I
PL 413	Argentina	A	A	I
PL 427	Sudáfrica, Pretoria	A	A	I
PL SAG 8671	SAG	A	A	I
PL 17	CCT 491	B	B	I
PL 20	Argentina, Mar del Plata, Bs. As.	B	B	I
PL 21	Nueva Zelanda	B	B	I
PL 22	Nueva Zelanda	B	B	I
PL 24	Nueva Zelanda	B	B	I
PL 25	Nueva Zelanda	B	B	I
PL 26	Nueva Zelanda	B	B	I
PL 29	Nueva Zelanda	B	B	I
PL 30	Nueva Zelanda	B	B	I
PL 31	Nueva Zelanda	B	B	I
PL 42	Italia, Modena	B	B	I
PL 43	Italia, Modena	B	B	I
PL 44	Italia, Padova	B	B	I
PL 47	Francia, Var	B	B	I
PL 49	Francia, Var	B	B	I
PL 56	Suecia, Uppsala	B	B	I
PL 57	Suecia, Uppsala	B	B	I
PL 58	Suecia, Uppsala	B	B	I
PL 62	Argentina, Ranchos, Bs. As.	B	B	I

CEPA	ORIGEN	BOX	REP	ERIC
PL 63	Argentina, Ranchos, Bs. As.	B	B	I
PL 68	Polonia , Swar	B	B	I
PL 69	Polonia, Swar	B	B	I
PL 74	R. Checa CCM 4483	B	B	I
PL 75	R. Checa CCM 4484	B	B	I
PL 76	R. Checa CCM 4485	B	B	I
PL 77	R. Checa CCM 4486	B	B	I
PL 78	Argentina	B	B	I
PL 82	Argentina, I. Correa, Bs. As.	B	B	I
PL 95	Inglaterra, Devon (2)	B	B	I
PL 96	Inglaterra, Leicester (25)	B	B	I
PL 97	Inglaterra, Kent (26)	B	B	I
PL 200	Argentina, Loma Verde, Bs. As.	B	B	I
PL 201	Italia	B	B	I
PL 213	Canadá, Toronto	B	B	I
PL 253	España	B	B	I
PL 254	España	B	B	I
PL 255	España	B	B	I
PL 256	España	B	B	I
PL 318	Chile	B	B	I
PL 319	Chile	B	B	I
PL 339	Chile, SAG	B	B	I
PL 420	Italia	B	B	I
PL SAG 8977	SAG	B	B	I
PL SAG 9648	SAG	B	B	I
PL SAG 10823	SAG	B	B	I
PL SAG 11231	SAG	B	B	I
PL SAG 10991	SAG	B	B	I
PL SAG 5476	SAG	B	B	I
PL 28	Argentina, C. Choel, R. Negro.	C	C	I
PL 35	Argentina, Chimpay, R. Negro.	C	C	I
PL 36	Argentina, Valle Medio, R. Negro	C	C	I
PL 37	Argentina, Valle Medio, R. Negro.	C	C	I
PL 38	Argentina, Chimpay, R. Negro.	C	C	I
PL 39	Argentina, Gral. Alvear, Mendoza.	C	C	I
PL 113	Argentina, Saavedra, Bs. As.	C	C	I
PL 127	Argentina, Laprida, Bs. As.	C	C	I
PL 151	Argentina, Córdoba, M. Juarez	C	C	I
PL 155	Argentina, Bavio, Bs. As.	C	C	I
PL 174	Argentina, Villegas, Bs. As.	C	C	I
PL 175	Argentina, Lamadrid, Bs. As.	C	C	I
PL 176	Argentina, Bragado, Bs. As.	C	C	I

CEPA	ORIGEN	BOX	REP	ERIC
PL 182	Argentina, Saladillo, Bs. As.	C	C	I
PL 183	Argentina, Villarino, Bs. As.	C	C	I
PL 194	Argentina, Payró, Bs. As.	C	C	I
PL 271	Argentina, 9 de Julio, Bs. As.	C	C	I
PL 286 (A4)	Uruguay, Paysandu	C	C	I
PL 310	Argentina, Los Hornos, Bs. As.	C	C	I
PL 311	Argentina, Balcarce, Bs. As.	C	C	I
PL 312	Argentina, Balcarce, Bs. As.	C	C	I
PL 361	Argentina, Berisso, Bs. As.	C	C	I
PL 11	Argentina, La Plata, Bs. As.	D	D	I
PL 45	Francia, Vanchuse	D	D	I
PL 184	Argentina, San Francisco, Bs. As.	D	D	I
PL 218	Argentina, G. Madariaga, Bs. As.	D	D	I
PL 225	Argentina, Urdampilleta, Bs. As.	D	D	I
PL 227	Argentina, Urdampilleta, Bs. As.	D	D	I
PL 228	Francia	D	D	I
PL 230	Francia	D	D	I
PL 279	Argentina, Chascomús, Bs. As.	D	D	I
PL 301	Chile	D	D	I
PL 322	Argentina, Tres Arroyos, Bs. As.	D	D	I
PL 323	Argentina, Delta, Bs. As.	D	D	I
PL 373	EE.UU., Boston	D	D	I
PL374	EE.UU., Boston	D	D	I
PL 391	EE.UU., Miami	D	D	I
PL 395	EE.UU., Miami	D	D	I
PL SAG m289	SAG	B	B	II
PL SAG m290	SAG	B	B	II
PL SAG 10230	SAG	B	B	II
PL SAG 10754	SAG	B	B	II
PL SAG 10367	SAG	B	B	II

Tabla 7: Perfiles de *fingerprints* de las cepas de *P. larvae* (ex grupo *pulvificiens*) obtenidos por rep-PCR con los cebadores BOX, REP y ERIC.

CEPA	ORIGEN	BOX	REP	ERIC
ATCC 13537 CT	EE.UU., New Brusnkin, ATCC	E	E	IV
ATCC 25367	ATCC	E	E	IV
ATCC 25368	ATCC	E	E	IV
CCM 38	CCM	E	E	IV
NRRL B-14154	NRRL	E	E	IV

C T: Cultivo Tipo

4.3.3. Distribución geográfica de los perfiles obtenidos por rep-PCR

Con respecto a la distribución geográfica de los genotipos, en la Argentina sólo se encontró el perfil ERIC-I en 300 aislamientos analizados tanto de muestras de larvas como de mieles. Por otra parte, Genersch y col. encontraron dos perfiles ERIC (ERIC-I y ERIC-II) en una colección de 105 cepas provenientes de Alemania (Genersch & Otten, 2003), los mismos dos perfiles (ERIC-I y ERIC-II) se encontraron en Bulgaria sobre un total de 126 cepas (Rusenova *et al.*, 2013) al igual que en Austria sobre un total de 214 cepas (Loncaric *et al.*, 2009). Durante la redacción de esta tesis, Schäfer y col. (2014) hallaron el perfil ERIC-II en 3 muestras individuales provenientes de Canadá, Australia y Nueva Zelanda por lo que no podría considerarse exclusivo de la UE. Con excepción de una única cepa ERIC-II aislada de una muestra de miel de Canadá (Schäfer *et al.*, 2014), este genotipo no ha sido encontrado en otras cepas procedentes de países americanos (esta Tesis, n= 334 y Dingman, 2014 *Com. Pers.*, n= 99). Por su parte, Di Pinto y col. hallaron 4 genotipos ERIC en una colección de 135 aislamientos de Italia (Di Pinto *et al.*, 2011). Los perfiles hallados por Di Pinto y col. (2011) no se correlacionan con los obtenidos por el resto de los investigadores mencionados ni con los de los aislamientos estudiados en esta tesis.

El perfil ERIC-I sería el de mayor distribución a nivel mundial ya que se ha encontrado en todos los países productores de miel, mientras que el perfil ERIC-II se encontraría principalmente en países europeos tales como Alemania, Finlandia, Suecia y Austria (Genersch, 2010; Genersch *et al.*, 2006; Loncaric *et al.*, 2009). En cuanto al perfil ERIC-III sólo se halló en algunas pocas cepas existentes en Colecciones Internacionales que fueron aisladas hace mucho tiempo. Genersch y col. (2006) hallaron un cuarto perfil ERIC, al cual denominaron ERIC-IV coincidente con cepas no pigmentadas pertenecientes a colecciones dónde fueron depositadas originalmente como *P. l.* subsp. *pulvificiens* (Gilliam & Dunham, 1978; Nakamura, 1984). Los genotipos ERIC-III y ERIC-IV no se han encontrado recientemente en muestras de larvas infectadas con loque americana ni tampoco en aislamientos de mieles, los únicos ejemplares que se conocen de estos genotipos provienen de colecciones internacionales y fueron aislados de larvas con síntomas de cría salteada hace 30 años. Se podría especular que en la actualidad los genotipos ERIC-I y ERIC-II han desplazado a los genotipos ERIC-III y ERIC-IV ya que no han sido aislados de muestras de larvas infectadas o productos de la colmena desde el año 1984 (Nakamura, 1984).

En su conjunto estos resultados sugieren que la alta homogeneidad genética encontrada entre las cepas de *P. larvae* provenientes de diferentes lugares geográficos se deba a una

limitada presión de selección por parte de fuentes climáticas y ambientales.

Tabla 8: Distribución de los *Fingerprints* obtenidos por BOX-PCR (A, B ,C, D y E) por país de origen de las cepas de *P. larvae* analizadas.

País	<i>Fingerprints</i> por BOX-PCR					Totales por país
	A	B	C	D	E	
Argentina	265	6	21	8	0	300
Alemania	3	0	0	0	0	3
Bélgica	2	0	0	0	0	2
Brasil	1	0	0	0	0	1
Canadá	2	1	0	0	1	4
Chile	0	3	0	0	0	3
España	1	4	0	0	0	5
EE.UU.	13	0	0	4	1	18
Francia	6	2	0	3	1	12
Inglaterra	0	3	0	0	0	3
Italia	4	5	0	0	0	9
Japón	2	0	0	0	0	2
Nueva Zelanda	1	8	0	0	0	9
Polonia	4	2	0	0	0	6
Rep. Checa	0	4	0	0	0	4
Sudáfrica	1	0	0	0	0	1
Suecia	1	3	0	0	0	4
Tunisia	1	0	0	0	0	1
Uruguay	7	0	1	0	0	8
Colecciones (origen desconocido)	1	11	0	0	2	14
Totales	315 (77%)	52 (13%)	22 (5%)	15 (4%)	5 (1%)	409 (100%)

Con relación a los amplicones generados con los cebadores BOX y REP, en la Argentina hemos encontrado 4 genotipos diferentes a los cuales denominados A, B, C y D, mientras que en Uruguay, Antunez y col. (2007) sobre un total de 50 aislamientos encontraron solamente los perfiles BOX-A y BOX-C. Por su parte, en Alemania Genersch y Otten (2003) hallaron con los *primers* BOX tres genotipos diferentes a los cuales denominaron *a*, *A*, y *α* y con los cebadores REP los genotipos B y *b*. Los perfiles BOX-A y BOX-B encontrado en este trabajo se correlacionan con los perfiles BOX-A y BOX-*a* citados por Genersch y Otten (2003), respectivamente. Vale la pena mencionar que aparentemente los perfiles C y D encontrados en algunos de nuestros aislamientos y en cepas provenientes de Uruguay no estarían presentes en Alemania y, por otra parte, el perfil BOX-*α* (Genersch & Otten, 2003), no se halló en

ninguna de las cepas analizadas en esta tesis (n= 409). Con respecto a los cebadores REP los resultados no se pueden contrastar porque Genersch y Otten (2003) emplearon los cebadores MBO REP 1 y aquí se utilizaron los REP1RI/REP2-I. La misma situación ocurre al comparar nuestros resultados con los obtenidos por Loncaric y col. (2009) en Austria. Estas diferencias pueden deberse a discrepancias de reproducibilidad inter-laboratorio o a diferencias entre las poblaciones de *P. larvae* de Argentina, Alemania y Austria.

Si tomamos en cuenta los resultados obtenidos con los cebadores BOX en el presente estudio, el perfil de amplificación BOX-D fue hallado solamente en 8 cepas de Argentina, 4 de EE.UU. y 3 de Francia, el perfil BOX-C únicamente en Argentina (n=21) y Uruguay (n=1), el perfil BOX-B en 6 cepas de Argentina, 1 de Canadá, 3 de Chile, 4 de España, 2 de Francia, 3 de Inglaterra, 5 de Italia, 8 de Nueva Zelanda, 2 de Polonia, 4 de República Checa, 3 de Suecia y 11 en cepas de colecciones de orígenes desconocidos (Tabla 8). Por último el perfil BOX-A fue hallado en 265 cepas de Argentina, 3 de Alemania, 2 de Bélgica, 1 de Brasil, 2 de Canadá, 1 de España, 13 de EE.UU., 6 de Francia, 4 de Italia, 2 de Japón, 1 de Nueva Zelanda, 4 de Polonia, 1 de Sudáfrica, 1 de Suecia, 1 de Tunisia, 7 de Uruguay y 1 de origen desconocido por lo que resultó el de mayor distribución y frecuencia (Tablas 6, 7 y 8).

Dentro de la colección de aislamientos de la Argentina (n=300), únicamente se halló el perfil ERIC-I (100%) y se encontró una alta prevalencia del perfil BOX-A (88%), mientras que el resto de los perfiles estaba representado por un 2% de BOX-B, 7% de BOX-C y 3% de BOX-D. Tampoco se halló ningún representante del ex grupo *pulvificiens* (perfil BOX-E) (Tablas 6, 7 y 8). Si excluimos las cepas de Argentina, el análisis de las cepas provenientes de otros países estudiadas en esta tesis (n= 109) reveló una alta prevalencia de los genotipos BOX-A (46 %) y BOX-B (42%) mientras que los genotipos C y D estaban representados en un 1% y 6 % respectivamente. El genotipo BOX-B estuvo representado en una proporción muy baja en la Argentina (2 %) pero muy alta (42%) en el resto de los países, principalmente de la Unión Europea. El genotipo D sólo se encontró en cepas de Argentina, EE.UU y Francia y el genotipo C solo se halló en 21 cepas de la Argentina y en 1 cepa de Uruguay proveniente de la zona fronteriza. Estos resultados sugieren que la loque americana pudo haber ingresado a Uruguay desde la Argentina ya que la enfermedad se detectó en nuestro país en la zona de Tandil (Provincia de Buenos Aires) en el año 1989. El foco surgió en un grupo de abejas italianas que sufrieron una mortandad del 53% a través de una importación de abejas reinas de EE.UU. sin el debido control sanitario (Alippi, 1991; 1992a) y las primeras citas de la presencia de loque americana en Uruguay datan del año 2000 (Piccini & Zunino, 2001). Es importante destacar que todas las cepas de *P. larvae* aisladas de ese primer brote de la enfermedad presentaron el

fingerprint BOX-A (Alippi, 1992a; Alippi & Aguilar, 1998a).

4.4. Análisis por RFLP de un fragmento del gen 16S rDNA amplificado por PCR

El ADN genómico de las cepas de *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Lysinibacillus* y *Virgibacillus* ensayadas actuó como molde para la amplificación de un fragmento del 16S esperado de 1.100 pb con los cebadores U1 y U2. Este fragmento se incubó con 7 enzimas de restricción (*AluI*, *MspI*, *HaeIII*, *HinfI*, *CfoI*, *RsaI* y *TaqI*) dando distintos perfiles que se detallan en la Tabla 9. El análisis combinado de los polimorfismos que se generaron por la variación en la secuencia de 7 sitios de reconocimiento generó en las 38 especies pertenecientes a 5 géneros de bacterias Gram (+) esporuladas 35 perfiles (Figura 48).

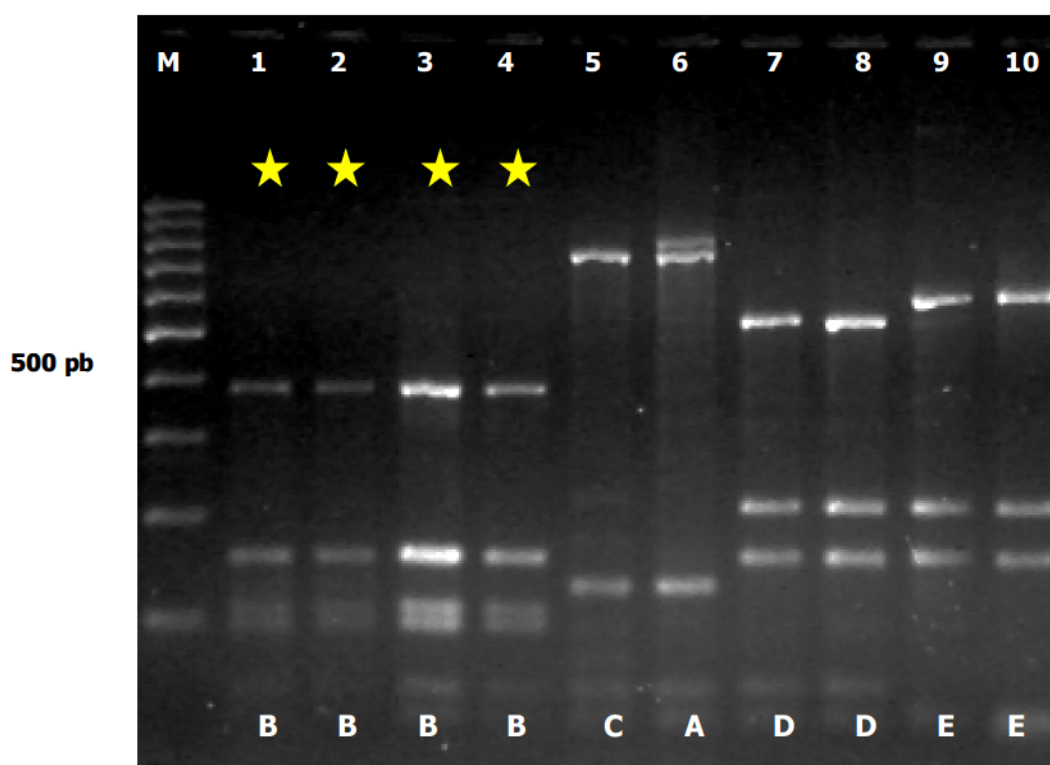


Figura 46: Perfiles de RFLP generados al digerir un fragmento de 1.100 pb del gen 16S rDNA con la endonucleasa *MspI*. De izquierda a derecha: M: Marcador de peso molecular (100 pb-ladder, Promega), 1: *Paenibacillus larvae* ATCC25747; 2: *P. larvae* PL113; 3: *P. larvae* CCM38 (ex *pulvificiens*); 4: *P. larvae* SAG 4689-3; 5: *Bacillus circulans* ATCC 4515; 6: *B. firmus* ATCC 8247; 7: *P. azotofixans* NRRL B-14372; 8: *Brevibacillus laterosporus* CCT31; 9: *B. subtilis* ATCC 19783; 10: *P. macerans* ATCC 8244. Las letras corresponden a perfiles diferentes los cuales se especificaron en la Tabla 13. Las estrellas indican las líneas sembradas con *P. larvae* (calles 1 y 2 grupo *larvae* y calles 4 y 5 grupo ex. *pulvificiens*) todas con el mismo perfil (B).

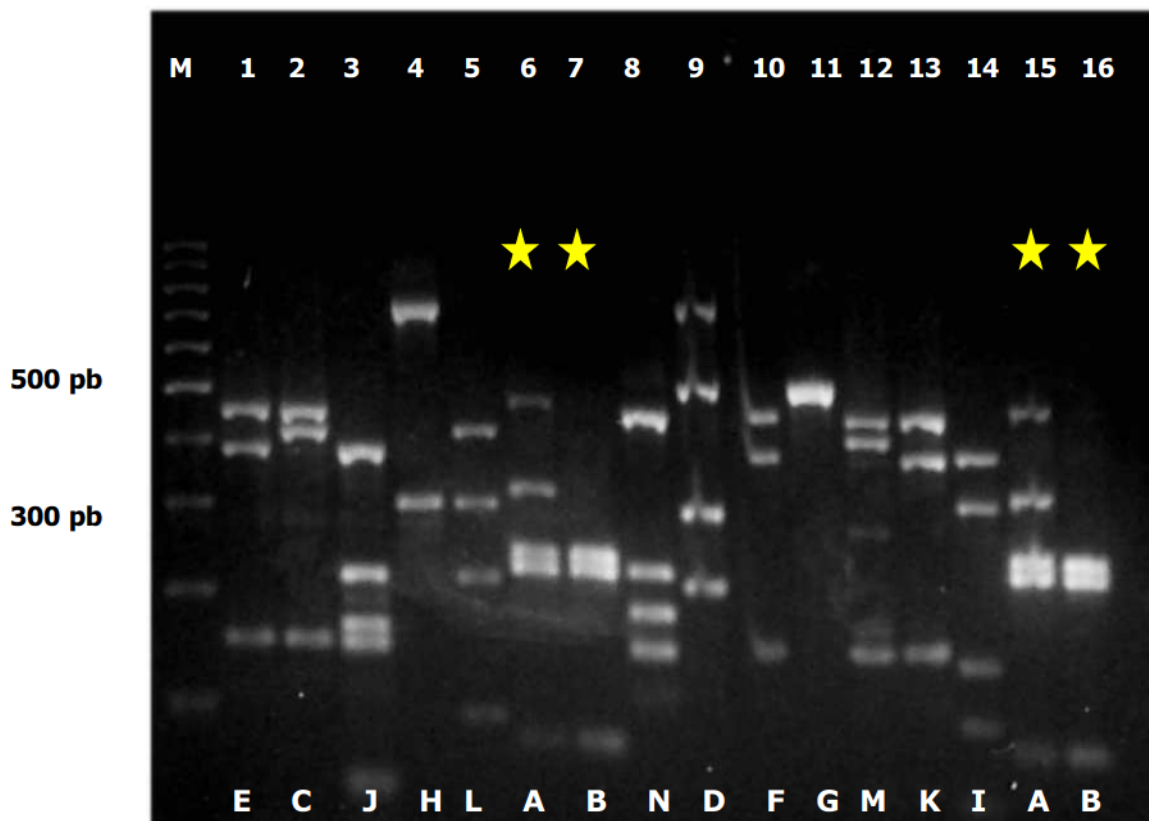
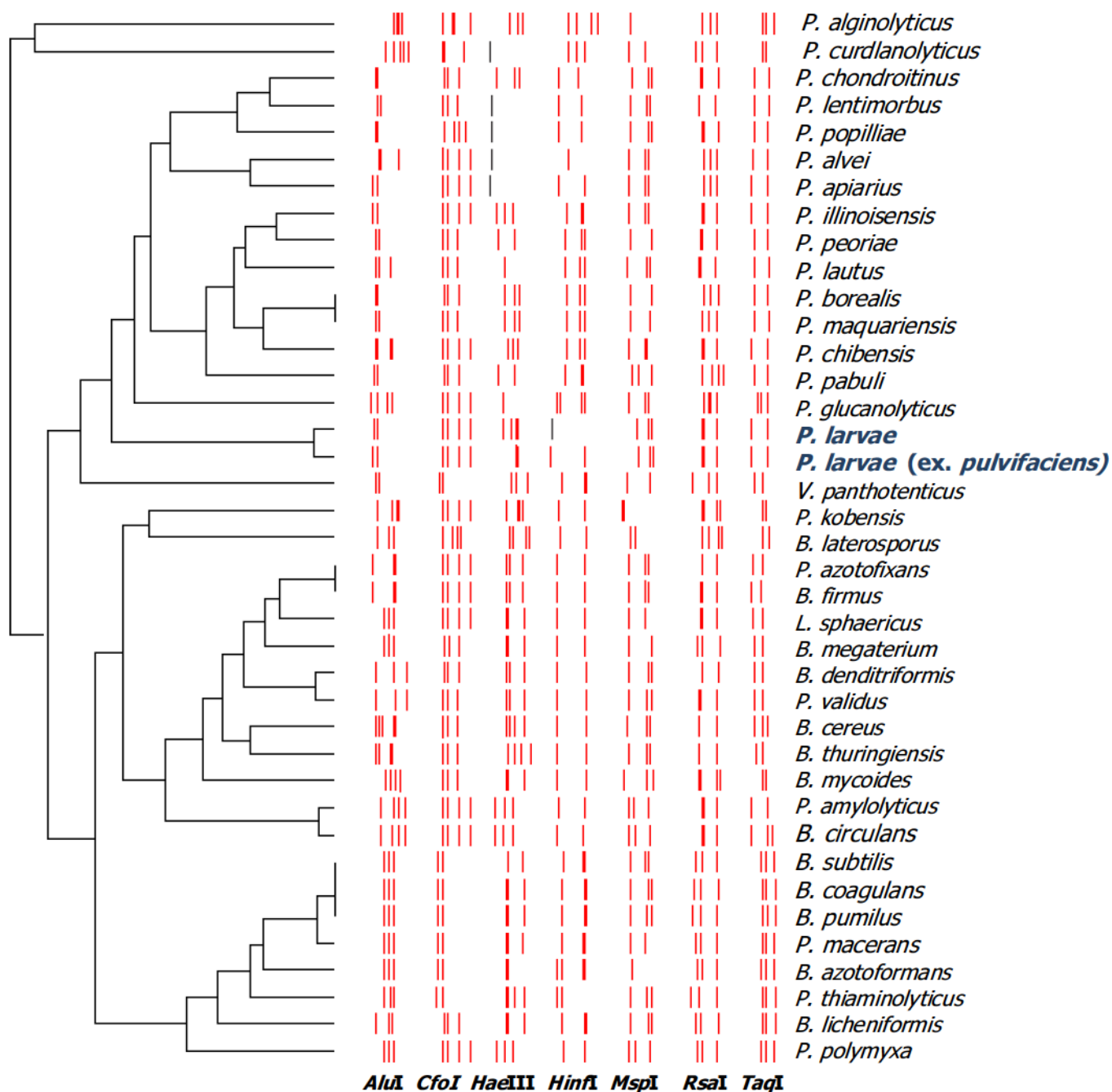


Figura 47: Perfiles de RFLP generados al digerir un fragmento de 1.100 pb del gen 16S rDNA con la endonucleasa *Hae*III. De izquierda a derecha: M: Marcador de peso molecular (100 pb-ladder, Promega), 1: *Bacillus cereus* ATCC 11778; 2: *Paenibacillus macerans* ATCC 8244; 3: *P. alginolyticus* NRRL NRS-1347; 4: *P. peoriae* NRRL B-14750; 5: *P. chibensis* NRRL B-142; 6: *P. larvae* ATCC 25747; 7: *P. larvae* CCM38; 8: *Brevibacillus laterosporus* CCT31; 9: *P. borealis* KK19; 10: *P. amylolyticus* NRRL B-14940; 11: *P. glucanolyticus* NRRL B-14679; 12: *Virgibacillus panthotenticus* ATCC 14576; 13: *Bacillus mycooides* ATCC 10206; 14: *P. kobensis* NRRL B-23246; 15: *P. larvae* PL113; 16: *P. larvae* ATCC 13537. Las letras corresponden a perfiles diferentes los cuales se especificaron en la Tabla 10. Las estrellas indican las líneas sembradas con *P. larvae* (perfil A) y *P. larvae* ex grupo *pulfivaciens* (perfil B).

Figura 48: Análisis de la diversidad del gen 16S rDNA mediante RFLP. Se muestran los perfiles de RFLP obtenidos al digerir un fragmento de 1.100 pb del gen 16S rDNA con las endonucleasas *AluI*, *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MspI*, *RsaI* y *TaqI*. Se compararon especies representativas de los géneros *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Virgibacillus*, *Lysinobacillus* y *Brevibacillus*. Para la construcción del dendrograma se usó la opción *combined gels* del programa GelCompar.



La endonucleasa *MspI* digirió el fragmento amplificado de todas las cepas de *P. larvae* (ambos grupos) en los mismos sitios de manera que generó un solo perfil de restricción al cual denominamos B que no se observó en restricciones realizadas en el mismo fragmento amplificado a partir de aislamientos de otros géneros y especies examinados (Tabla 9 y Figuras 46 y 48). La restricción de los amplicones correspondientes a la secuencia parcial del 16S rDNA con la endonucleasa *HaeIII* generó dos perfiles uno característico de los aislamientos de *P. larvae* al que denominamos A, y otro denominado B que fue característico del grupo ex *pulvificiens* (Tabla 9 y Figura 47). Ciertamente, con *HaeIII*, el grupo *larvae* presentó cuatro bandas de aproximadamente 200, 220, 300 y 470 pb, mientras que el grupo *pulvificiens* solamente presentó las dos bandas contiguas de aproximadamente 200- 220 pb (Figura 47). Se comprobó que la enzima *HaeIII* generó el mismo patrón de restricción en los amplicones correspondientes a las cepas de *P. larvae* listadas en las Tablas 1 y 3 del Capítulo II de la presente Tesis.

Es interesante destacar que los amplicones de la secuencia parcial del gen 16S rDNA de la colección de cepas de *P. larvae* no presentaron sitios de reconocimiento de la endonucleasa *HinfIII* (ausencia de sitios de corte – ASC-) mientras que los correspondientes al ex grupo *pulvificiens* presentaron sitios de restricción de esta enzima, perfil que además se presentó cuando se realizaron digestiones del 16S rDNA de *P. kobensis*, *P. macerans*, *P. polymyxa*, *B. coagulans*, *B. licheniformis* y *B. pumilus* (Tabla 9).

En conclusión, el gen 16S rDNA es polimórfico entre las especies esporuladas aerobias comúnmente presentes en la miel, no obstante, no se detectaron polimorfismos a nivel intra-especie en las cepas de *P. larvae* de distintas regiones geográficas cuando se emplearon las endonucleasas (*AluI*, *MspI*, *HaeIII*, *CfoI*, *RsaI* y *TaqI*).

Los resultados mostraron que la restricción del amplicón de una parte del 16S rDNA de *P. larvae* con las enzimas *HaeIII* o *MspI*, generaron patrones únicos aún cuando las cepas provinieron de distintos orígenes geográficos (n= 40). Estas endonucleasas permiten diferenciar a *P. larvae* del resto de las especies de *Paenibacillus*, y también de los *Bacillus* y géneros afines comúnmente presentes en miel. Adicionalmente, la enzima *HaeIII* permitió diferenciar dentro de la colección de aislamientos de *P. larvae*, al grupo ex *pulvificiens* revelando dos patrones distintos y diferentes a su vez del resto de las bacterias estudiadas.

Tabla 9: Polimorfismos de restricción por longitud de los fragmentos (RFLP) resultantes de la amplificación por PCR con los *primers* U1/U2 empleando 7 enzimas de restricción y distintas cepas de *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Lysinibacillus* y *Virgibacillus*. Los patrones de restricción semejantes se designaron con la misma letra.

Cepas bacterianas	<i>AluI</i>	<i>MspI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>Hinf</i>	<i>CfoI</i>	<i>RsaI</i>	<i>TaqI</i>
<i>Paenibacillus larvae</i>							
ATCC 25745 USA	B	B	A	ASC*	A	A	A
PL113 Argentina	B	B	A	ASC	A	A	A
PL225 Argentina	B	B	A	ASC	A	A	A
PL295 EE.UU.	B	B	A	ASC	A	A	A
PL296 EE.UU.	B	B	A	ASC	A	A	A
PL 201 Italia	B	B	A	ASC	A	A	A
PL 203 Italia	B	B	A	ASC	A	A	A
PL212 Canadá	B	B	A	ASC	A	A	A
PL213 Canadá	B	B	A	ASC	A	A	A
PL228 Francia	B	B	A	ASC	A	A	A
PL230 Francia	B	B	A	ASC	A	A	A
PL252 España	B	B	A	ASC	A	A	A
PL254 España	B	B	A	ASC	A	A	A
PL284 Uruguay	B	B	A	ASC	A	A	A
PL286 Uruguay	B	B	A	ASC	A	A	A
PL289 Japón	B	B	A	ASC	A	A	A
PL290 Japón	B	B	A	ASC	A	A	A
PL56 Suecia	B	B	A	ASC	A	A	A
PL57 Suecia	B	B	A	ASC	A	A	A
PL29 N. Zelanda	B	B	A	ASC	A	A	A
PL31 N. Zelanda	B	B	A	ASC	A	A	A
PL90 Alemania	B	B	A	ASC	A	A	A
PL91 Alemania	B	B	A	ASC	A	A	A
PL68 Polonia	B	B	A	ASC	A	A	A
PL70 Polonia	B	B	A	ASC	A	A	A
CCM 4483 R. Checa	B	B	A	ASC	A	A	A
CCM 4485 R. Checa	B	B	A	ASC	A	A	A
PL301 Reino Unido	B	B	A	ASC	A	A	A
PL302 Reino Unido	B	B	A	ASC	A	A	A
PL100 Tunicia	B	B	A	ASC	A	A	A
PL 304 Bélgica	B	B	A	ASC	A	A	A
PL305 Bélgica	B	B	A	ASC	A	A	A
<i>Paenibacillus larvae</i> (ex. grupo <i>pulvificiens</i>)							
CCM 38	B	B	B	B	A	A	A
NRRL B-3688 (<i>syn.</i> ATCC 1353, NRRL B-3670)	B	B	B	B	A	A	A
NRRL B-14154	B	B	B	B	A	A	A
ATCC 25367	B	B	B	B	A	A	A
ATCC 25368	B	B	B	B	A	A	A
<i>Paenibacillus lentimorbus</i> NRRL B-2522	F	D	ASC	F	A	A	A
<i>Paenibacillus macquariensis</i> NRRL B-14306	B	D	D	D	A	C	A
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> NRRL B-14679	B	E	G	E	A	E	D
<i>Paenibacillus peoriae</i> NRRL B-14750	B	E	H	G	A	A	A

	<i>AluI</i>	<i>MspI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>Hinf</i>	<i>CfoI</i>	<i>RsaI</i>	<i>TaqI</i>
Cepas bacterianas							
<i>Paenibacillus curdlanolyticus</i> NRRL B-23243	J	E	-	K	E	D	B
<i>Paenibacillus kobensis</i> NRRL B-23299	D	J	I	B	G	B	E
<i>Paenibacillus dendritiformis</i> NRRL B-23299	N	E	E	C	A	B	C
<i>Paenibacillus lautus</i> NRRL NRS-666	B	E	G	D	A	A	A
<i>Paenibacillus validus</i> NRRL NRS-1000	N	E	E	C	A	B	C
<i>Paenibacillus alginoliticus</i> NRRL NRS-1347	H	D	J	J	D	C	B
<i>Paenibacillus chondroitinus</i> NRRL NRS-1351	B	D	D	H	A	B	A
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> NRRL NRS-1356	B	D	H	D	A	A	A
<i>Paenibacillus alvei</i>							
NRRL B-383	I	E	ASC	H	A	A	A
m437a, Argentina	I	E	ASC	H	A	A	A
m361, Argentina	I	E	ASC	H	A	A	A
<i>Paenibacillus amycoliticus</i> NRRL B-14940							
<i>Paenibacillus apiarius</i> ATCC 29575	B	E	ASC	ASC	A	C	A
<i>Paenibacillus macerans</i> ATCC 8244	A	H	C	B	B	D	B
<i>Paenibacillus pabuli</i> NRRL NRS-924	B	F	H	D	A	F	A
<i>Paenibacillus polymyxa</i> NRRL B-510	A	F	D	B	A	D	B
<i>Paenibacillus azotoformans</i> CCT-195	A	I	O	L	B	D	B
<i>Paenibacillus azotofixans</i> NRRL B-14372	G	F	H	G	A	A	A
<i>Paenibacillus chibensis</i> NRRL B-142	B	E	L	G	A	A	A
<i>Paenibacillus thiaminoliticus</i> ATCC 11377	A	D	C	C	B	D	B
<i>Paenibacillus popilliae</i> ATCC 14706	B	D	ASC	C	C	A	A
<i>Paenibacillus borealis</i> KK19 Finlandia	B	D	D	D	A	C	A
<i>Bacillus circulans</i> ATCC 4515							
<i>Bacillus cereus</i>							
ATCC 11778	D	E	E	C	A	B	C
m432 Argentina	D	E	E	C	A	B	C
m436 Argentina	D	E	E	C	A	B	C
<i>Bacillus coagulans</i> ATCC 35670							
<i>Bacillus licheniformis</i> NRRL B-1001	A	D	C	B	B	D	B
	D	D	C	B	A	D	B
<i>Bacillus megaterium</i>							
NRLL B-939	A	E	C	C	A	B	C
m412 Argentina	A	E	C	C	A	B	C
m440a Argentina	A	E	C	C	A	B	C
<i>Bacillus mycoides</i>							
ATCC 10206	K	E	K	C	A	B	C
m425, aRGENTINA	K	E	K	C	A	B	C
m440b Argentina	k	E	K	C	A	B	C
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792							
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061	D	E	E	C	A	B	C
	A	D	C	B	B	D	B
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 10783	A	D	C	B	B	D	B
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> ATCC 245	A	E	C	C	A	D	C
<i>Bacillus firmus</i> ATCC 8247	G	F	D	C	A	A	C
<i>Virgibacillus panthotenticus</i> ATCC 14576	L	E	M	B	F	G	C
<i>Brevibacillus laterosporus</i>							
CCT 31	M	G	N	C	A	B	B
BLA 168 Argentina	M	G	N	C	A	B	B

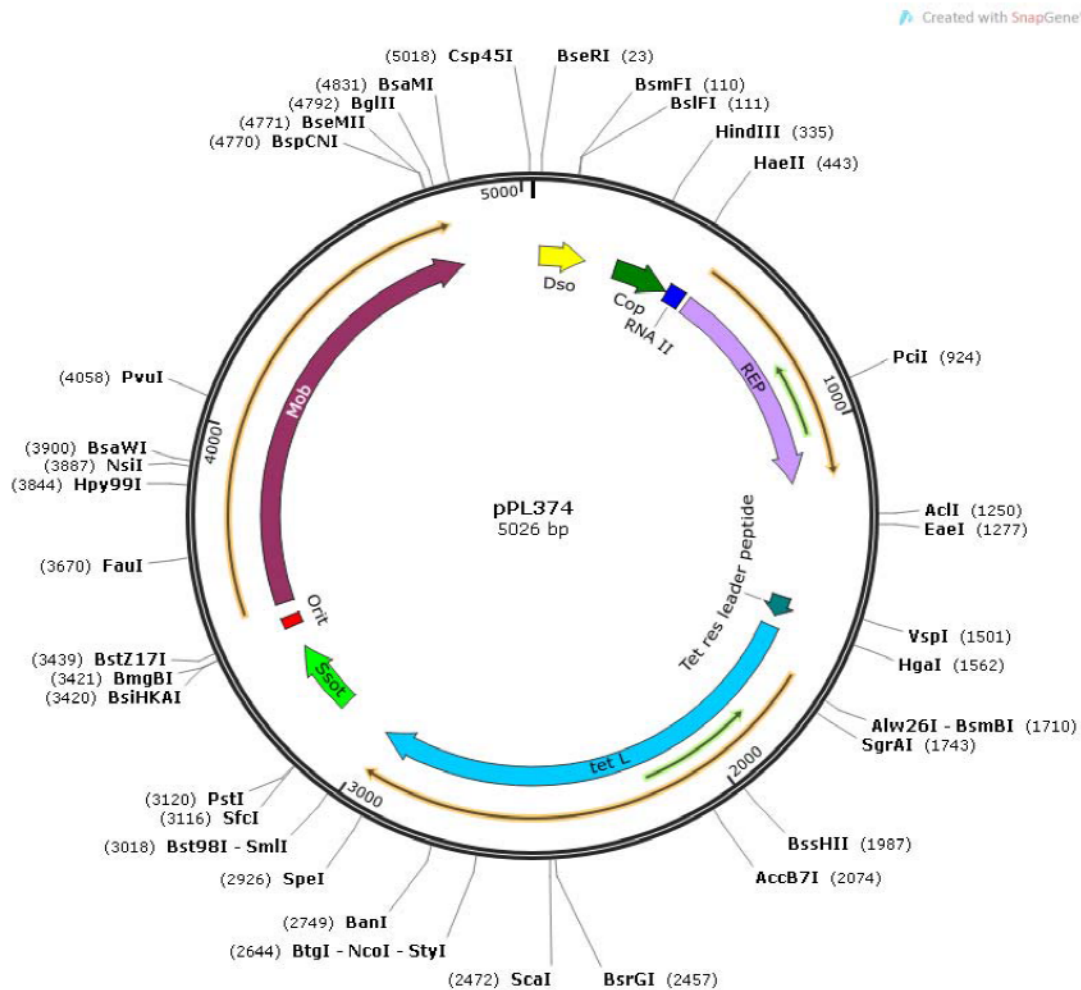
ASC*: Ausencia de sitios de corte

En cuanto a las comparaciones entre perfiles de rep-PCR y RFLP se observó que los 4 patrones de BOX-PCR observados (A, B, C y D) y los fingerprints ERIC-I y ERIC-II se correlacionaron con el perfil A obtenido por *Hae*III, mientras que las cepas de colección que mostraron un perfil BOX-E y un perfil ERIC-IV se correlacionaron con el perfil B obtenido con la endonucleasa *Hae*III. Lo mismo ocurrió con la enzima *Hinf*I dónde las cepas pertenecientes a los perfiles ERIC-IV y BOX-E mostraron un patrón B y las cepas con perfiles ERIC-I o ERIC-II y BOX-A, BOX-B, BOX-C y BOX-D no presentaron un sitio de corte con esta endonucleasa.

Nota: Los resultados de este capítulo se resumen en las siguientes publicaciones:

- **Alippi, A.M., Lopez, A.C., & Aguilar, O.M. (2002).** Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American Foulbrood of honeybees, by using PCR and restriction fragment analysis of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (7):3655-3660. USA, ISSN 0099-2240.
- **Alippi A.M., Reynaldi, F.J., López, A.C., De Giusti, M.R. & Aguilar O.M. (2004).** Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae larvae* and incidence of American Foulbrood in Argentinean honeys from Buenos Aires Province. *Journal of Apicultural Research* 43(3): 135-143. INGLATERRA. ISSN 0021-8839.
- **De Graaf, D.C. Alippi, A.M., Brown, M., Evans, J.D.; Feldlaufer, M., Gregorc, A., Hornitzky, M., Pernal, S.F., Schuch, D.M.T., Titèra, D., Tomkies, V. and Ritter, W. (2006).** Under the microscope. Diagnosis of American foulbrood disease in honeybees: A synthesis and proposed analytical protocols. *Letters in Applied Microbiology*, 43: 583-590. UK. ISSN 0266-8254.
- **de Graaf D.C., Alippi A.M., Antúnez K., Aronstein K.A., Budge G., De Koker D., De Smet L., Dingman D.W., Evans J.D., Foster L.J., Fünfhaus A., Garcia-Gonzalez E., Gregorc A., Human H., Murray K.D., Nguyen B.K., Poppinga L., Spivak M., Van Engelsdorp D., Wilkins S. & Genersch, E. (2013).** Review Article: Standard methods for American foulbrood research. *Journal of Apicultural Research* 52 (1). DOI 10.3896/IBRA.1.52.1.11. ISSN 0021-8839.

Capítulo V



Estudio de las bases genéticas de la resistencia a tetraciclina en las poblaciones de *Paenibacillus larvae*

Estudio de las bases genéticas de la resistencia a tetraciclina en las poblaciones de *Paenibacillus larvae*

1. Introducción

1.1. Control de Loque Americana mediante aplicación de antibióticos

En la mayoría de los países desarrollados la quema de colmenas es la única alternativa para el control de la loque americana, no obstante, existen distintos métodos para recuperar el material inerte como esterilización por radiación gamma, inmersión en parafina, desinfección con óxido de etileno, soda cáustica e hipoclorito de sodio (Matheson & Reid, 1992; Goodwin & Van Eaton, 1999).

El uso de antibióticos, junto con otras pautas de manejo integrado, que incluyen el mejoramiento genético de las abejas (Spivak & Gilliam, 1998a, 1998b; Spivak & Reuter, 2001), para el control de la enfermedad en colmenares con altos niveles de infección se emplea en países como Argentina, Estados Unidos y Canadá, mientras que en lugares como Nueva Zelanda o la Unión Europea su uso está totalmente prohibido.

En nuestro país, el tratamiento más difundido de los colmenares afectados consiste en la aplicación de oxitetraciclina, antibiótico que elimina los síntomas porque controla las formas vegetativas de la bacteria. De esta manera, la colmena se recupera y puede crecer y producir miel en forma normal, sin embargo las esporas, responsables del contagio y diseminación de la enfermedad no se eliminan con el antibiótico por lo que el período de protección es breve, ya que la enfermedad vuelve a desarrollar. Este fenómeno se conoce como recurrencia y obliga a repetir el tratamiento indefinidamente en la medida que reaparecen los síntomas. La quimioterapia resulta económicamente atractiva cuando la enfermedad se halla ampliamente diseminada en los colmenares de una zona (área endémica), pero no se recomienda cuando el número de colmenas afectadas es mediano o bajo (Bailey & Ball, 1991, Seeley, 1985). Existen 4 técnicas para realizar las aplicaciones de los antibióticos: espolvoreo, jarabe, pattie y sobre de papel (*paper pack*) (Morse & Shimanuki, 1990). Si bien existen modos de recuperar el material vivo como por ejemplo enjambrado artificial y cepillado (Del Hoyo *et al.*, 2001), el primero no es práctico para aquellos apicultores con un gran número de colmenas dado que es una técnica muy laboriosa y el segundo no pareciera ser totalmente efectivo dado que la prevalencia de esporas de *P. larvae* en mieles argentinas es muy alta (Ver Capítulo II, sección 4.4.).

La oxitetraciclina (como clorhidrato) y el sulfatiazol sódico fueron durante años los únicos antibióticos aprobados para el control de esta patología en las colmenas (Bailey & Ball, 1991; Morse & Shimanuki, 1990), sin embargo esto ha conducido al desarrollo de resistencia en Polonia (Glinski & Rzedzicki, 1977a; 1977b), Alemania (Plageman, 1991), Argentina (Alippi, 2000), EE.UU. (Miyagi *et al.*, 2000, Evans, 2003) y Canadá (Evans, 2003). En algunos países, como EE.UU. y Argentina, el empleo de sulfatiazol sódico se ha dejado de lado debido a su alta residualidad (más de un año) en miel y a la ocurrencia de casos de resistencia bacteriana. Paralelamente, el uso indiscriminado de oxitetraciclina, sobre todo en forma preventiva, genera ciertos riesgos como la reducción de la expectativa de vida media de las abejas (Charboneau *et al.*, 1992), alteraciones en la microbiota de la colmena con un sobredesarrollo de especies no deseables, la selección natural de cepas bacterianas resistentes (Alippi, 2000; Glinski & Rzedzicki, 1977; Kochansky *et al.*, 2001) y la contaminación de las mieles (Matsuka & Nakamura, 1990; Sporns *et al.*, 1986). Existe una discusión muy amplia sobre el uso de antibióticos para la prevención y el control de loque americana ya que además de lo expuesto anteriormente, se ha demostrado que los tratamientos preventivos con oxitetraciclina enmascaran los síntomas de la enfermedad con el consecuente riesgo de diseminación de la misma (Oldroyd *et al.*, 1989).

Recientemente, se aprobó el uso de tartrato de tilosina para su empleo en colmenas afectadas por loque americana en EE.UU. y Canadá siendo una alternativa efectiva debido a su baja toxicidad para las abejas y su baja residualidad en miel (Alippi *et al.*, 1999; 2005; Hitchcock *et al.*, 1970; Peng *et al.*, 1996). Paralelamente, se han estudiado otros antibióticos macrólidos, como la tilmicosina que también resultó efectiva para eliminar síntomas clínicos de la enfermedad a campo (Reynaldi *et al.*, 2008).

1.2. Resistencia a antibióticos en medicina veterinaria

Si bien el mayor problema del empleo de antibióticos en medicina veterinaria es la aparición y propagación de resistencia en las bacterias patógenas, un gran número de determinantes de resistencia se encuentra en microorganismos no patógenos (Mora & Wright, 2010). El desarrollo de resistencia ocurre debido a la presión selectiva ocasionada por el uso de antibióticos que favorece la transferencia horizontal de plásmidos conteniendo genes de resistencia. Es necesario establecer una diferenciación entre resistencia intrínseca y resistencia adquirida. La resistencia a un antibiótico puede ser intrínseca de una especie bacteriana o género (resistencia inherente o natural) que es la capacidad de una bacteria para desarrollar en

presencia de un agente antimicrobiano debido a una propiedad inherente del microorganismo. Por el contrario, la resistencia adquirida aparece en algunas cepas dentro de una especie naturalmente sensible al antibiótico y puede ser transmitida de forma horizontal entre ellas. La resistencia adquirida puede surgir ya sea por mutaciones en el genoma bacteriano o mediante la adquisición de genes adicionales que codifican para un mecanismo de resistencia (Mora & Wright, 2010). Estos cambios genéticos alteran las funciones de defensa de la bacteria por cambios en el sitio blanco del antibiótico, cambios en la permeabilidad de la membrana, por detoxificación o eyección del antibiótico o por una ruta metabólica alternativa (Poole, 2002).

En las comunidades microbianas, los determinantes de resistencia a antibióticos pueden transmitirse de forma vertical u horizontal. La transmisión vertical es la transmisión de un gen de resistencia en particular de una generación a otra y la transmisión horizontal es aquella donde la transferencia de material genético es llevada a cabo por al menos tres mecanismos conocidos: transformación, transducción y conjugación, los cuales se explicarán más adelante.

1.3. Resistencia a tetraciclinas

Las **tetraciclinas** constituyen un grupo de antibióticos de un amplio espectro en su actividad antimicrobiana. Químicamente son derivados de la naftacenocarboxamida policíclica, un núcleo tetracíclico de donde deriva el nombre del grupo (Figura 49).

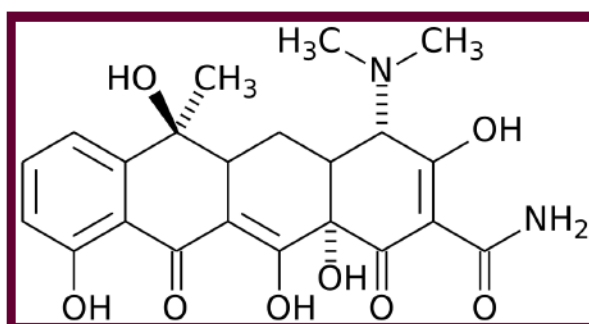


Figura 49: Estructura química de la tetraciclina

Las tetraciclinas inhiben, en forma reversible, la síntesis de las proteínas bacterianas al fijarse a la subunidad ribosómica 30s, donde bloquean el sitio aceptor del complejo ARN mensajero-ribosoma, impidiendo por ello la fijación del aminoacil ARN de transferencia (aminoacil t-RNA). Además de este mecanismo básico, las tetraciclinas pueden quelar el

magnesio necesario para que se produzca la unión ribosómica e inhibir algunos sistemas bacterianos, entre otros los implicados en la fosforilación oxidativa. A través de este mecanismo de acción, las tetraciclinas producen un efecto bacteriostático, aunque en ocasiones, si las bacterias son muy sensibles y la concentración alcanzada es elevada, pueden resultar bactericidas (Chopra & Roberts, 2001; Roberts, 2005; Roberts, 2011).

Hasta el presente, se han descrito tres tipos principales de mecanismos de resistencia a tetraciclinas en bacterias: eflujo de tetraciclina, protección ribosómica y modificación de la molécula del antibiótico (Chopra & Roberts, 2001; Roberts, 2005).

Eflujo activo: La disminución en la acumulación intracelular de tetraciclinas por bombeo activo asociado a la membrana (achique o eflujo) es un mecanismo que puede conferir resistencia a las tetraciclinas en un numeroso grupo de bacterias. El eflujo de proteína o eflujo activo intercambia un protón por el complejo tetraciclina-catión contra el gradiente de concentración y existen seis grupos de estas proteínas de membrana clasificadas por su identidad en las secuencias aminoacídicas (Chopra & Roberts, 2001; Roberts, 2005). Dentro del grupo 2 se han identificado 14 proteínas con motivos α -hélice trans-membrana que confieren resistencia a tetraciclina, en este grupo se incluye a los determinantes *tetK* y *tetL* que han sido citados en bacterias Gram positivas del género *Bacillus* y se encuentran codificados en pequeños plásmidos (4,4 – 4,7 Kpb) y/o transposones transmisibles que ocasionalmente pueden integrarse al genoma en especies como *B. subtilis* (Chopra & Roberts, 2001).

Proteínas de protección ribosomal: Otro mecanismo frecuentemente involucrado en la resistencia adquirida se debe a la presencia de proteínas citoplasmáticas de protección ribosomal que permiten actuar al aminoacil ARN-transfer en presencia de concentraciones de antibiótico que normalmente inhibirían la síntesis de éstas. Los mediadores involucrados en este mecanismo son proteínas como los determinantes *tetM*, *TetO* y *otrA* que reducen la susceptibilidad de los ribosomas a la acción de la tetraciclina.

Inactivación enzimática: También se ha observado, de forma excepcional, resistencia a tetraciclinas mediante inactivación enzimática en algunas bacterias anaerobias Gram positivas. Por ejemplo, el determinante *tetX* codifica una proteína citoplasmática de 44 KDa que modifica químicamente a la molécula de tetraciclina bajo la presencia de oxígeno y NADPH (Chopra & Roberts, 2001; Roberts, 2005).

Resumiendo, los dos primeros mecanismos están ampliamente distribuidos y los genes de resistencia correspondientes se adquieren vía plásmidos transferibles y/o transposones. Ambos mecanismos han sido observados tanto en bacterias Gram negativas como Gram

positivas. Hasta el presente, se han descrito 39 genes de resistencia a tetraciclina (*tet*) y oxitetraciclina (*otr*) que incluyen 26 genes que codifican proteínas de eflujo activo, 11 genes que codifican proteínas de protección ribosomal, 3 que codifican una enzima inactivante y un gen con un mecanismo de acción desconocido (Levy et al., 1999; Roberts, 1996; Roberts, 2005).

Todos los genes *tet* de eflujo codifican proteínas Tet asociadas a membranas que expulsan tetraciclinas de la célula, disminuyendo la concentración intracelular de la droga y, protegiendo de esta manera los ribosomas. Las proteínas de eflujo son las proteínas Tet mejor estudiadas. Los genes *tet* se encuentran tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas. El eflujo de tetraciclinas está mediado por bombas de eflujo dependientes de energía y sus proteínas son codificadas por los genes: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(I)*, *tet(J)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(Y)*, *tet(30)*, *tet(31)*, *tet(34)*, *tet(35)* y *tet(39)*, en Gram (-) y por *tet(K)*, *tet(L)*, *tetA(P)*, *tet(V)*, *tet(Z)*, *tet(33)*, *tcR3*, *otr(B)* y *otr(C)* en Gram (+) (Michalova et al., 2004). Últimamente se ha sido descrito un nuevo determinante de resistencia denominado Tet39 en cepas de *Acinetobacter* de origen hospitalario y ambiental (Agersö & Guardabassi, 2005).

Existen 11 genes *tet* que codifican proteínas de protección ribosomal. En condiciones normales, los ribosomas tienen una configuración y un funcionamiento estándar, que se alteran al penetrar el antibiótico. La unión al ribosoma produce un cambio conformacional que impide la elongación de la cadena polipéptica, deteniéndose la síntesis de proteínas. Las proteínas de protección ribosomal están codificadas por los genes *tet(O)*, *tet(M)*, *tet(S)*, *tet(Q)*, *tet(T)*, *tet(W)*, *tetB(P)*, *otr(A)*, *tet*, *tet(32)* y *tet(36)*.

Por otra parte, el mecanismo de resistencia a tetraciclina por inactivación enzimática comprende sólo tres genes: *tet(X)*, *tet(34)* y *tet(37)* (Chopra & Roberts, 2001; Michalova et al., 2004).

Aparte de los tres mecanismos más conocidos y estudiados detallados anteriormente, existen otros mecanismos desconocidos como el del gen *tet(U)* encontrado en un plásmido de *Enterococcus faecium*, dicho gen codifica la proteína TetU, una proteína más pequeña que las proteínas responsables de mecanismos de eflujo o de protección ribosomal y confiere resistencia a bajos niveles de tetraciclina y el gen *otr(C)* que no codifica ni para proteínas de protección ribosomal ni para eflujo y tampoco se ha determinado si su mecanismo es por inactivación enzimática y se halló en *Streptomyces* (Michalova et al., 2004).

Dentro de las bacterias Gram (+) los genes involucrados en el mecanismo de eflujo

activo incluyen el *tet(K)*, *tet(L)*, *tetA(P)*, *tet(V)*, *tet(Z)*, *tet(33)*, *tcr3* y el *otr(B)*. Todos estos genes están asociados con pequeños plásmidos movilizables, por ejemplo el gen *tet(K)* asociado al plásmido pT181 de *Staphylococcus aureus*; el gen *tet(L)* encontrado en pequeños plásmidos presentes en especies de *Bacillus* y géneros relacionados y también en diversas especies de *Staphylococcus* y *Streptococcus* y los genes *tet(Z)* y *tet(33)* encontrados en plásmidos de especies de *Corynebacterium* (Michalova *et al.*, 2004).

Los genes involucrados en el mecanismo de protección ribosomal se asocian normalmente con transposones conjugativos que tienen preferencia por el cromosoma (Roberts, 1997), si bien se considera que se originaron en bacterias Gram (+) también han sido hallados en una variedad de géneros de bacterias Gram (-) (Roberts, 1996). Entre ellos, el gen *tet(M)* es el más promiscuo en las bacterias Gram (+) y fue identificado por primera vez en especies de *Streptococcus* (Chopra & Roberts, 2001); el *tet(O)* se encontró en plásmidos conjugativos de *Campilobacter* y *Streptococcus*; el *tet(P)* en plásmidos conjugativos de *Clostridium* y los genes *otr(A)*, *otr(B)* y *otr(C)* en el género *Streptomyces* (Chopra & Roberts, 2001; Michalova *et al.*, 2004).

1.4. Transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos en bacterias

La transferencia horizontal de genes (THG) en las bacterias está mediada por elementos genéticos móviles, de los cuales, los plásmidos, los bacteriófagos y los elementos integrativos y conjugativos constituyen la vasta mayoría (Lorenzo Díaz *et al.*, 2012). El número de elementos móviles (denominado "mobiloma bacteriano") es cada vez mayor y está relacionado con que día a día se incrementa el número total de genomas bacterianos completamente secuenciados. Si bien existen cerca de 2.000 genomas completos de plásmidos depositados en el GenBank, su movilidad a nivel experimental sólo a sido probada en un número limitado de especies bacterianas, particularmente en especies Gram (-), ya que en el caso de los plásmidos de las bacterias Gram (+) hay mucha menor información publicada (Grohmann *et al.*, 2003).

Existen tres mecanismos principales a través de los cuales se puede realizar la THG: la transformación, la transducción y la conjugación. En el proceso de *transformación* la célula es capaz de adquirir fragmentos de ADN del medio que la rodea y posteriormente integrarlo a su propio genoma a través de recombinación homóloga o por transposición de fragmentos específicos del ADN adquirido. En el proceso de *transducción*, el ADN es introducido a la célula receptora con la ayuda de un bacteriófago que actúa de vector para la transmisión y,

finalmente, en el proceso de *conjugación* la transferencia se efectúa mediante un contacto célula-célula entre dos bacterias produciéndose la transferencia de ADN de la célula dadora a la receptora para lo cual debe existir un plásmido conjugativo en la cepa dadora. Si bien se desconoce la contribución relativa de estos tres mecanismos, se considera que la transferencia conjugativa es el mecanismo que ocurre más frecuentemente (Amábile-Cuevas & Chicurel, 1992; Salyers & Amábile-Cuevas, 1997). Esta hipótesis se basaría en que muchos de los genes de resistencia a antibióticos se han hallado en elementos móviles como plásmidos y transposones y que la conjugación permite al ADN moverse entre géneros y especies bacterianas diferentes, mientras que la transducción y la transformación normalmente están restringidas a ocurrir dentro de la misma especie.

1.4.1. Características generales de los plásmidos bacterianos

Los plásmidos son elementos de ADN bicatenario extracromosómicos, que replican de forma autónoma y controlada dentro de una célula huésped. Se han encontrado fundamentalmente en organismos procarióticos y en algunos eucariotas inferiores. La mayoría de los plásmidos caracterizados hasta la fecha son moléculas circulares de ADN, aunque también se han aislado formas lineales de éstos en algunas especies de bacterias Gram (+) y Gram (-) (Hinnebush & Tilli, 1993). Los plásmidos no son esenciales para la supervivencia de la célula hospedadora, excepto en determinados ambientes donde los genes plasmídicos le confieren alguna ventaja selectiva, como resistencia frente a determinados antibióticos o a metales pesados. En algunos casos, los plásmidos contribuyen con los procesos de fijación del nitrógeno atmosférico, formación de vacuolas de gas o degradación de compuestos químicos como tolueno y alcanfor. En otros casos, la síntesis de endonucleasas de restricción y de toxinas específicas del plásmido puede tener efectos negativos en el huésped, como por ejemplo, la inducción de tumores en plantas superiores como en el caso de las especies patógenas de *Agrobacterium* (Gelvin, 2010).

Desde el punto de vista medioambiental, los plásmidos bacterianos contribuyen ampliamente en la transferencia horizontal de genes entre diferentes microorganismos (ya sean de la misma especie o, dada la capacidad replicativa de algunos, entre especies distintas), promoviendo así la biodiversidad. Este hecho se basa en que muchos plásmidos poseen la información necesaria para movilizarse conjugativamente desde una cepa dadora a otra receptora.

1.4.2. Conjugación bacteriana

La rápida adquisición de rasgos adaptativos nuevos convierte a la conjugación en uno de los mecanismos más relevantes en la evolución bacteriana (De la Cruz & Davis, 2000) y su estudio puede ser clave para el diseño de nuevos fármacos capaces de inhibir este mecanismo de adquisición de resistencia a antibióticos.

En la *conjugación*, la transmisión de material genético es mediada por la transferencia de una molécula circular de ADN extra-cromosómico denominada *plásmido* que posee la capacidad de autoreplicarse. El proceso de conjugación requiere de la expresión de genes y de la presencia de regiones en el ADN del plásmido necesarios para su movilización (Loeza Lara *et al.*, 2004). Existen dos tipos diferentes de plásmidos que pueden ser transmitidos durante la conjugación, los *plásmidos conjugativos* y los *plásmidos movilizables* (Francia *et al.*, 2004).

Los *plásmidos conjugativos* se caracterizan por ser auto-transmisibles dado que contienen la información genética necesaria para codificar las proteínas involucradas en la formación del sistema de secreción. Estos plásmidos son capaces de transferirse no solamente entre cepas bacterianas de la misma especie sino que también pueden hacerlo entre grupos filogenéticamente alejados por lo que se los denomina también plásmidos promiscuos como es el caso de las familias de plásmidos F, R388, pKm101 y RP4 (Schröder & Lanka, 2005). Los *plásmidos movilizables*, por el contrario, no son capaces de auto-transmitirse y deben ser asistidos por plásmidos conjugativos coexistentes en la bacteria quienes les aportan las funciones conjugativas necesarias para su transmisión. Ejemplos de estos tipos de plásmidos pertenecen a las familias RSF 1010, CoIE1 y PMV158, entre otros (Francia *et al.*, 2004).

Los genes de los *plásmidos conjugativos* codifican en dos regiones diferentes las proteínas involucradas en el proceso de conjugación, la primera se denomina de replicación y transferencia de ADN (*DNA transfer and replication*) y la segunda de formación del par de unión (*mating pair formation*). Las proteínas de la primera región son las responsables de preparar la cadena de ADN a ser transferida y están involucradas en la formación del relaxosoma y su acoplamiento en el sistema de secreción; las proteínas de la segunda región constituyen el sistema de secreción y se encargan de formar el conducto transmembranal que conectará ambas células bacterianas (incluyendo el pili en las bacterias Gram negativas) y permite el pasaje de ADN. Para lograr su transferencia la molécula de ADN debe atravesar una serie de barreras que dificultan el pasaje, como por ejemplo la membrana interna hidrofóbica de las bacterias Gram (-), las nucleasas o la carga negativa de la membrana externa. Para lograr este objetivo las bacterias han desarrollado una compleja maquinaria molecular constituida por

diferentes componentes multiproteicos que se agrupan en tres módulos funcionales diferentes: i) el relaxosoma, ii) el conducto trans-terminal y iii) la proteína de acoplamiento. El *relaxosoma*, constituido por una proteína relaxasa/helicasa, inicia el proceso de transferencia mediante el corte específico de un enlace fosfo-diéster de la cadena de ADN en el origen de transferencia de la misma (*oriT*). El *conducto trans-membranal* constituye el sistema de secreción propiamente dicho a través del cual pasará la cadena de ADN el cual se conecta con el relaxosoma mediante la proteína de acoplamiento; este conducto pertenece a la familia de los sistemas de secreción tipo IV (Juhas *et al.*, 2008). Aunque han sido propuestos varios modelos que intentan explicar como la cadena de ADN, unido covalentemente a la relaxasa, es translocado a través de este conducto, aún se desconocen los detalles precisos de este proceso a nivel molecular.

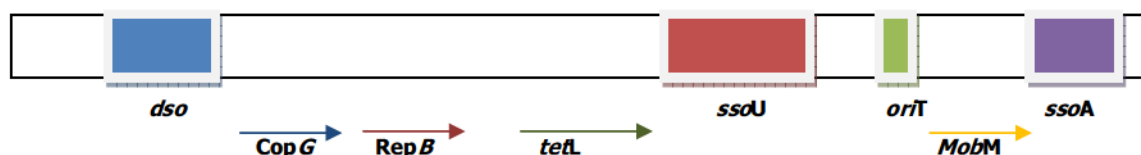


Figura 50: Esquema de la organización genética del plásmido pVM158 dónde se diferencian cuatro regiones: La región de control de la replicación (LIC) que comprende el *dso* (*double strand origin*), y codifica las proteínas *CopG* y *RepB*; la región de resistencia a tetraciclina (DET) que está dada por la proteína *tetL*, la región de movilización (MOB) que codifica la relaxasa *MobM* y la región del origen de replicación que contiene dos orígenes de replicación simple hebra (*ssuU* y *ssaA*).

Para esquematizar un plásmido movilizable, se tomará como ejemplo el plásmido pMV158 aislado de la bacteria Gram (+) *Streptococcus agalactiae*, representante prototípico de la superfamilia de plásmidos pMV158 (Francia *et al.*, 2004). Este plásmido puede ser movilizado por un amplio rango de bacterias hospedantes que contengan plásmidos conjugativos. Genéticamente, el pMV158 y, en general todos los plásmidos que replican por círculo rodante, poseen 4 regiones claramente diferenciadas en módulos: **i) LIC: Leady strand Initiation and Control** que contiene toda la información necesaria para iniciar la replicación: el origen de replicación doble hebra (*dso-double-strand origin*) y los genes *Cop* y *Rep* que en el pMV158 son *CopG* y *RepB*; **ii) DET:** Que contiene un determinante de resistencia a antibiótico, que en el pMV158 corresponde a resistencia a tetraciclina que está dada por la proteína *tetL*, **iii) MOB:** Que está compuesta por la secuencia de iniciación de la transferencia (*oriT*) y la región de movilización del plásmido (genes *mob*) que en el pMV158 codifica la relaxasa *MobM* y **IV) Uno o dos orígenes de replicación simple hebra (*ssos*),** que en el pMV158 son *ssuU* y *ssaA* (Espinosa, 2013) (Figuras 50 y 51).

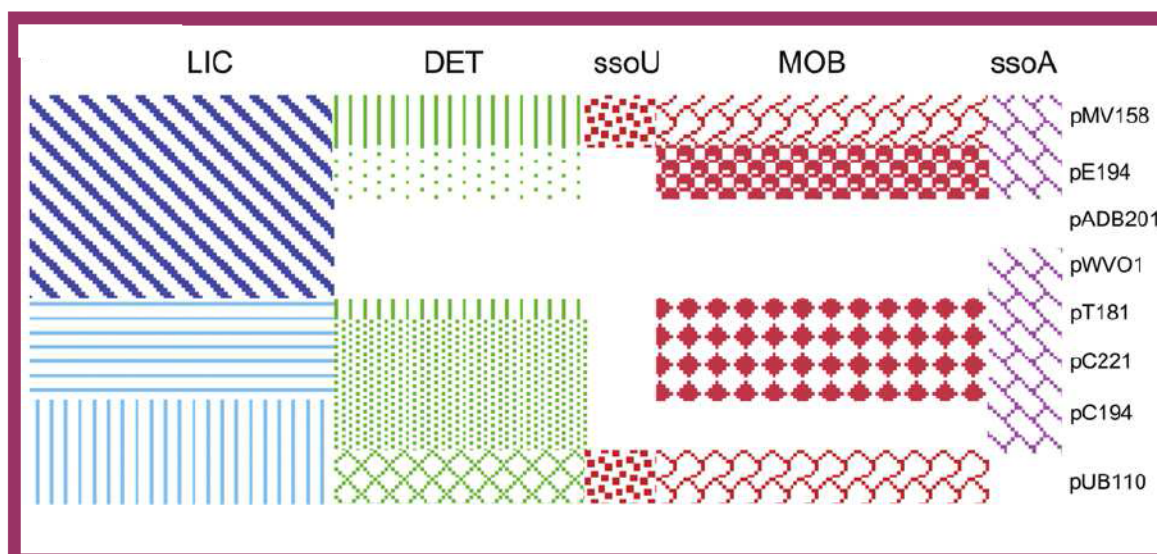


Figura 51: Representación esquemática de la organización modular de los plásmidos RCR: Organización de plásmidos representativos de diferentes familias: pMV158 de *S. agalactiae*, pE194 de *S. aureus*, pADB201 de *M. mycoides*, pWVO1 de *L. lactis* y pT181, pC221, pC194 y pUB110 de *S. aureus*. Los plásmidos que comparten *cassettes* de genes similares se muestran con diferentes colores y rellenos. Los módulos son: LIC: Leading strand initiation and control; DET: determinante de resistencia a antibiótico; MOB: Módulo compuesto por el oriT y los genes mob; sso: Orígenes de replicación simple hebra (*single strand origin*). Tomado de Garcillán-Barcia, 2013.

1.4.3. Replicación plasmídica

La replicación y el mantenimiento de los plásmidos en la población se efectúa independientemente del cromosoma bacteriano, aunque bioquímicamente dependen de varias proteínas codificadas por él. Están presentes en un número de copias determinado y controlan su propia replicación mediante la codificación de un sistema que regula la iniciación. En muchos casos, sobre todo si se trata de plásmidos de bajo número de copias, poseen sistemas de estabilización, que le aseguran un reparto equitativo entre las células hijas durante la división celular.

La replicación es el mecanismo mediante el cual las moléculas de ADN se dividen para formar moléculas idénticas a las originales. Este proceso es clave para la estabilidad del plásmido en su célula huésped. Los mecanismos de replicación conocidos basan sus diferencias en el modo de iniciar la replicación y en las distintas estructuras que adoptan los intermediados replicativos. Existen cuatro mecanismos generales de replicación plasmídica: i) Replicación tipo theta, ii) Replicación por desplazamiento de hebra, iii) Replicación dirigida por proteínas terminales y iv) Replicación tipo círculo rodante. Esta última será analizada en mayor detalle ya que es la utilizada por los plásmidos encontrados en *P. larvae* objeto de nuestro trabajo.

La *Replicación tipo círculo rodante* (RCR) es característica de plásmidos de pequeño tamaño y alto número de copias de bacterias Gram (+). La replicación de estos plásmidos se realiza de un modo unidireccional asimétrico, ya que la síntesis de la cadena líder y retrasada están desacopladas. Esta característica permite dividir su estudio en dos etapas claramente diferenciadas: la *síntesis de la cadena temprana* y la *síntesis de la cadena tardía* (Loeza Lara *et al.*, 2004). El desacoplamiento entre la síntesis de ambas cadenas de ADN requiere que en estos plásmidos existan dos orígenes de replicación diferentes, que garanticen el inicio de cada una de ellas: el origen de replicación de la cadena temprana o líder o de doble hebra (*dso*) y el origen de replicación de la cadena retrasada o de simple hebra (*ss0*), desde el cual tiene lugar la síntesis de la cadena complementaria del plásmido. En el caso de la RCR, tanto la cadena líder como la cadena retrasada son sintetizadas de manera continua sobre el ADN molde, a partir de sus respectivos orígenes de replicación.

La característica que distingue un plásmido que replica vía RCR, es la generación de intermediarios de ADN monocatenario durante su proceso replicativo (te Riele *et al.*, 1986). Otra característica común, es la organización funcional y estructural de su genoma. Se ha propuesto que estos replicones están constituidos por módulos de genes intercambiables entre los diferentes plásmidos (Projan & Novick, 1988). El orden relativo de estos módulos es variado en cada caso, mientras que la dirección en que se transcriben sus genes principales suele ser la misma en todos los plásmidos y coincidente con la de síntesis de la cadena de doble hebra. Uno de estos módulos (**LIC**) está siempre presente dado que contiene las funciones esenciales para la iniciación y control de la replicación del plásmido (del Solar *et al.*, 1993). Como se explicó anteriormente para el plásmido pMV158, existen otros tres módulos principales que pueden estar o no presentes: **(a) DET**, que incluye uno o más determinantes de resistencia a antibióticos, **(b) MOB/PRE**, que contiene un gen involucrado en la movilización conjugativa y recombinación del plásmido y **(c) SSO**, que posee el sitio de iniciación de la cadena complementaria y se encuentra en todos estos replicones (Espinosa, 2013). Basándose en la homología de la secuencia del ADN en la región **LIC**, se definieron cinco familias de plásmidos que replican vía CRC, denominadas según la nomenclatura de un plásmido característico dentro de cada una: **pT181** de *Staphylococcus aureus*, **pLS1** de *Streptococcus agalactiae*, **pC194** de *S. aureus*, **pmV158** de *S. agalactiae* y **pSN2** de *S. aureus*, respectivamente.

1.5. Plásmidos de *Paenibacillus larvae*

Existen pocas referencia bibliográficas sobre la existencia de plásmidos en *Paenibacillus*

larvae. Benada y col. (1988) observaron por primera vez la presencia de plásmidos en *P. larvae* y los caracterizaron por tamaño y estabilidad. De un total de 12 aislamientos analizados, en tres de ellos encontraron plásmidos del mismo tamaño determinando su masa molecular en 5,72 Mdal (aproximadamente 9,4 kb). Adicionalmente buscaron si la presencia de dichos plásmidos estaba correlacionada con alguna propiedad especial, para lo cual determinaron si las cepas bacterianas que contenían estos plásmidos poseían resistencia a antibióticos (oxitetraciclina, tetraciclina, tilosina, kanamicina, penicilina, oxacilina, estreptomicina, gentamicina, eritromicina, vancomicina, lincomicina, novobiocina y varias sulfamidas) o a metales pesados (nitrato de cadmio y bicloruro de mercurio) y las compararon con cepas libres de plásmidos, concluyendo que se trataba de plásmidos crípticos, ya que no pudieron asignarles ninguna función específica (Benada *et al.*, 1988). Continuando con el trabajo anterior, construyeron mapas de restricción de dos de estos plásmidos crípticos, a los cuales denominaron pBL423 y pBL728, confirmando un alto porcentaje de identidad entre ambos, considerándolos idénticos junto con el pBL317 analizado previamente. A partir de los mapas de restricción corroboraron su tamaño en aproximadamente 9 kb (Bodorova-Urgosikova *et al.*, 1992) y consideraron que los tres compartían el mismo origen evolutivo.

Por su parte, Neuendorf y col. (2004) hallaron dos plásmidos crípticos de un tamaño de 9,4 y 11 kb, respectivamente a los cuales denominaron pPII9.4 y pPII11.0. Ambos plásmidos estaban asociados únicamente con un genotipo específico AB determinado por rep-PCR y, con excepción de una cepa de *P. larvae* en la cual estaban presentes los dos, las restantes (n=25) contenían uno u otro. Dichos autores construyeron mapas de restricción y encontraron la presencia de un sitio *Xba*I y diferencias en los tamaños de los plásmidos con respecto a las observaciones de Benada y col. (1988) y Bodorova-Urgosikova y col. (1992) ya que el plásmido denominado pPII9.4 (Neuendorf *et al.*, 2004), tenía un tamaño de 9,4 kb y un sitio *Xba*I que no poseían los descriptos por los autores checos en sus plásmidos pBL423, pBL728 y pBL317 (Benada *et al.* 1988; Bodorova-Urgosikova *et al.*, 1992). El segundo plásmido (pPII11.0) encontrado por Neuendorf y col. (2004), contenía un segundo sitio *Xba*I que generaba dos fragmentos, cuyas sumas daban un tamaño de aproximadamente 11 kb. Hasta ese momento ninguno de estos plásmidos de *P. larvae* pudo asociarse con resistencia a antibióticos ni tampoco se determinaron sus secuencias completas de ADN, sólo sus mapas de restricción. Evans (2003) hipotetizó que existían distintos tipos de resistencia a oxitetraciclina en las poblaciones de *P. larvae* y que algunos de estos tipos podría estar conferida en algún tipo de plásmido y esta a su vez transmitirse en forma horizontal.

Posteriormente, Murray y col. (2006; 2007) secuenciaron en forma completa un plásmido aislado de una cepa de *P. larvae* resistente a OTC; dicho plásmido, de un tamaño de 5 kb, fue denominado pMA67 y contenía el gen *tetL*. (Murray & Aronstein, 2006; Murray *et al.*, 2007). A su vez, en otras 20 cepas resistentes también encontraron plásmidos del mismo tamaño, a los que consideraron similares. Clasificaron al pMA67 dentro de la superfamilia de plásmidos pMV158 (Francia *et al.*, 2004) que replica por el mecanismo RCR. Adicionalmente, dichos autores (Murray & Aronstein, 2006), hallaron otros tres plásmidos, de mayor tamaño que el pMA67, aparentemente distintos entre sí, pero no los caracterizaron ni efectuaron mapas de restricción. Por último, Djukic y col. (2014) encontraron dos plásmidos de 9,7 kb cada uno en dos cepas de *P. larvae* de diferentes genotipos ERIC, dichos plásmidos presentaban una alta homología y contenían el gen de origen de replicación *rep*.

Hasta el momento, y con excepción de los trabajos de Murray y col. (2006, 2007) y los presentados en esta tesis, no se han informado estudios acerca de los mecanismos moleculares de la resistencia a tetraciclina y oxitetraciclina en *P. larvae*.

2. Objetivos Específicos

- 2.1. Analizar la sensibilidad/resistencia a tetraciclina en poblaciones de *P. larvae* de distintos orígenes geográficos.
- 2.2. Investigar los determinantes de resistencia a tetraciclina en las poblaciones de *P. larvae*.
- 2.3. Caracterizar plásmidos aislados de cepas de *P. larvae* y efectuar correlaciones entre presencia de plásmidos transferibles y resistencia a tetraciclina.
- 2.4. Analizar las secuencias completas de dichos plásmidos y efectuar comparaciones con otros plásmidos similares presentes en bacterias Gram (+).

3. Materiales y Métodos

3.1. Determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas de tetraciclina mediante el método de dilución en agar.

Para determinar las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) mediante el método de dilución en agar se emplearon como medios basales agar MYPGP y agar Iso-Sensi-Test® (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) dado que *P. larvae* no desarrolla o lo hace muy

pobremente en agar Müller-Hinton (MH) que es el recomendado por el CLSI (US Clinical Laboratory Standard Institute) (CLSI, 2006a; 2006b) para las pruebas de sensibilidad a tetraciclina.

Las soluciones madre de tetraciclina (Sigma Chemical CO., Sigma-Aldrich, CHEMIE, Steinheim, Germany) se prepararon empleando como solvente etanol de 96° (Soria, Argentina) y se mantuvieron en freezer a -20 °C hasta su uso. Para preparar las soluciones madre (SM) se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Peso de Tc [en mg]} = \frac{\text{Volumen de SM [ml]} \times \text{Concentración de SM } [\mu\text{g/ml}]}{\text{Potencia } [\mu\text{g/ml}]}$$

Por ejemplo, para preparar 100 ml de una SM de 5000 µg/ml de Tc con una potencia de 977 µg/ml, se pesaron 51,17 mg (0,051 g) de antibiótico. Entonces tomando 20 µl de esa SM y diluyéndolos en 100 ml de medio de cultivo se obtiene una concentración de antibiótico en la Placa de Petri de 1 µg/ml.

Los frascos conteniendo el medio de cultivo MYPGP o agar Iso-sensi test previamente esterilizados fueron mantenidos a 45 °C hasta la incorporación de las soluciones de Tc para obtener el siguiente gradiente de concentraciones crecientes en las placas: 0,0625 - 0,125 - 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32 - 64 y 128 µg/ml. Como controles se emplearon ambos medios de cultivo sin el agregado de Tc.

La preparación del inóculo bacteriano se efectuó a partir de cultivos de *P. larvae* de 24-48 h de incubación en MYPGP a 36 °C ± 1 como suspensiones en agua destilada estéril, ajustadas a una concentración 1 de la escala Mc Farland ($A_{620\text{nm}}=0.4$). Antes de efectuar las suspensiones, se verificó que todas las cepas presentaran un porcentaje superior al 95 % de células vegetativas mediante conteos con microscopio con contraste de fase (Leica ICC50).

Para el control de calidad se empleó la cepa de referencia *Staphylococcus aureus*, ATCC 29213) y se siguieron las especificaciones del CLSI pero empleando agar MYPGP o Iso-Sensi Test en reemplazo de MH. En todos los casos, se efectuaron 2 repeticiones por cada cepa y por cada concentración, sembrando 15 gotas de 10 µl cada una por placa. Las placas se incubaron en posición invertida a 36 °C ± 1 y las lecturas se efectuaron a las 48 h para *P. larvae* y a las 24 h para *S. aureus* ATCC 29213 tomando el valor de CIM como la menor concentración de Tc que inhibió el crecimiento bacteriano visible en la placa de cultivo.

Los puntos de corte empleados para diferenciar cepas resistentes de sensibles fueron:

Resistente: $\geq 16 \mu\text{g/ml}$; **Intermedio:** entre 4 y 8 $\mu\text{g/ml}$ y **Sensible:** $< 4 \mu\text{g/ml}$.

3.2. Determinación de resistencia/sensibilidad a tetraciclinas mediante la técnica de difusión en disco

La metodología usada fue la propuesta por Bauer *et al.* (1966), con modificaciones para test de sensibilidad antimicrobiana con discos (antibiograma). La prueba del antibiograma de todos los antibióticos se realizó usando el medio MYPGP (Dingman & Stahly, 1983) como medio basal.

Preparación del medio de cultivo: El medio de cultivo se fundió en autoclave durante 40 minutos y se enfrió a 50 °C. Una vez alcanzada dicha temperatura, se volcó en placas de Petri de vidrio estériles de 90 mm de diámetro dentro del banco de flujo laminar. Cada Placa de Petri se llenó con un volumen de 25 ml de medio (equivalente a una altura de 4 mm desde la base de la placa) para asegurar una correcta difusión del antibiótico. Se controló la humedad de las placas antes de cerrarlas para que no se formara agua de condensación en la superficie.

Preparación del inóculo bacteriano: La preparación del inóculo bacteriano se efectuó a partir de cultivos de *P. larvae* de 24-48 h de incubación en MYPGP a 36 °C \pm en aerobiosis. Se seleccionaron varias colonias de la placa de cultivo y se suspendieron en tubos tapa a rosca conteniendo 4 ml de agua destilada estéril. La inoculación bacteriana se ajustó hasta equilibrar el valor de 1 de la escala de Mc Farland ($A_{620\text{nm}} = 0,5$). Con esta concentración bacteriana se logró un crecimiento semi-confluyente necesario para llevar a cabo el antibiograma. Previamente se comprobó que cada suspensión presentara un porcentaje mayor del 95% de células bacterianas vegetativas.

Inoculación de las placas: Las placas se sembraron antes de que transcurrieran 15 min de la preparación del inóculo. Cada tubo se agitó vigorosamente en vortex y la muestra se tomó con un hisopo de algodón estéril apretándolo contra las paredes del tubo para escurrir el exceso de líquido. El hisopado se sembró en tres direcciones distintas de la placa de Petri. Al finalizar, las placas se dejaron secar con la tapa abierta en el banco de flujo laminar para que el exceso de humedad se absorbiera –no más de 15 min–

Aplicación de los discos con concentraciones seleccionadas de antibiótico: Se emplearon discos comerciales (Oxoid, Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) conteniendo 5 μg de Tc; 30 μg de Tc; 30 μg de OTC y 30 μg de Mn respectivamente. Los discos se mantuvieron en freezer de –20 °C y se colocaron a temperatura ambiente 10 min antes de usar. Se colocaron dos discos por

placa a una distancia equidistante entre sí y del borde de la placa y aplicando ligera presión con pinza histológica flameada. Las placas sembradas y con los discos colocados se llevaron a estufa y se incubaron a 37 °C durante 48 h. Al cabo de ese tiempo se midieron los diámetros de la zona de inhibición (incluyendo el disco) mediante un calibre.

Como controles de referencia se emplearon las cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922 (provistas por el Servicio de Antimicrobianos del Instituto Malbrán, Buenos Aires, ARGENTINA). Para todas las cepas control de referencia se procedió de la forma antes detallada pero ajustando la concentración bacteriana a un valor de 0,5 de Mc Farland y se evaluaron al cabo de 24 h de incubación (CLSI, 2006a).

Los puntos de corte empleados para diferenciar cepas resistentes de sensibles fueron:

- Para discos de 5 µg de Tc: **Resistente:** Cuando el diámetro de los halos formados alrededor del disco fue ≤ 14 mm; **Intermedio:** Cuando el valor medido está entre 15 y 19 mm y **Sensible:** Cuando el diámetro de los halos formados alrededor del disco fue ≥ 20 mm.
- Para discos de 30 µg de Tc, OTC y Mn: **Resistente:** Cuando el diámetro de los halos formados alrededor del disco fue ≤ 14 mm; **Intermedio:** Cuando el valor medido está entre 15 mm y 18 mm y **Sensible:** Cuando el diámetro de los halos formados alrededor del disco fue ≥ 19 mm.

3. 3. Incubación en presencia de tetraciclina

Para determinar si la resistencia a Tc en las poblaciones de *P. larvae* podía ser inducible, se tomaron aquellas cepas que dieron valores de CIM dentro del rango intermedio (entre 4 y 8 µg/ml de Tc) y se incubaron en presencia de Tc. Las colonias bacterianas individuales se transfirieron a agar MYPGP con una concentración final de 4 µg/ml de Tc y se incubaron durante 24-48 h a 37 °C ± 1 . Las células bacterianas se suspendieron en agua destilada estéril y se concentraron por centrifugación. Una vez resuspendidas en agua destilada estéril, la concentración bacteriana se ajustó a un valor de 1 de la escala de Mc Farland y se procedió a determinar las CIM según lo explicado en 3.1. Las mismas cepas se sub-cultivaron 4 veces a intervalos de 48 h en agar MYPGP sin antibiótico y se volvieron a evaluar sus CIM comparando los nuevos valores con los obtenidos luego de la incubación en Tc.

3.4. Evaluación del método epsilométrico E-Test para la determinación de la sensibilidad a tetraciclina en *P. larvae*

El E-Test (Epsilometer-test) es una técnica cuantitativa para la determinación de la CIM de antibióticos y antifúngicos por dilución en agar como una alternativa sencilla y rápida a las determinaciones convencionales de CIM. El E-test consiste en una tira de plástico calibrada con una escala de concentraciones en $\mu\text{g/ml}$ y un código que identifica al antimicrobiano y, en la otra cara, un gradiente predefinido de concentraciones de antibiótico con 15 diluciones dobles seriadas. Este está calibrado para cumplimentar con los requerimientos de los métodos de referencia del CLSI. No obstante, para ciertas combinaciones de especies bacterianas y antibióticos, se han obtenido resultados controvertidos con relación a la técnica de referencia (Arroyo *et al.*, 2005; Mohamed *et al.*, 2002) así como no existen reportes de su confiabilidad con respecto a su uso para *P. larvae* u otras bacterias patógenas de abejas.

El objetivo de esta sección ha sido evaluar el desempeño diagnóstico del E-test comparándolo con el método de dilución en agar para la determinación cuantitativa de la sensibilidad/resistencia de *P. larvae* hacia tetraciclina y correlacionar las CIM obtenidas por ambos métodos comparando dos medios de cultivo: MYPGP y agar ISO-Sensi test (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England). Para lo cual, se seleccionaron 21 cepas dentro de la colección de aislamientos de *P. larvae* que presentaron variada sensibilidad a Tc y distintos perfiles de amplificación obtenidos por rep-PCR empleando cebadores BOX de acuerdo con lo detallado en el Capítulo IV, sección 3.5.

Las CIM mediante el método de dilución en agar se determinaron según lo detallado en la sección 3.1. empleando como medios basales agar MYPGP y agar ISO-Sensi-Test agar. Como controles se emplearon los mismos medios sin agregado de Tc. La preparación del inóculo bacteriano fue del mismo modo que lo explicado en 3.1. Para el control de referencia se empleó *S. aureus* ATCC 29213.

Para los ensayos empleando las tiras E-test, se siguieron las recomendaciones del fabricante (Biomérieux®) usando agar MYPGP o Iso-Sensi Test según el caso. Los medios de cultivo se volcaron en cajas de Petri de 9 cm de diámetro y la profundidad del medio se estandarizó a $4 \text{ mm} \pm 0,5 \text{ mm}$ (aproximadamente 25 ml para placas de Petri de 90 mm de diámetro) y se corroboró que estuvieran perfectamente secos en el momento de usar. El inóculo bacteriano se preparó de la manera descrita para el método de dilución en agar y, previa eliminación del exceso de líquido, se sembró uniformemente mediante un hisopo de algodón estéril, en tres direcciones de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Una vez

que la superficie del agar estuvo completamente seca y antes de transcurridos 15 min, se aplicó cada tira de E-test mediante pinzas estériles corroborando que todo el gradiente de antibiótico contactara con la superficie del agar evitando la formación de burbujas, efectuando dos repeticiones por cada combinación de medio y cepa bacteriana.

Las placas sembradas con *P. larvae* se incubaron en posición invertida a $36\text{ °C} \pm 1$ durante 48 h al cabo de las cuales se leyó el valor de CIM en el punto de intersección de la elipse de inhibición con la tira, para el control de referencia ATCC 29213 la lectura se efectuó a las 24 h.

Como el E-Test tiene un rango mayor de intervalo de concentraciones por gradiente, se reconocieron los siguientes puntos de corte: Resistentes (R) para valores de CIM $\geq 16\text{ }\mu\text{g/ml}$; intermedias (I) para valores de CIM entre 4 y $15\text{ }\mu\text{g/ml}$ y sensibles (S) para valores de CIM $< 4\text{ }\mu\text{g/ml}$. Para el análisis de los resultados, se consideró que había una concordancia completa cuando los valores de CIM obtenidos por ambos métodos (E-test vs. dilución en agar) sólo difirieron dentro del rango de $\pm 1\text{ log}_2$ de dilución o menos (Arroyo *et al.*, 2005). Se definió como concordancia global cuando los valores de CIM difirieron dentro del rango de $\pm 2\text{ log}_2$ de dilución y como concordancia de categoría cuando no hubo una modificación de la categoría clínica de las cepas, es decir que los resultados obtenidos por ambos métodos cayeron dentro de la misma categoría (R, S o I).

Para categorizar los errores, se consideró que los valores obtenidos por E-test cuyas interpretaciones difirieron con las del método de referencia [S vs. I, R vs. I, I vs. R, ó I vs. S] fueron considerados errores menores. Los resultados que fueron S por E-test y R por dilución en agar fueron interpretados como errores muy mayores (*very major*) o de falsa sensibilidad; y los R por E-test pero S por dilución en agar, como errores mayores o de falsa resistencia (Blanco *et al.*, 2008)

3.5. Análisis de contenido de plásmidos por la técnica de lisis *in situ* en geles de agarosa

Para la visualización de ADN plasmídico se utilizó la técnica de lisis *in situ* descrita por Eckhardt (1978), con las siguientes modificaciones: Las cepas de *P. larvae* se sembraron en tubos de vidrio con tapa de rosca de 5 ml conteniendo 4 ml de caldo MYPGP o Iso sensi-test adicionado con Tc a una concentración final de $8\text{ }\mu\text{g/ml}$ y se incubaron durante 24 hs a 37 °C en agitación constante (Nova Etica, Brasil). Luego de la incubación, se tomó 1 ml del cultivo y

se centrifugó a 8.000 \times g durante 10 minutos, al cabo de los cuales se descartó el sobrenadante y el *pellet* obtenido se resuspendió cuidadosamente en 1 ml de solución de sarkosil 0,3% p/v mantenido a 4 °C. La mezcla se centrifugó a 6.000 X g durante 10 minutos y el *pellet* resultante se resuspendió en 15 μ l de ficoll. La mezcla se mantuvo en hielo hasta el momento de sembrar. Paralelamente se preparó un gel de agarosa al 0.75%, en buffer TBE (Tris 89 mM, EDTANa₂ 2,5 mM, BO₃H₃ 89 mM, pH 8,2) y se dejó reposar durante 2 hs. Transcurrido ese tiempo, en cada una de las fosas se sembraron 25 μ l de SDS al 10% con colorante xilene xianol y se realizó una electroforesis con polaridad invertida a 100 V durante 8 minutos. Paralelamente, se preparó en hielo el buffer de lisis (Sacarosa 8%; Ficoll 2%; Tris 0,05M; EDTA pH 8.5 0,025M adicionado con 0,01g de lisozima (Sigma[®]). A cada muestra se le agregó 15 μ l de buffer de lisis y se homogenizó cuidadosamente manteniéndolas durante 15 minutos a 37 °C. Pasado ese tiempo se sembraron 15 μ l por fosa y se realizó una electroforesis con polaridad normal a 30 V durante 25 minutos, y luego a 100 V durante 1 hora. El gel se tiñó con bromuro de etidio (1 μ g/ml - stock de 10 mg/ml) durante 20 minutos, se lavó con buffer TBE al 5% y se observó bajo luz UV. Para la documentación fotográfica se empleó una cámara digital Olympus (Camedia master 2.5) y el programa de adquisición de imágenes Digi Doc- it para la captura de las imágenes.

3.6. Extracción de ADN plasmídico a partir de un gel de agarosa

A partir de las corridas de los geles de lisis *in situ* detalladas en el punto 3.5. se seleccionaron las bandas de ADN plasmídico y se cortaron con bisturí estéril, se trasvasaron con la mínima cantidad posible de agarosa a un microtubo de 1,5 ml previamente pesado. Para la extracción se empleó el *kit* Highway[®] ADN PuriPrep-GP (Inbio, Argentina) y se continuó de acuerdo con las especificaciones del fabricante suspendiendo cada trozo de agarosa en buffer BGP a razón de 300 μ l de buffer cada 100 mg de gel. Brevemente cada tubo conteniendo el taco de agarosa y el buffer BGP se colocó en baño seco a 55 °C hasta disolución completa del gel y se mezcló por 2 min. Cada preparación se volcó en una mini-columna colocada sobre un tubo colector y se centrifugó a 10.000 X g durante 1 min descartando el filtrado y colocando nuevamente la mini-columna en el tubo colector. La columna se lavó con 600 μ l de buffer BW que contiene etanol y se centrifugó nuevamente descartando el filtrado. Este proceso de lavado se repitió dos veces más y luego de la última centrifugación se dejó evaporar completamente el etanol. La columna lavada se colocó en un nuevo Eppendorf y se agregó 50 μ l de agua bidestilada (70 °C – pH 8) en el centro, se dejó reposar 5 min y se centrifugó 2 min a máxima

velocidad para recolectar el ADN en el microtubo. El ADN plasmídico así obtenido se guardó a -20 °C hasta su empleo.

3.7. Extracción de ADN plasmídico (Miniprep)

Adicionalmente, el ADN plasmídico de las cepas de *P. larvae* se extrajo empleando el *kit* comercial Qiaprep Spin Miniprep (Quiagen) con modificaciones a las recomendaciones del fabricante para optimizar la cantidad y calidad de ADN plasmídico en esta especie bacteriana.

Las cepas a probar, partiendo de un cultivo en activo crecimiento (24 h), se sembraron en 5 ml de caldo MYPGP suplementado con 16 µg/ml de Tc (Sigma) y se incubaron en agitación (240 r.p.m.) durante 16 h a 37 °C hasta una $DO_{600} = 0,8-1$. Los tubos se centrifugaron a 7.000 X g durante 15 min a 4 °C. Paralelamente se preparó un buffer con el reactivo *LyseBlue* en una proporción de 1 parte en 1000 (10 µl de *LyseBlue* en 10 ml de Buffer P1) al que se le agregó la sol. RNAsa A (provista por el fabricante) + 1 mg/ml de lisozima. El pellet bacteriano se re-suspendió en esta preparación en un tubo Eppendorf de 1,5 ml corroborando que no se visualizaran precipitados celulares luego de la re-suspensión del pellet. La mezcla se incubó a 37 °C durante 10 min, al cabo de los cuales se agregaron 250 µl de Buffer P2 y se mezcló delicadamente por inversión del tubo hasta que la solución aparecía viscosa, más clara y de color azul. En ese momento se agregó 350 µl de Buffer N3 y se mezcló invirtiendo el tubo suavemente de 4 a 6 veces hasta que la solución se tornó incolora. Los tubos se centrifugaron a 17.900 X g durante 10 min observando la formación de un pellet blanco y compacto. Paralelamente se colocó una columna *Quiaprep*[®] en un tubo colector y se aplicó con micropipeta el sobrenadante del paso anterior. Se centrifugó a 10.000 X g 60 s y se descartó el fluido que pasó por la columna. La columna se lavó con 500 µl de Buffer PB y se centrifugó a 10.000 X g durante 60 s y descartando el fluido de lavado. Este paso remueve la actividad de las nucleasas. Posteriormente la columna se lavó con 750 µl de Buffer PE y se centrifugó a 10.000 X g durante 60s, descartando el fluido de lavado y centrifugando a 10.000 X g durante 60 s más para eliminar el buffer de lavado residual. La columna lavada se colocó en un nuevo Eppendorf y se agregó 50 µl de agua bidestilada tibia (40 °C – pH 7) en el centro, se mantuvo 1 min y se centrifugó 1 min más a máxima velocidad. Las preparaciones se mantuvieron a -20°C hasta el momento de usar.

La concentración de ADN obtenida se midió con un espectrofotómetro UV/visible de doble haz (Jasco, Japón, modelo V630 Bio) a una $A_{260\text{ nm}}$ empleando una cubeta de cuarzo.

3.8. Investigación de genes de resistencia mediante la Reacción en cadena de la Polimerasa

Se investigó la presencia de los genes de resistencia a tetraciclina *tet(K)*, *tet(L)* y la combinación de *tet(K)* y *tet(L)* mediante PCR empleando cebadores específicos para estos genes según lo detallado en los trabajos de Pang y col. (1994) Ng y col. (2001), You y col. (2012) y Murray y Aronstein (2006) (ver detalles en la Tabla 10).

Tabla 10: Secuencia de los cebadores empleados, condiciones de ciclado y tamaño de los amplicones esperados

Cebadores	Blanco	Secuencia 5' → 3'	Ciclos de PCR	Tamaño del amplicón	Referencia
TetL -F TetL-R	<i>Tet(L)</i>	TCGTTAGCGTGCTGTCATTC GTATCCCACCAATGTAGCCG	5 min/94°C; 35 X (1min/94°C, 1min/55°C, 1.5 min/72°C); 10 min 72°C.	269	Ng <i>et al.</i> , 2001
TetK-F TetK-R	<i>Tet(K)</i>	TCGATAGGAACAGCAGTA CAGCAGATCCTACTCCTT	5 min/94°C; 35 X (1min/94°C, 1min/55°C, 1.5 min/72°C); 10 min 72°C.	169	Ng <i>et al.</i> , 2001
TKI - F TL32 -R	<i>Tet(K)/Tet(L)</i>	CAAACGGGTGAACACAG CCTGTTCCCTCTGATAAA	4 min/94°C; 35 X (1 min/94°C, 30s/45°C, 2 min/72°C); 10 min 72 °C.	1.048	Pang <i>et al.</i> , 1994
TetK-F TetK-R	<i>Tet(K)</i>	TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC GCAAACCTATTCCAGAAGCA	5 min/94°C; 35 X (45s/94°C, 1 min/56 °C, 1 min/72°C); 10 min 72 °C.	718	You <i>et al.</i> , 2012
TetL -F TetL-R	<i>Tet(L)</i>	GTTGCGCGCTATATTCCAAA TTAAGCAAACCTATTCCAGC	5 min/94°C; 35 X (45s/94°C, 1 min/52 °C, 1 min/72°C); 10 min 72 °C.	788	You <i>et al.</i> , 2012
PlarvTetL-F PlarvTetL-R	<i>Tet(L)</i> (consenso de secuencias)	GAACGTCTCATTACCTGA GAGTAGAAGATAGGACCA	4 min/94°C; 35 X (1 min/94 °C, 1 min/45 °C, 1 min/ 72 °C; 10 min 72 °C.	596	Murray & Aronstein, 2006

Los ensayos de PCR fueron realizados empleando un ciclador térmico Eppendorf Mastercycler Personal (Eppendorf, Alemania). La composición de las mezclas de reacción utilizadas fue, para un volumen final de 20 μ l, la siguiente: 1 X Buffer Promega; 0,48 μ M de cada uno de los cebadores, 200 μ M de cada dNTPs (2'-deoxirribonucleósidos 5-trifosfato); 3 mM MgCl₂, 1 U Taq DNA polimerasa (Promega, Corp.), 10 μ M de cada uno de los cebadores específicos y 15 ng de templado de ADN plasmídico extraído como se explicó en el punto anterior. Las condiciones de ciclado, las secuencias de los cebadores usados (FagosRuralex, Buenos Aires, Argentina) y los tamaños de los amplicones esperados se resumen en la Tabla 10.

Finalizada la reacción de PCR, 10 μ l del producto fueron sembrados en un gel de agarosa al 1,6 % p/v empleando una mezcla de gel loading buffer 6 X (Inbio Highway) con una gota de GelRed™ (Biotium, Inc.) por fosa de siembra. La separación de fragmentos se efectuó por electroforesis horizontal empleando buffer TBE (Tris 89 mM, EDTANa₂ 2,5mM; BO₃H₃ 89 mM, pH 8,2). El perfil de bandas obtenido fue fotografiado con una cámara digital Olympus (Camedia master 2.5) bajo iluminación ultravioleta (260 nm) utilizando un transiluminador (UPV) y el programa de adquisición de imágenes Digi Doc- it para la captura de las imágenes. Como patrones de peso molecular se emplearon *cien marker* [0,1 Kpb-1 Kpb] y/o *mil marker* [0,5 Kp - 10 Kpb] (Biodynamics, Bs. As., Argentina).

3.9. Tratamientos enzimáticos del ADN plasmídico

Las incubaciones con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas para cada enzima siguiendo las indicaciones de temperatura y *buffers* indicadas por las casas comerciales. Se utilizaron submuestras de 3 μ l de ADN plasmídico obtenido en 3.6. y 3.7. en un vf de 15 μ l para su tratamiento con las siguientes endonucleasas de restricción: *EcoRI*, *BglIII* y *NcoI* (Promega) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las mezclas de digestión se incubaron a 37 °C toda la noche. Luego de la incubación, los patrones de RFLP obtenidos se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,6 % y 0,8% en buffer TBE 5 X a 80 V durante 2 h y 30 min. Luego de la corrida el gel se tiñó con GelRed™ (Biotium, Inc.) y se visualizó bajo UV. Como patrones de peso molecular se emplearon *cien marker* [0,1 Kpb-1 Kpb] y/o *mil marker* [0,5 Kp - 10 Kpb] (Biodynamics, Bs. As., Argentina).

3.10. Secuenciación y bioinformática

Los templados de ADN de los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395 libres de impurezas

obtenidos por la técnica de Miniprep (Sección 3.7) fueron secuenciados en forma bidireccional mediante el servicio de secuenciación de GD Genomics, Shirley, NY empleando el analizador automático ABI 3730 xL de electroforesis capilar y el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977)

Las búsquedas de secuencias homólogas se efectuaron en las bases de datos del servidor GenBank mediante BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), BLASTn para aminoácidos y BLASTp para proteínas. Los alineamientos múltiples se realizaron mediante ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index>) o CLS Sequence Viewer, versión 6.8.2, CLS Bio A/S (<http://www.clcbio.com>). Los mapas físicos de los plásmidos se construyeron mediante el programa Snap Gene 2.0. Los análisis de filogenia molecular se efectuaron mediante el programa MEGA version 5 (Tamura *et al.*, 2011).

Para la búsqueda de secuencias de resistencia a antibióticos se empleó la base de datos ARDB (<http://ardb.cbc.umd.edu/blast/nblast/shtml>) – *antibiotic resistance gene database* y, para predecir la presencia de proteínas transmembrana se empleó el servidor TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

Para inferir las relaciones filogenéticas entre los plásmidos de *P. larvae* y otros plásmidos bacterianos conteniendo el gen de resistencia a tetraciclina *tetL* se efectuó un análisis de parsimonia basado en los alineamientos de las secuencias de aminoácidos completa de estos plásmidos empleando el programa MEGA (Tamura *et al.*, 2011). Para efectuar el análisis de parsimonia se emplearon búsquedas heurísticas de los árboles de mayor parsimonia mediante el algoritmo *branch swapping* y *tree-bisection-reconnection* tratando los gaps como datos perdidos. Para verificar la confiabilidad de los árboles obtenidos se efectuaron análisis de *Bootstrap* con 1.000 repeticiones. Como *out-group* se empleó la secuencia de aminoácidos del plásmido pSTE2 de *Staphylococcus lentus* que contiene el gen *tetK*.

3.11. Experimentos de conjugación

Se efectuaron experimentos de conjugación en medio líquido mezclando 400 µl de un cultivo de 48 h de la cepa salvaje *P. larvae* PL374 (Apéndice I) resistente a tetraciclina [PL374 Tc^R WT] en caldo MYPGP a una concentración del orden de 10⁸ cel/ml y 200 µl de un cultivo de 24 h en caldo MYPGP a una concentración del orden de 10⁸ cel/ml de la cepa de *Bacillus subtilis* WT m351 aislada de miel (Apéndice II) sensible a Tc como cepa aceptora [BSm351Tc^S]. Otro par de conjugaciones se efectuó empleando la cepa salvaje *P. larvae* PL373 (Apéndice I) resistente a Tc [PL373 Tc^R WT] como cepa dadora y la cepa *B. subtilis* GSY 1104 Tc^S como aceptora (Apéndice IV). Las mezclas se incubaron a 36 ± 1 °C durante 72 h sin mover. Para seleccionar

a los transconjugantes de *B. subtilis*, la mezcla se sembró en placas con MH suplementado con 8 y 10 µg/ml de Tc y se incubaron a 30 ± 1 °C durante 24 h. De esta forma se efectuó una doble selección: se incorporó al medio Tc, se empleó MH que no es apto para el desarrollo de *P. larvae* y se incubó a la temperatura óptima para *B. subtilis* a la cual *P. larvae* no desarrolla.

Para calcular la frecuencia de conjugación (FC) se empleó la siguiente fórmula:

$$FC = \frac{\text{No. de u.f.c. de Tc}^R \text{ transconjugantes}}{\text{No. de u.f.c. de la cepa dadora en la mezcla de conjugación}}$$

El número (No.) de u.f.c. de la cepa dadora se calculó sembrando 50 µl de diluciones seriadas (desde 10¹ a 10⁷) de la cepa dadora al momento de realizar la mezcla de conjugación.

La resistencia a Tc de los transconjugantes se corroboró mediante la determinación de sus CIM como se explicó en el punto 3.1, como así también realizando la búsqueda de determinantes de resistencia a Tc por PCR según lo detallado en 3.7. Los perfiles plasmídicos de los transconjugantes se observaron en geles de lisis *in situ* tipo Eckhardt según lo explicado en 3.5.

3.12. Experimentos de transformación por electroporación

Con el objeto de evaluar si la resistencia a Tc podía introducirse *in vitro* entre cepas de *P. larvae* a través de ADN plasmídico, se efectuaron experimentos de electroporación empleando los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL375 (obtenidos por Miniprep según se detalla en 3.6) y como cepa aceptora *P. larvae* NRRL B-14154 (Syn= LMG16250) que además de ser Tc^S (CIM= 0,016 µg/ml) posee un fenotipo de color rojo intenso a diferencia de las cepas PL373, PL374 y PL395 cuyas colonias en MYPGP son de color blanco-grisáceo (Capítulo II).

Se prepararon células electrocompetentes (CE) de la cepa B-14154 de acuerdo con la técnica descrita por Murray y Arostein (2008), con las siguientes modificaciones: A partir de un cultivo de 24 h desarrollado en agar MYPGP, se sembró una recolección con ansa calibrada (Britania, Argentina) en tubos tapa a rosca conteniendo 4 ml de caldo MYPGP y se incubó a 37 °C en agitador (Nova Etica, Brasil, modelo 430 RDB) bajo agitación constante a 110 r.p.m. durante 16 h hasta obtener un valor de OD₆₀₀=0,5. Las células bacterianas se cosecharon por centrifugación a 4.000 X g durante 20 min a 4 °C, en una centrífuga refrigerada Beckman-Coulter, EE.UU. (modelo Allegra 21R) y se lavaron de modo secuencial con 1, ½ y ¼ volúmenes

de una sol. de sacarosa 0,625 M. El *pellet* final se resuspendió en 1/500 del volumen inicial. Las CE así preparadas se almacenaron en alícuotas de 40 µl en tubos Eppendorff a - 80 °C (Ultra freezer Thermo Forma, EE.UU) hasta el momento de su uso.

Cada alícuota de 40 µl de CE se mezcló con 2 µl de cada preparación de ADN plasmídico de una concentración de 90 ng/ml en agua bidistilada y se incubó en hielo durante 15 min. La mezcla se transfirió a una cuveta de electroporación previamente enfriada y se sometió a una intensidad de pulso de 2,8 kV en un electroporador EC100 (E-C apparatus, EE.UU.). Posteriormente, se le adicionó a la mezcla 1 ml de caldo MYPGP agitando suavemente con el dedo, se transfirió a un tubo estéril con tapa a rosca y se incubó en agitación a 120 r.p.m. a 37 °C durante 18 h.

Las células transformadas se sembraron en placas de MYPGP adicionado con Tc (8 y 16 µg/ml) para seleccionar las colonias que fueron exitosamente transformadas en comparación con el control sembrado en MYPGP. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h en condiciones de aerobiosis y se contó el número de u.f.c. por placa.

Para calcular la eficiencia de transformación (ET) se empleó la siguiente fórmula:

$$ET = \frac{\text{No. de u.f.c. de los transformantes}}{\mu\text{g de ADN incorporado}}$$

y para el cálculo de la frecuencia de transformación (FT %) la siguiente:

$$(FT \%) = \frac{\text{No. de c.f.u. de los transformantes}}{\text{No. de c.f.u. de células viables totales}} \times 100$$

Se seleccionaron distintos transformantes de cada combinación cepa aceptora/plásmido para determinar sus valores de CIM como se detalló en el punto 3.1. comparándolos con los valores de CIM de la cepa aceptora y de cada una de las cepas dadoras de plásmido, respectivamente.

3.13. Estabilidad y curado de los transconjugantes y transformantes

Se ensayaron diferentes formas de curado de acuerdo con la cepa salvaje, transconjugante o transformante.

En el caso de la cepa dadora *P. larvae* PL374WT, se efectuó un curado por calor, subcultivando la cepa en agar MYPGP a $44\text{ °C} \pm 1$ a intervalos de 48 h. Luego del décimo pasaje, se seleccionaron colonias individuales y se determinó su resistencia/sensibilidad frente a Tc, OTC y Mn según lo detallado en 3.1 y 3.2. Los transconjugantes de las cepas de *B. subtilis* BSm351 y GSY 1104 se sometieron a un curado por calor a $45\text{ °C} \pm 1$ subcultivando las cepas en agar MH durante 10 días consecutivos; luego del décimo pasaje se seleccionaron colonias individuales y se determinó su resistencia/sensibilidad frente a Tc, OTC y Mn de acuerdo con lo detallado en 3.1 y 3.2. La cepa dadora PL373WT se sometió a un curado con naranja de acridina de acuerdo con lo especificado por Bernhard y col. (1978) pero empleando caldo MYPGP como medio basal con concentraciones finales de naranja de acridina de 0,01 – 0,02 y 200 $\mu\text{g/ml}$. La SM de naranja de acridina se preparó a una concentración de 2.000 $\mu\text{g/ml}$ y se esterilizó por filtración empleando un filtro millipore descartable de 0,22 μm de diámetro de poro y se guardó al abrigo de la luz. Se efectuaron diluciones en agua destilada estéril para incorporar al caldo de cultivo hasta obtener las concentraciones finales requeridas.

Todos los transformantes de la cepa *P. larvae* NRRL B-14154 se subcultivaron en agar MYPGP a $44\text{ °C} \pm 1$ a intervalos de 48 h. Luego del décimo pasaje, se transfirieron a tubos tapa a rosca conteniendo 5 ml caldo MYPGP suplementado con 200 $\mu\text{g/ml}$ de naranja de acridina y se incubaron a $44\text{ °C} \pm 1$ durante 48 h, al cabo de las cuales se sembraron en agar MYPGP y se seleccionaron colonias individuales que se evaluaron según su resistencia/sensibilidad frente a Tc, OTC y Mn de acuerdo con lo detallado en 3.1 y 3.2.

La estabilidad de los transconjugantes y transformantes se evaluó efectuando pasajes sucesivos en agar MYPGP sin agregado de Tc a intervalos de 24 h. Luego del pasaje No. 20, se determinaron sus valores de CIM comparándolos con los stocks (caldo MYPGP + 20% v/v de glicerol) mantenidos a -80 °C .

3.14. Comparación por rep-PCR de los perfiles *fingerprints* de las cepas dadoras, aceptoras, transconjugantes, transformantes y curados.

Para confirmar la identidad de todos los transconjugantes y sus respectivas cepas curadas se efectuó un análisis de sus perfiles de huellas digitales *fingerprints* comparándolas con sus respectivas cepas aceptoras empleando la técnica de rep-PCR según lo detallado en el Capítulo IV, Sección 3.5 empleando los cebadores BOX y ERIC. De la misma forma se compararon los perfiles de *fingerprints* generados por la cepa aceptora *P. larvae* NRRL B-14154 con los generados por sus respectivas cepas transformantes y curadas.

4. Resultados y Discusión

4.1. Determinación de las Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) mediante el método de dilución en agar

4.2. Determinación de resistencia/susceptibilidad mediante la técnica de difusión en disco

Para determinar el nivel de resistencia a tetraciclina de un conjunto de 84 aislamientos de *P. larvae* de distintos orígenes geográficos, se determinaron los valores de CIM de Tc y de diámetros de halos de inhibición con discos de 5 µg y de 30 µg los que se detallan en la Tabla 11. Las cepas control de calidad *P. aeruginosa* ATCC27853 (CIM=16 R), *S. aureus* ATCC 29213 (CIM = 0,5 S) y *E. coli* ATCC 25922 (CIM=1 S) presentaron valores de CIM en agar MYPGP dentro del rango de tolerancia aceptable de acuerdo con los standards del CLSI.

Del total de cepas analizadas, sólo 6 (7%) resultaron R (1 de Italia (con un valor de CIM de 16 µg/ml que se correspondió con una zona de inhibición de 13,25 ± 0,96 mm) y 5 de EE.UU. con valores de CIM de 32, 32, 64, 128 y 128 µg/ml, que se correspondieron con zonas de inhibición de 6,00 ± 0,00; 6,00 ± 0,00; 12,25 ± 0,96; 7,17 ± 0,63 y 9,50 ± 0,93 respectivamente, empleando discos de 5 µg de Tc (Tabla 11).

La distribución de la sensibilidad por CIMs de los aislamientos bacterianos analizados varió entre 0,062 y 128 µg/ml de Tc sugiriendo una distribución bimodal con dos sub-grupos que claramente difieren en su sensibilidad, con 76% de cepas S (CIM entre 0,062 y 2 µg/ml) y 24 % de cepas dentro del rango de la zona I y R (Figura 52). Las cepas I provenían en su mayoría de Argentina y las S cuyos valores de CIM resultaron los más bajos, de países europeos, lo cual es esperable, si el uso de antibióticos influye en la diseminación de la las cepas R, dado que en casi toda la UE está prohibido el uso de antibióticos en apicultura, mientras que en países como EE.UU., Canadá y Argentina, entre otros, es usual el empleo de OTC para el control de loque americana en las colmenas afectadas.

La correlación existente entre los valores de CIM y los diámetros de los halos de inhibición fue positiva en todas las cepas R y las S pero no así en las I, que por CIM caían en esta categoría pero al evaluar los diámetros de los halos de inhibición tanto en los discos de 5 como los de 30 se comportaron dentro del grupo S.

Tabla 11: Valores de CIM y de diámetros de los halos de inhibición (Promedio ± SD) de Tc

Cepa	CIM Tc (µg/ml)	Zona de diámetro de inhibición (mm) discos de 5 µg Tc	Zona de diámetro de inhibición (mm) discos de 30 µg Tc
PL3 Argentina	8	31,25 ± 1,19	56,50 ± 0,71
PL7 Argentina	4	27,12 ± 1,65	64,50 ± 0,71
PL8 Argentina	1	35,12 ± 0,85	45,00 ± 0,00
PL14 Argentina	0,5	53,12 ± 3,33	61,25 ± 0,35
PL15 Argentina	0,25	35,50 ± 2,38	48,00 ± 2,83
PL21 N. Zelanda	0,25	54,25 ± 1,19	68,00 ± 1,41
PL25 N. Zelanda	0,5	54,25 ± 1,19	66,50 ± 0,71
PL29 N. Zelanda	0,062	58,50 ± 1,73	60,50 ± 0,71
PL30 N. Zelanda	2	50,87 ± 0,85	67,75 ± 0,35
PL32 Argentina	1	31,50 ± 0,24	35,50 ± 0,71
PL33 Argentina	4	32,75 ± 1,50	65,50 ± 0,71
PL34 Argentina	1	30,38 ± 0,48	69,00 ± 1,41
PL35 Argentina	1	37,62 ± 1,38	43,75 ± 0,35
PL 41 Italia	0,25	39,63 ± 0,48	45,00 ± 0,00
PL42 Italia	16	13,25 ± 0,96	14,75 ± 0,35
PL44 Italia	0,5	46,50 ± 2,38	56,50 ± 0,71
PL45 Francia	0,125	55,75 ± 1,71	60,50 ± 0,71
PL49 Francia	0,125	56,25 ± 1,26	60,50 ± 0,71
PL51 Argentina	1	37,75 ± 0,96	42,50 ± 0,71
PL57 Suecia	0,25	40,75 ± 1,56	54,00 ± 1,41
PL58 Suecia	0,125	70,05 ± 0,99	76,50 ± 2,12
PL59 Suecia	0,125	45,63 ± 4,33	52,50 ± 0,71
PL64 Argentina	4	33,25 ± 0,96	63,00 ± 1,41
PL69 Polonia	0,5	50,62 ± 3,10	69,00 ± 0,00
PL71 Polonia	0,125	54,25 ± 0,29	62,50 ± 0,71
PL73 Polonia	1	53,50 ± 1,29	54,50 ± 0,71

Cepa	CIM Tc (µg/ml)	Zona de diámetro de inhibición (mm) discos de 5 µg Tc	Zona de diámetro de inhibición (mm) discos de 30 µg Tc
PL CMM 4483	0,125	36,37 ± 3,20	42,50 ± 0,71
PL CMM 4484	2	36,12 ± 0,85	44,00 ± 1,41
PL CMM 4485	4	34,88 ± 0,85	37,00 ± 2,12
PL78 Argentina	1	39,25 ± 1,32	43,50 ± 2,12
PL81 Argentina	2	36,53 ± 0,75	59,00 ± 1,41
PL85 EE.UU.	2	49,00 ± 1,83	60,00 ± 1,41
PL89 Alemania	0,125	47,25 ± 0,65	49,00 ± 1,41
PL90 Alemania	0,125	50,63 ± 0,48	64,50 ± 0,71
PL91 Alemania	0,125	42,75 ± 1,32	52,50 ± 0,71
PL95 Inglaterra	4	40,50 ± 0,41	52,00 ± 0,00
PL96 Inglaterra	0,50	52,50 ± 1,29	50,00 ± 0,00
PL97 Inglaterra	0,25	33,25 ± 2,06	43,50 ± 0,71
PL99 Argentina	4	27,50 ± 3,11	39,00 ± 1,41
PL100 Tunicia	4	41,12 ± 0,85	56,00 ± 1,41
PL ATCC 9545	0,125	47,75 ± 1,44	51,00 ± 0,71
PL102 Argentina	2	40,62 ± 1,25	53,50 ± 0,71
PL NRRL B-3555	0,125	41,25 ± 1,32	61,25 ± 0,35
PL ATCC 25747	0,25	42,38 ± 1,11	70,50 ± 0,71
PL155 Argentina	0,25	50,25 ± 1,56	59,00 ± 1,41
PL202 Italia	4	33,25 ± 0,65	44,50 ± 0,71
PL206 Argentina	4	45,88 ± 3,75	58,50 ± 0,71
PL212 Canadá	0,5	30,50 ± 0,71	44,50 ± 0,71
PL213 Canadá	8	19,45 ± 1,71	38,50 ± 0,71
PL214 Canadá	0,125	45,50 ± 1,96	67,00 ± 1,41
PL218 Argentina	4	39,25 ± 0,98	40,00 ± 0,00
PL221 Argentina	1	30,00 ± 1,41	47,00 ± 1,41
PL223 Argentina	1	41,62 ± 2,69	58,00 ± 1,41
PL228 Francia	0,062	58,50 ± 1,73	59,50 ± 0,71

Cepa	CIM Tc (µg/ml)	Zona de diámetro de inhibición (mm) discos de 5 µg Tc	Zona de diámetro de inhibición (mm) discos de 30 µg Tc
PL231 Francia	2	52,00 ± 0,82	67,00 ± 2,83
PL238 Argentina	4	36,00 ± 0,82	49,50 ± 0,71
PL252 España	0,062	47,50 ± 2,38	59,50 ± 0,71
PL253 España	0,5	49,12 ± 0,85	70,50 ± 2,12
PL255 España	0,125	46,75 ± 1,71	79,50 ± 0,71
PL284 Uruguay	1	38,00 ± 0,82	46,00 ± 1,41
PL286 Uruguay	1	48,63 ± 1,25	49,50 ± 0,71
PL287 Uruguay	0,5	49,88 ± 1,65	55,50 ± 2,12
PL289 (P41) Japón	1	40,25 ± 1,04	52,50 ± 0,71
PL290 (P55) Japón	1	32,50 ± 1,10	55,50 ± 0,71
PL295 EE.UU.	64	12,25 ± 0,96	15,00 ± 0,00
PL304 Bélgica	0,062	54,50 ± 1,43	56,75 ± 1,06
PL305 Bélgica	0,062	53,50 ± 3,81	60,75 ± 1,06
PL316 Argentina	4	30,38 ± 1,11	40,50 ± 0,71
PL318 Chile	2	47,50 ± 1,29	64,00 ± 1,41
PL319 Chile	0,062	51,38 ± 1,12	64,50 ± 0,71
PL339 Chile	0,125	49,12 ± 0,63	55,50 ± 0,71
PL368 Brasil	0,25	39,00 ± 4,10	51,00 ± 1,41
PL373 EE.UU.	128	7,13 ± 0,63	11,75 ± 0,35
PL374 EE.UU.	128	9,50 ± 0,93	10,50 ± 0,71
PL380 Argentina	1	39,88 ± 0,85	60,50 ± 0,71
PL381 Argentina	2	35,12 ± 2,84	50,00 ± 2,83
PL394 EE.UU.	32	6,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00
PL395 EE.UU.	32	6,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00
PL420 Italia	0,062	54,50 ± 1,43	58,00 ± 1,50
PL427 Sudáfrica	0,25	43,50 ± 0,71	64,00 ± 1,41
PL NRRL B-14164	0,062	41,25 ± 1,32	52,50 ± 0,71
PL CCM 483	0,062	43,50 ± 0,71	50,00 ± 2,83

Cepa	CIM Tc (µg/ml)	Zona de diámetro de inhibición (mm) discos de 5 µg Tc	Zona de diámetro de inhibición (mm) discos de 30 µg Tc
PL CCM 38	0,062	45,00 ± 0,00	52,50 ± 0,71
PL SAG 10367	0,062	43,50 ± 0,71	50,00 ± 0,00
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,5	ND	ND
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	16	ND	ND
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1	ND	23,00 ± 1,41

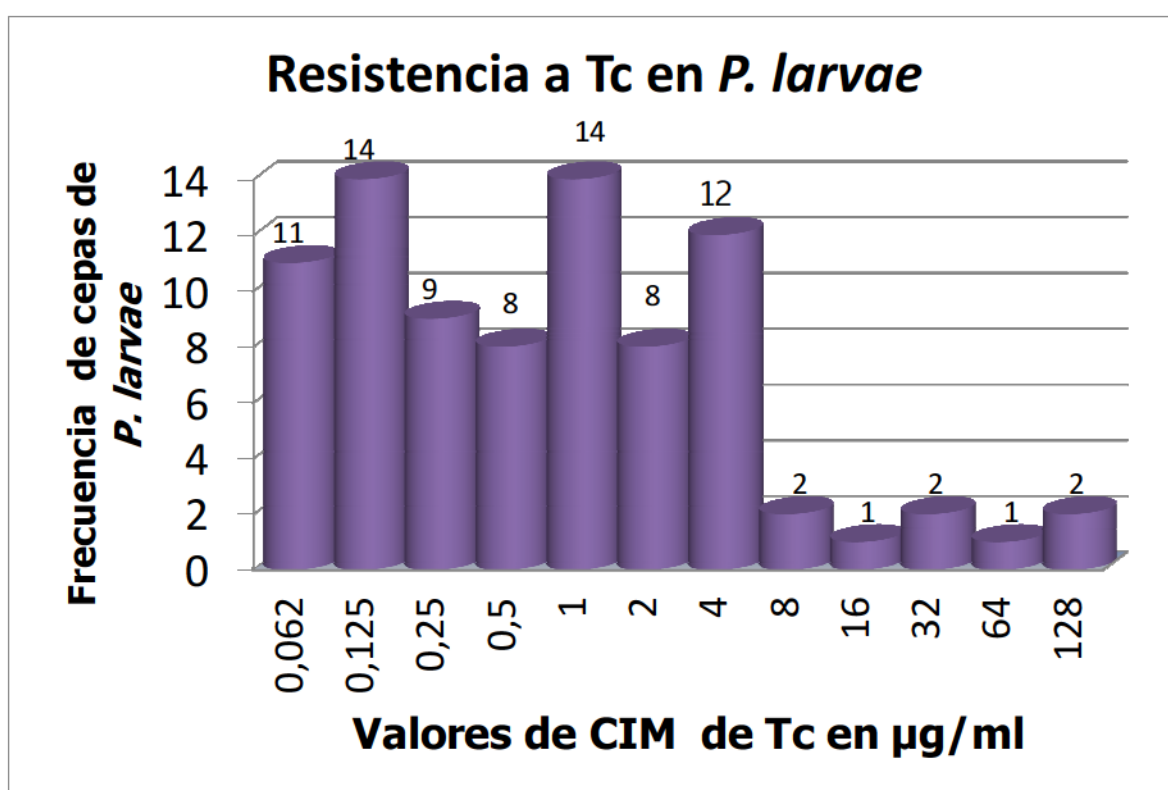


Figura 52: Frecuencia de distribución de los valores de CIM de Tc de 84 cepas de *P. larvae* de distintos orígenes geográficos

4.3. Incubación en presencia de Tc

Con el objeto de determinar si la expresión de la resistencia es inducible *in vitro* por Tc se ensayaron sub concentraciones de 4 µg/ml de antibiótico en medio MYPGP comparando los

valores de CIM antes y después del período de incubación con Tc y luego de 4 pasajes en medio sin antibiótico a intervalos de 24-48 h. Sólo se evaluaron las cepas que inicialmente mostraron valores de CIM dentro del rango I (entre 4 y 8 µg/ml de Tc).

Tabla 12: Incubación en presencia de Tc: Valores de CIM (en µg/ml) para las cepas que presentaron valores dentro del rango de la zona Intermedia.

Cepa	Origen geográfico	CIM antes de la incubación en Tc	CIM después de la incubación en Tc	CIM luego de 4 pasajes en MYPGP sin Tc
PL3	Argentina	8	NI	8
PL7	Argentina	4	NI	4
PL33	Argentina	4	32	4
PL64	Argentina	4	NI	4
CMM 4485	R. Checa	4	20	4
PL95	Inglaterra	4	NI	4
PL99	Argentina	4	12	4
PL100	Tunicia	4	NI	4
PL202	Italia	4	NI	4
PL206	Argentina	4	6	4
PL213	Canadá	8	64	8
PL218	Argentina	4	NI	4
PL238	Argentina	4	NI	4
PL316	Argentina	4	NI	4

NI: No inducible

Habida cuenta que la expresión de la resistencia a tetraciclina puede ser a) constitutiva, b) inducible o c) constitutiva-inducible según se produzca con o sin exposición al estímulo (a); cuando se produce sólo después de la exposición al estímulo (b) o cuando se produce a bajos niveles sin estímulo y la producción está muy aumentada después de la estimulación (c), respectivamente y, como las cepas PL33, CCM4485, PL99, PL206 y PL213 incrementaron sus valores de CIM luego de la incubación (entre dos y tres valores de dilución) podría considerarse que estas 5 cepas presentaron resistencia inducible. Por otra parte, las restantes (n= 9) mantuvieron sus valores originales. Como se observa en la Tabla 12, las 5 cepas que fueron inducidas perdieron la R adquirida luego de 4 pasajes consecutivos en medio sin el agregado de Tc.

El uso prolongado de tetraciclina en las colmenas afectadas por loque americana y otras enfermedades bacterianas podría favorecer la ocurrencia de cepas resistentes por inducción, como se observó *in vitro* en algunas cepas de Argentina, Canadá y República Checa pero para determinarlo fehacientemente debería evaluarse la frecuencia de cepas I y R en las poblaciones del patógeno a través del tiempo.

4.4. Evaluación del método epsilométrico E-Test para la determinación de la sensibilidad a tetraciclina en *P. larvae*

Las correlaciones entre los valores de CIM determinados por E-Test y los determinados por la técnica de dilución en agar para todas las cepas ensayadas en ambos medios de cultivo se presentan en la Tabla 13.

Mediante la técnica de dilución en agar, tanto en MYPGP como en Iso-Sensi Test, se encontraron 17 cepas S y 5 R (n=22) con valores de CIM que oscilaron entre < 0,0625 y 128 µg/ml de Tc para MYPGP y entre < 0,0625 y 64 µg/ml para Iso-Sensi Test de acuerdo con la cepa de *P. larvae*. Los valores de CIM para el control de calidad *S. aureus* ATCC 29213 fueron de 1 µg/ml para Iso-Sensi test tanto por E-test como por dilución en agar y para MYPGP de 0,5 µg/ml por dilución en agar y de 1 µg/ml por E-test. Estos valores están dentro del rango aceptable para la cepa control en agar MH (0,125-1 µg/ml).

Al comparar las CIM obtenidas por E-test con las obtenidas por dilución en agar, en el caso de agar Iso-Sensi Test hubo concordancia de categoría del 100 %, dado que no se encontraron errores de tipo menor, mayor o muy mayor (Tabla 13). Se encontró la misma proporción de cepas sensibles y resistentes que por la técnica de dilución en agar, 17 S y 5 R con valores de CIM que oscilaron entre < 0,016 y 32 µg/ml de TC (Tabla 11). Se halló una concordancia global del 100 % dentro del rango de $\pm 2 \log_2$ de dilución mientras que el porcentaje de concordancia completa dentro del rango de $\pm 1 \log_2$ de dilución fue del 40,9 % (9 de 22 cepas). Como se observa en la Tabla 13, el medio Iso-Sensi test mostró una tendencia a presentar valores de CIM más bajos para E-Test que los obtenidos por dilución en agar; esta misma tendencia ha sido observada por otros autores para distintas combinaciones de antibióticos (Arroyo *et al.*, 2008; Mohamed *et al.*, 2002).

En el caso del agar MYPGP al comparar las CIM obtenidas por E-test con las obtenidas por dilución en agar, hubo concordancia de categoría del 81,81 % dado que se hallaron 3 errores de tipo menor (3 cepas que por dilución en agar resultaron R y por E-Test I) (Tabla 13), Figura 54. Por E-test 18 cepas resultaron S, 1 cepa R y 4 cepas I con valores de CIM que

oscilaron entre $< 0,016$ y $16 \mu\text{g/ml}$ de Tc, mientras que por dilución en agar los valores fueron de 5 cepas R y 17 S. El porcentaje de concordancia completa dentro del rango de $\pm 1 \log_2$ de dilución fue del 13,63 % y el de concordancia global dentro del rango de $\pm 2 \log_2$ de dilución fue del 68,18 %. También en el caso del agar MYPGP, los valores de CIM resultaron más bajos cuando se empleó E-test comparados con los obtenidos por dilución en agar (Tabla 13) pero estas diferencias fueron mucho mayores que para el caso del agar Iso-Sensi Test (Tabla 13).

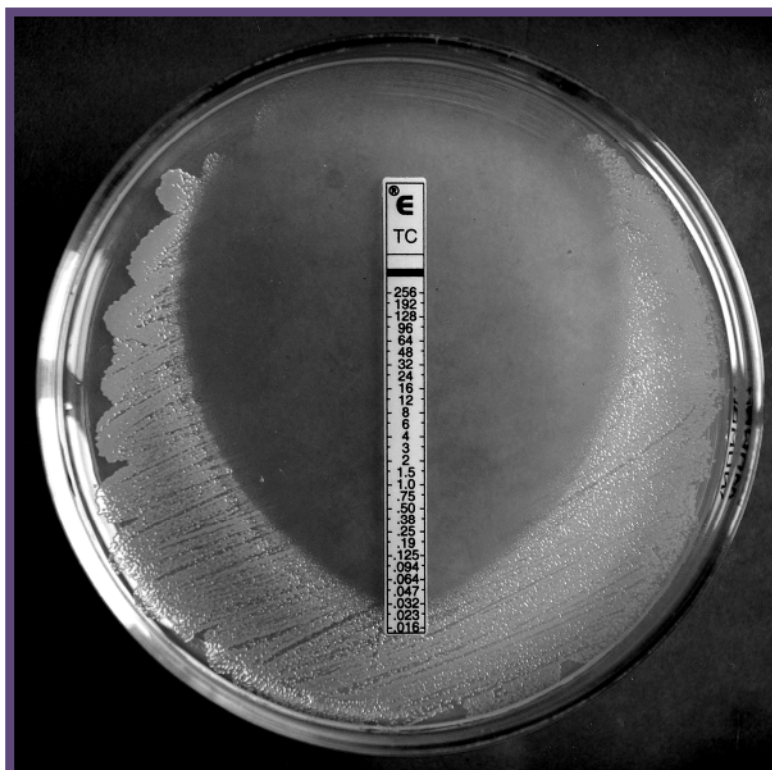


Figura 53: Determinación de la concentración inhibitoria mínima de tetraciclina para la cepa de *P. larvae* PL29 luego de 48 h de incubación en agar Oxoid Iso-Sensi Test® el valor de CIM (CIM= 0,032) se lee en el punto de intersección de la elipse de inhibición formada (zona libre de crecimiento bacteriano) con la tira de E-Test® .

En conclusión, se considera que la combinación de las tiras de E-Test con el agar ISO-Sensi Test representa una alternativa válida para determinar las CIM de tetraciclina en cepas de *P. larvae* (Figura 53). Esta técnica es considerablemente más rápida y requiere una menor cantidad de medio de cultivo que la técnica de dilución en agar por lo que puede adaptarse fácilmente al trabajo de laboratorio para el análisis de numerosas cepas bacterianas. Es importante destacar que todas las cepas de *P. larvae* ensayadas mostraron un desarrollo confluyente en Iso-Sensi test, el cual podría usarse también como medio alternativo para el desarrollo de las células vegetativas de este patógeno.

Tabla 13: Comparación de las CIM de tetraciclina de 22 cepas de *P. larvae* determinadas por las técnicas de dilución en agar y E-test.

Cepas	Perfil de ERIC-PCR	Perfil de BOX-PCR	Iso-Sensi Test agar		MYPGP agar	
			CIM Dilución	CIM E-Test	CIM Dilución	CIM E-Test
PL8 Argentina	I	A	1	0,125	0,5	0,064
PL29 N. Zelanda	I	B	<0,0625	0,032	<0,0625	0,016
PL38 Argentina	I	C	0,125	0,5	0,0625	0,125
PL48 Francia	I	A	<0,0625	0,016	<0,0625	<0,016
PL56 Suecia	I	B	0,0625	< 0,016	<0,0625	<0,016
PL 89 Alemania	I	A	0,125	0,064	0,125	0,064
PL97 Inglaterra	I	B	<0,0625	< 0,016	<0,0625	<0,016
PL214 Canadá	I	B	<0,0625	0,016	<0,0625	0,23
PL255 España	I	B	<0,0625	0,016	<0,0625	<0,016
PL295 EE.UU.	I	A	32	24	32	16
PL373 EE.UU.	I	D	64	16	128	8
PL374 EE.UU.	I	D	64	32	128	12
PL394 EE.UU.	I	A	32	16	32	4
PL395 EE.UU.	I	D	32	16	32	8
PL420 Italia	I	B	0,0625	0,016	0,0625	0,016
PL427 Sudáfrica	I	A	0,25	0,125	0,5	0,064
PL ATCC 9545 EE.UU.	I	A	0,25	0,016	0,125	0,016
PL NRRL B-3555 EE.UU.	I	A	<0,0625	< 0,016	0,125	0,016
PL CCM 4486 R. Checa	I	B	<0,0625	0,016	<0,0625	<0,016
PL SAG 10367	II	B	<0,0625	0,032	<0,0625	0,023
PL NRRL B-14154 EE.UU.	IV	E	<0,0625	0,016	<0,0625	0,023
PL CCM 38	IV	E	<0,0625	0,032	<0,0625	0,023
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	ND	ND	1	1	0,5	1

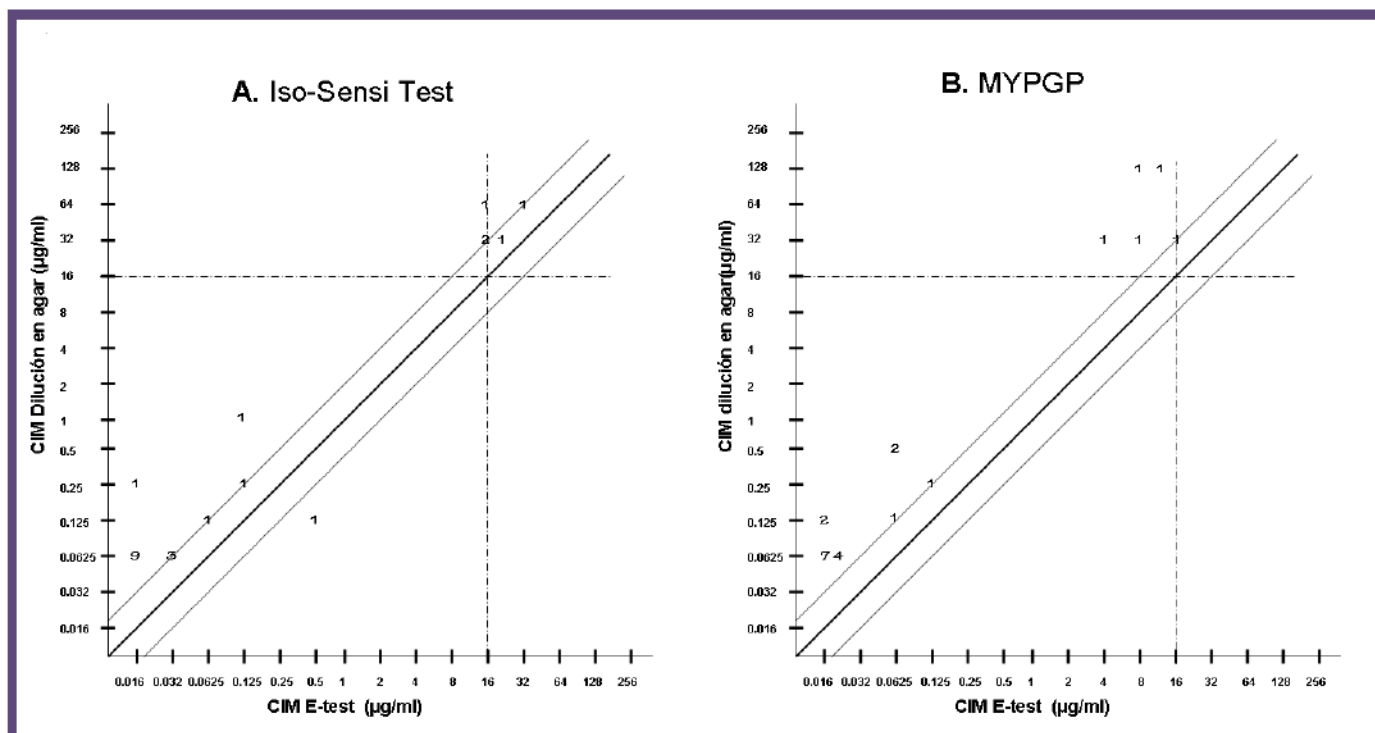


Figura 54: Esquema comparativo entre las CIM determinadas por E-test y las CIM determinadas por dilución en agar de 22 cepas de *Paenibacillus larvae* para: A) Oxoid Iso-Sensi Test y B) MYPGP. La línea diagonal de color negro representa una concordancia completa entre ambos métodos y los números indican los casos observados para cada valor de CIM. Las líneas grises representan los límites entre $\pm 1 \log_2$ CIM entre los resultados de las pruebas. El punto de corte que diferencia las cepas resistentes a tetraciclina ($\geq 16 \mu\text{g/ml}$) está representado en la intersección de las líneas punteadas horizontales y verticales.

4.5. Análisis de contenido de plásmidos por la técnica de lisis *in situ* en geles de agarosa

El análisis de contenido de plásmidos por la técnica de lisis *in situ*, mostró que mientras las cepas PL42, PL295, PL373 y PL374 presentaron dos bandas plasmídicas de aproximadamente un tamaño estimado de 5.000 y 8.000 pb respectivamente (Figura 68), las cepas PL394 y PL395 presentaron una única banda plasmídica de aproximadamente 5.000 pb. No obstante el número de bandas observado en cada una de las cepas mediante esta técnica debe ser considerado con reserva si se desea determinar en forma fehaciente el número real de replicones plasmídicos presentes.

4.6. Extracción de ADN plasmídico de geles de agarosa

La extracción de ADN plasmídico de las cepas de *P. larvae wild type* mediante el kit comercial *kit Highway*® ADN PuriPrep-GP (Inbio, Argentina) resultó adecuada para obtener

bandas específicas del plásmido para usar como ADN molde para la reacción PCR detallada en el punto 3.8. de este capítulo.

4.7. Extracción de ADN plasmídico (Miniprep)

La extracción de ADN plasmídico de las cepas de *P. larvae* mediante el *kit* comercial Qiaprep Spin Miniprep (Quiagen) con el agregado del colorante LiseBlue resultó adecuada para la extracción y purificación de los plásmidos de las cepas salvajes de *P. larvae*. Las concentraciones de ADN plasmídico obtenidas mediante esta técnica fueron: PL42= 34 ng/μl, PL295= 56 ng/μl, PL373= 110,5 ng/μl, PL374= 120 ng/μl, PL394= 80 ng/μl y PL395=75,5 ng/μl.

4.8. Investigación de genes de resistencia mediante la Reacción en cadena de la Polimerasa

Mediante PCR se evaluó la presencia de los genes de resistencia a Tc *tet(K)* y *tet(L)* y la combinación *tet(KL)* empleando como molde ADN plasmídico y los cebadores detallados en la Tabla 14. Los resultados variaron de acuerdo con los cebadores empleados. Todos los plásmidos exhibieron un amplicón de 788 pb cuando se emplearon los cebadores específicos para el gen *tet(L)* diseñados por You y col. (You *et al.*, 2012), como así también el amplicón de 596 pb cuando se probaron los cebadores diseñados por Murray y Arostein (2007) sobre un consenso de secuencias *tetL* (Figura 55). Adicionalmente, al usar la combinación de cebadores TKI-F y TL32-R se obtuvo un amplicón de 1.048 pb correspondiente a la amplificación de los genes *tetK/tetL* (Pang *et al.*, 1994). No obstante cuando se usaron los cebadores *tet(L)* diseñados por Ng y col. (Ng *et al.*, 2001) sólo se visualizó el amplicón esperado de 269 pb con el plásmido pPL395 y ninguno con los restantes, adicionalmente el amplicón de 169 pb correspondiente al determinante *tet(K)* empleando los cebadores diseñados por Ng y col. (Ng *et al.*, 2001) se observó empleando ADN plasmídico de las cepas PL42, PL295, PL373 y PL374 pero no cuando se empleó ADN plasmídico de las cepas PL394 y PL395. Sorprendentemente la PCR con los cebadores diseñados por You y col. (You *et al.*, 2012) para amplificar el gen *tet(K)* no generó amplicones. Estos resultados podrían deberse a la alta similitud existente entre las secuencias *tet(K)* y *tet(L)*, dado que ambos genes comparten entre el 60 y el 63% de similitud (Chopra & Roberts, 2001) por lo que podrían detectarse falsos positivos y falsos negativos cuando se emplean cebadores que cubren una secuencia muy pequeña de regiones de los genes (Chopra & Roberts, 2011). Finalmente, se determinó que los plásmidos de las cepas PL42, PL295, PL373 y

PL374 contenían el gen *tet(L)* y no el *tet(K)* como se sospechó en un principio. El determinante *tet(L)* sólo estaba presente en la banda específica de alrededor de 5.000 pb y no en la banda de mayor tamaño obtenida en los geles de lisis *in situ*.

Al analizar las secuencias completas de los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395 (sección 4.10) se localizó a los mencionados genes entre las bases 1.063 y 2.985. Al efectuar una búsqueda por Blast empleando las secuencias completas de dichos plásmidos en la base de datos ARDB (<http://ardb.cbc.umd.edu/blast/nblast.shtml>) se encontró que los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395 mostraron niveles de homología de 88,51% para el gen *tet(L)* y de un 83,42% para el gen *tet(K)*; estos mismos porcentajes de homología se hallaron en los plásmidos pDMV46A, pSU1 y pDMV2 pero, cuando se analizaron los plásmidos pMA67 and pBHS24, se halló una homología del 87,54% con el gen *tet(L)* y de sólo el 62,02% con el gen *tet(K)*. Como comparación se buscó la secuencia del plásmido pSTE2 que contiene el determinante *tet(K)* y el nivel de homología hallado fue de 99,99% para el gen *tet(K)* y de 85,27% para el gen *tetL*, respectivamente.

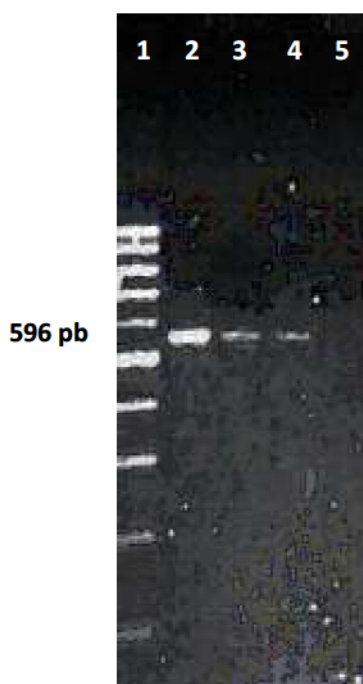


Figura 55: Amplificación por PCR de la secuencia del determinante *Tet(L)* empleando los cebadores *Plarv-Tet-L* (consenso) de acuerdo con Murray y Aronstein (2006). Calle 1: Marcador de peso molecular "Cien marker" Biodynamics (100-1000 pb); calles 2, 3 y 4: amplicón de 596 pb correspondiente al determiante *tet(L)* en los plásmidos pPL373, pPI374 y pPL395 respectivamente. Calle 5: Control negativo (blanco).

4.9. Tratamientos enzimáticos del ADN plasmídico

Luego de efectuar las digestiones con enzimas de restricción y de acuerdo con la movilidad electrofóretica observada, se pudo determinar que las cepas PL373 y PL374 contienen dos plásmidos de aproximadamente 5.000 pb y 7.000 pb, respectivamente y la cepa PL395 contiene un único plásmido de aproximadamente 5.000 pb. Los tres plásmidos de 5.000 pb se linearizaron con las enzimas *Bgl*I y *Nco*I, mientras que con la enzima *Eco*R I se generaron dos fragmentos de ~800 y ~4.200 pb respectivamente. Por otra parte los plásmidos de ~7.000 pb se linearizaron con las 3 enzimas ensayadas.

Como los plásmidos de 5.000 pb contenían el determinante de resistencia a Tc (Apartado 4.8) son los que se emplearon para efectuar su secuenciación completa y se denominaron pPL373, pPL374 y pPL395 de acuerdo con la cepa de origen.

4.10. Secuenciación y Bioinformática

La secuenciación del ADN plasmídico permitió disponer de las secuencias completas de los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395. Dichas secuencias se depositaron en el GenBank con los números de acceso KF 433938 para pPL373, KF 536616 para pPL374 y KF440690 para pPL395, provenientes de las cepas PL373, PL374 y PL395, respectivamente.

La búsqueda de secuencias homólogas efectuadas en la base de datos del servidor GenBank mediante la herramienta BLASTn reveló que las secuencias completas de los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395 resultaron homólogas (99% de similitud de bases) a las secuencias completas de los plásmidos pMA67 (DQ367664.1); pBHS24 (HM235948); pBSDMV46A (JN980138); pDMV2 (JN980137) y pSU1 (NC_014015). El plásmido pMA67 fue aislado de una cepa de *P. larvae* (Bacillales, Bacillaceae) resistente a OTC en EE.UU. (Murray *et al.*, 2006; 2007). El plásmido pBHS24 fue aislado de una cepa de *Bacillus* spp. (Bacillales, Bacillaceae) asociada con la esponja marina *Halidona simulans* en Irlanda (Phelan *et al.*, 2011). Los plásmidos pSU1, pBSDMV46A y pDMV2 fueron aislados de bacterias Gram (+) presentes en suelos de criaderos de pollo en EE.UU. (You *et al.*, 2012), pSU1 de *Sporosarcina ureae* (Bacillales, Planococcaceae), pDMV2 de *Bacillus galactosidilyticus* (Bacillales, Bacillaceae) y pBSDMV46A de *Barghavaea cecembensis* (Bacillales, Planococcaceae). Adicionalmente, se halló una alta homología con el plásmido pLS55 (EF605268.1) aislado de una cepa de *Lactobacillus sakei* (Lactobacillales, Lactobacillaceae) contaminando queso en Italia (Ammor *et al.*, 2008) y con el plásmido pAST4 (KC734563) aislado de una cepa bacteriana no cultivada. Todos estos plásmidos (n= 7) contenían el gen de resistencia a Tc *tet*L.

Mediante la secuenciación de los plásmidos estudiados se determinó que el pPL374 tenía un tamaño de 5.026 pb con un contenido de G+C de 36,77% y, los plásmidos pPL373 y pPL395 un tamaño de 5.030 pb con un contenido de G+C de 36,76% y la presencia de 5 marcos de lectura abierta (ORF) en los 3 plásmidos considerando una longitud mínima de 75 aminoácidos y el codón de inicio ATG (Figura 57). Para atribuir funciones a los productos de traducción de los ORFs, estos se compararon contra la base de datos del GenBank. El análisis de las secuencias de los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395 mostró la presencia de elementos genéticos relacionados con los módulos detallados para el mecanismo de replicación por círculo rodante (RCR) citado en pequeños plásmidos aislados de bacterias Gram (+) (del Solar *et al.*, 1993; Espinosa, 2013) como se explicó en 1.4.2 y 1.4.3.

En nuestros 3 plásmidos, los 4 módulos están conformados de la siguiente forma: La región de control de la replicación (**LIC**) que comprende el origen de replicación doble hebra (*dso*) y codifica las proteínas *Cop*; la región de resistencia a tetraciclina (**DET**) que está dada por la proteína *tetA* y el péptido *tetL*, la región de movilización (**MOB**) que codifica la relaxasa *Mob* y la región del origen de replicación (**SSO**) que contiene el origen de transferencia (*oriT*) y el origen de replicación simple hebra (*sso*) (Figuras 56 y 57).

Los plásmidos pPL374 y pPL395 tienen un nivel de homología del 99,9%; mientras que la homología con el plásmido pPL373 fue del 99,82% con el pPL395 y del 99,72% con el pPL374 (Apéndice V). Por otra parte, estos plásmidos tienen una alta homología con el plásmido pPMA67 (Murray *et al.*, 2007): 99,96% para pPL395; 99,86% para pPL374 y 99,78% para pPL373, respectivamente. Adicionalmente, los plásmidos pDMV2 y PSU1 (You *et al.*, 2012) comparten una homología del 99,88% con pPL374; 99,8% con pPL373 y 99,98% con pPL395 (Apéndice V).

Las secuencias de los plásmidos pPL373, pPL374, pPL395 y pPMA67 difieren de las de los plásmidos pBHS24, pBSDMV46A, pSU1 y pDMV2 en la posición 726 (dentro del gen Rep) donde los plásmidos de *P. larvae* contienen la base T en lugar de la G.

En el pPL374 se hallaron diferencias en 10 nucleótidos en las posiciones 3.012; 3.378; 3.387; 3.401; 3.463; 3.465; 3.466; 3.467; 3.468 y 4.369. Por su parte, el pPL373 sólo difiere en las posiciones de 2 nucleótidos en 3.060 y 3.044, respectivamente.

El *dso* de los 3 plásmidos estudiados en esta Tesis se localiza entre las bases 22 y 161 y tiene un 100% de homología con el *dso* de los plásmidos pPMA67, pBHS24, pBSDMV46A, pSU1, pDMV2 y pDMV4, lo que también se observó para el represor transcripcional *cop* que se ubica entre las bases 256 y 426 (Figura 56 - Apéndice V). Esto coincide con lo observado por

Espinosa (2013) que encontró un alto nivel de conservación en las secuencias correspondientes a los orígenes de replicación de doble hebra de los plásmidos que replican por RCR.

pPL395 (5030 pb) GenBank KF440690

1	ATTTTACGAG	GAGAGAGGGA	AAAAGGGGGG	GCTACTACGA	CCCCCCTTT	AAGTGCCGAG
61	TGCCAATTTT	AGCGAAAAAG	CCGCACGAAG	CCAGGTGGGA	CAAGGGTTTG	TGGTGGGCGA
121	GTTCTCGGCG	ACTTTTCAGC	GACTTTTCAG	CGACTTTTCA	GCTGAATTTT	GGAAATTTGT
181	ATTTCCCTGT	AATGCTTTAC	TCCATCCGAA	TAATGTTATA	TACTAATAAA	AAAACATGAG
241	AAAGAAGGTT	TTGTTATGGC	TCAAAAAAAT	GAAAAAGAAG	AAATGCAAAG	TGTAACGATC
301	CGTATTCCCA	AAGAGTTGTA	TTTTGAATAT	AAGCAAGCTT	TGTTGGAGCA	AGGGAAAAAT
361	GTGACTTATG	ATGTGCGGAG	ATATATGAAT	GATGTTGTAG	AAAATCATAA	GAAGGGGCAT
421	CAATGAGCAT	AAAAAAGAG	CGCCTCTGCG	AAAGGTACGC	TCAATTTACA	ACTCATTTTT
481	CTAAGGTGAA	TATATCATT	TGGCTAAAAG	TAAAGCAAGA	TACTTCACGT	TTTTATTATA
541	CCCCGAATCT	ATCCCTGAAG	ATTGGGAAAT	GAAATTAGAA	TCAATTGTTT	TGCCGATTGC
601	AATTAGTCCA	CTTCATGATA	AAGATTTAAG	TGATGTTGAA	GGGCAAAAAT	ATAAAAAGGC
661	TCACTATCAT	GTAATTTATG	TAGCAAAAAA	TCCAGTAACC	ACTGATAGTG	TCCGTAAAAA
721	AGTAATACAA	ATTTTGGGCG	ATAAGAGTGT	TTCTATGGTT	CAAATGTAG	TTCAAAGCAT
781	GGAGAATATA	TATCTGTATT	TAACTCATGA	ATCAAAAAGAT	GCTATTGCTA	AAAAGAAACG
841	TGTGTATGAC	AAGAAAAGACA	TTAAGCTGCT	GAACAACCTT	GATATTGATC	GGTACATAAC
901	GCTTGATGCC	GAAGACAAAAG	ACGACATGTT	GAATGATGTC	TGTGATTTGA	TTGATGAAAA
961	TGGACTAGCA	AACATTCGTG	AGTTAAGGAG	ATTTGTTAAA	ACTCGTGGGG	CTGAACATAA
1021	TTTGCCTAGC	ATGAAGATAA	TAAACTCTGT	TTTGCGGTCG	CATACTGGAT	TGATTAGATT
1081	GTATTTTCGAT	GCTGTTTATC	AAGAACGGAA	ATATGGTCTG	AGCGATTTTC	ACAAAGAAAC
1141	AGGCGAATTA	AAATGACAAA	AAGGAGGTAG	ATTGAATGAT	TACTAGAGAA	GATGAGGCGA
1201	ATTTTCCTGA	TTTTAAAACA	GTGTGGGAAG	CAAAACAATA	TTTTAGAAAA	CGTTATGGCA
1261	AAAGCTATCG	TGAAGGTGGC	CGTGAGCAAT	TAGACGAAAA	TCATATTTGC	TATTTTGACG
1321	AAGTTGATTA	TCAACCTGTT	CAAAATTTCTG	TTTTTGATGA	TGGATCGGTT	TTAGTTCATG
1381	TGGTTTATTG	AGATACAAAA	GATGTTCAAC	AAACGGGCCA	TTTAAACGGAA	TAAGTGATGA
1441	AAACTGAATT	TAAAACCTAG	TCTGTATGTG	GTAAAATGTT	TCAATCAAGA	TTAGGAGGCA
1501	TTAATTATGA	AGTGCAATGA	ATGTAACAGG	GTTCAATTA	AAGAGGGGAA	CGTATCATTA
1561	CCCCTATAAA	CTGCGTCTAC	CCTCATTATT	GGAGGGCGAA	ATGTGAATAC	GTCTATTATC
1621	CAATCAAATT	TACGACACAA	CCAAATTTTA	ATTTGGCTTT	GCGTTCATC	TTTTTTTAGC
1681	GTATTAATG	AAATGGTTTT	GAACGTCTCA	TTACCTGATA	TTGCAAATGA	TTTTAATAAA
1741	TCACCGGCGA	GTACAAACTG	GGTGAACACA	GCCTTTATGT	TAACCTTTTC	TATTGGAACA
1801	GCTCTATATG	GAAAGCTATC	TGATCAGCTA	GGCATTAATA	GGTTACTCCT	ATTTGGGATT
1861	ATAATAAATT	GCTTCGGATC	GGTAATGGG	TTTGTGGAC	ATTCTTTTTT	TCCCACTT
1921	ATTCTGGCTC	GATTTATTCA	AGGAGCTGGT	GCAGCTGCAT	TTCCAGCACT	CGTGATGGTT
1981	GTAGTTGCGC	GCTATATTCC	AAAGGAAAAT	AGGGGTAAAG	CGTTTGGTCT	TATTGGCTCC
2041	ATAGTAGCTA	TGGGAGAAGG	TATCGGTCCA	GCTATTGGTG	GAATGATAGC	TCATTTTATC
2101	CATTGGTCTT	ATCTTCTGCT	CATTCCAATG	ATGACAATTA	TCACTGTTC	GTTCCTTATT
2161	AAATTGTTGA	AAAAAGAAGT	AAGGATAAAA	GGTCATTTTG	ATATTGTAGG	AATTATACTA
2221	ATGTCAGTGG	GCATTGTATT	TTTTATGCTG	TTTACAACAT	CTTATAACAT	TTCTTTTCTG
2281	ATCATCAGTA	TTCTGTCATT	CCTGATATTT	GTA AAAACATA	TTAGGAAAAGT	AACAGAACCT
2341	TTTGTTGAAC	CTGCACTGGG	GAAAAATATT	TCTTTTATAA	TTGGTGTCTT	TTGTGGAGGA
2401	CTTATATTTG	GTACAGTAGC	AGGGTTTATC	TCTATGGTTC	CTTACATGAT	GAAAGATGTA
2461	CATCAACTAA	GTA CTGCTGC	AATTGGCAGT	GTGATTATTT	TCCCTGGAGC	AATGAGCGTT
2521	ATTATCTTCG	GTTACATTGG	TGGATTACTT	GTTGATAGAA	AAGGTCAT	GTACGTGTTA
2581	ACCATTGGAG	TTACATTCT	TTCCGTTAGC	TTTTTAATTG	CTGCCTTTTT	TTTAGAAGTA
2641	ACACCATGGT	TACTGACAA	TATATTAGTT	TTTGTTTTTG	GTGGCTGTG	ATTCACAAA
2701	ACAGTTATAT	CTACAATTGT	TTCAAGTAGT	TTGAAAACAAA	AGGAAGCTGG	TGCCGGAATG
2761	AGTTTGCTTA	ATTTTACCAG	TTTTTTATCA	GAGGGAATAG	GTATTGCAAT	TGTTGGTGGT
2821	TTATATCTG	TACGCTTACT	GAATCAGAAG	TTGCTACCTA	TGGACCTTGA	TCAATCCACT
2881	TATTTGTATA	GTAATATGCT	ATTCCTTTTT	ACAGGAGTCG	TTGTTACTAG	TTGGCTGATC
2941	ACCTTGAATG	TATATAAACG	AAGACAAAAT	CAATTTAAAA	GTTGATATACC	AGAGATAAAT
3001	TAAATGACTT	CTAGCTTTCT	TAAGCAATCG	GCGCGATTG	TTGAAGATCA	GAAAATTTTT
3061	AAGAGGTGGC	AAATTTGCCA	CCTCTTTTTA	TTTTCTTCGG	CTAAAAGTGA	AACTTTCTGC

```

3121 AGAAGAAAAT ACGTGGCAAT TGTCACCGGT AAATGTCTGA CTGAAGCGAC AGCGAAAGGA
3181 ATTTAAGGAG TTGACAATTT TGCTACACCC GAACCCTCTT GGCTCGTCAA AAGGCAACAC
3241 CTTTGGACCT GCCAACCGGC GAGGGAGCCC CCTCAAAAAG TGAGGGGGTT GGGGGAGCTT
3301 TTTGGAGGGG GTCGAGGGGA AACTTTTCCC TCGTGGGTTT GGGCAAAGCC CATGATCTTT
3361 TCTTTTGCTT TTGAATTTGG GGGAGCGGTT TTTGCTCCCT TGCTTTTCGC CTCGCAGAGC
3421 ACGT CCAGAA GATTCTGGTA TACCGTGTTA TACCAAATGG TTTTGGCTCC TCTCGCCTGA
3481 TGTGTTATTC TCTTCTCAA TGGAGGTGTA CGAGATGGCG CACGTTTACA AATTCACTAA
3541 AGGAAATATG CAAGGCTTGT CAATTCACCT AGACCGAAAA ACAGAAAACC ATTCCAACAA
3601 AAATATTGAT ACAGAGCGTA CACATCTGAA CTATGATTTA TGCGAAAAAG ACGGAGATAC
3661 ACTTTCCCGC ATGGACGAAA GATTGAGTGA AGTTTATTGC ATGAATCGGA AAGATGTAAA
3721 GGTGTGCTGT GAGTGGATCG TCACACTGCC TGAATCGCTT CACAATGAAT CTGTTGAGTA
3781 TCAGAGGAAA TTCTTTGAGG AAACATACGA ATTTCTTACA GATCGTTATG GAGGACAGGA
3841 GAACGTCGTT TCAGCGAATG TCCACAATGA TGAAACAACC CCTCACATGC ATTTTGATTT
3901 TGTTCCGGTT GTTTGGGATG AGAAAAAGA GCGTGAAAA GTATCAGCGA AAGAAGTGCT
3961 GACGAGATCG GAATTGAAAA GTTTTCACAC TGATTTAGAT AGACACTTGA AAGAGCGAAT
4021 CCCTGAAATT TATCAAGAAG GAATTTTAAA TGATAAGACG ATCGGGATTG AAAATATTCA
4081 TTCGCTGAAA AAATATTCAG CGGAGATTGA ACAGCAGAAA GAGGAAATGG CTAACGAATT
4141 TAAGAGTTTT AAATATCCGC AAAAAGTTTT GAAAAGTATT GAGCGAGAAG TTGAGAAGAA
4201 AACTGTTGGA GTCTTTAATA AAAAAGAAGT AGTTATGTTG CCAGCGGAAC GCTACGAGAA
4261 AATGAAAGAG TTATCGAATT CGAGTATTAG AATTCACCAA CGATTTGATA AATACAAATC
4321 AAAAGCTGTT GAAGAAATTA AAAATTTAAA AGTAAATGTG AAAAAATTCG AGGAAGATAA
4381 CGAACATCTT CGCTATCGAA ATATTGATTT TGGTAGAGAA ATTACATTGT TGCAAAAAGA
4441 GCGAGATCGA CAAACAGAAA ATGCAATTGT TTATAAAAAGT ATTTTGGGAA AAAAAAGAGC
4501 CGATCTTCAG ATTAGTACGT TAGAATTTCA AGGCCGGTTA GTGCTTCATA ATTTAGAGAA
4561 TGACCGTATG CCAAAGAATA AAGAAGAGGG AGAAAACCTG CTGGAGATCC TCGAAGAAAA
4621 TAAAGAAGAA AAGACGATTC CACAAAATCG ACTTGAAAAA GCGATTGGTA AAATTAAATT
4681 GTTTTTAGAG AAATTTATAA AACGGGCTAA AGAAGCAGAT TTCTCGATGG ATTTGGCTGGT
4741 GGAGAAAAAC AAAGAACTTT CTCAGCAGCG GCAGCAACAG AAGAAAACGA AAAGCAGATC
4801 TAGTGGCATG GAGTTGTAA T GATCTTAGA ATGCCCTTAT TTCTCTTCAA AATCGTTTTT
4861 AAGAGCTTTT GAAGTAGTTT GCTAGGGTTT GTGTGGTTTT TTAAGCAATG CGGCTTAAAA
4921 AGGCTTGTGA GCGTTTTTAA AGTAATTAGA AATATGGTTT TAGATTTTTA GAAAAGCCCT
4981 GTGTTTTTTA AGGGCTTTTT TTGCTTTTTA TGAACGGAT TTCGAAC TAG

```

Figura 56: Secuencia completa (5.030 pb) del plásmido pPL395 aislado de la cepa *P. larvae* PL395. Los diferentes colores indican los distintos elementos y su localización: 22-161 *dso*: Origen de replicación de doble hebra (*double strand origin*); 256-426 *Cop*: Represor transcripcional (gen *Cop*); 430-482 *RNA II*: ARN contra transcrito; 500-1156 *rep*: Inicio de replicación; 1507- 1569: péptido TetL (*tetL peptide leader*); 1603-2985 *tetL*: Gen de resistencia a tetraciclina por eflujo activo; 3138-3353 *ssu*: Origen de replicación de simple hebra (*single strand origin*) ; 3425-3458 *orit*: Origen de transferencia; 3500-4819 *mob*: Función de movilización (gen *mob*).

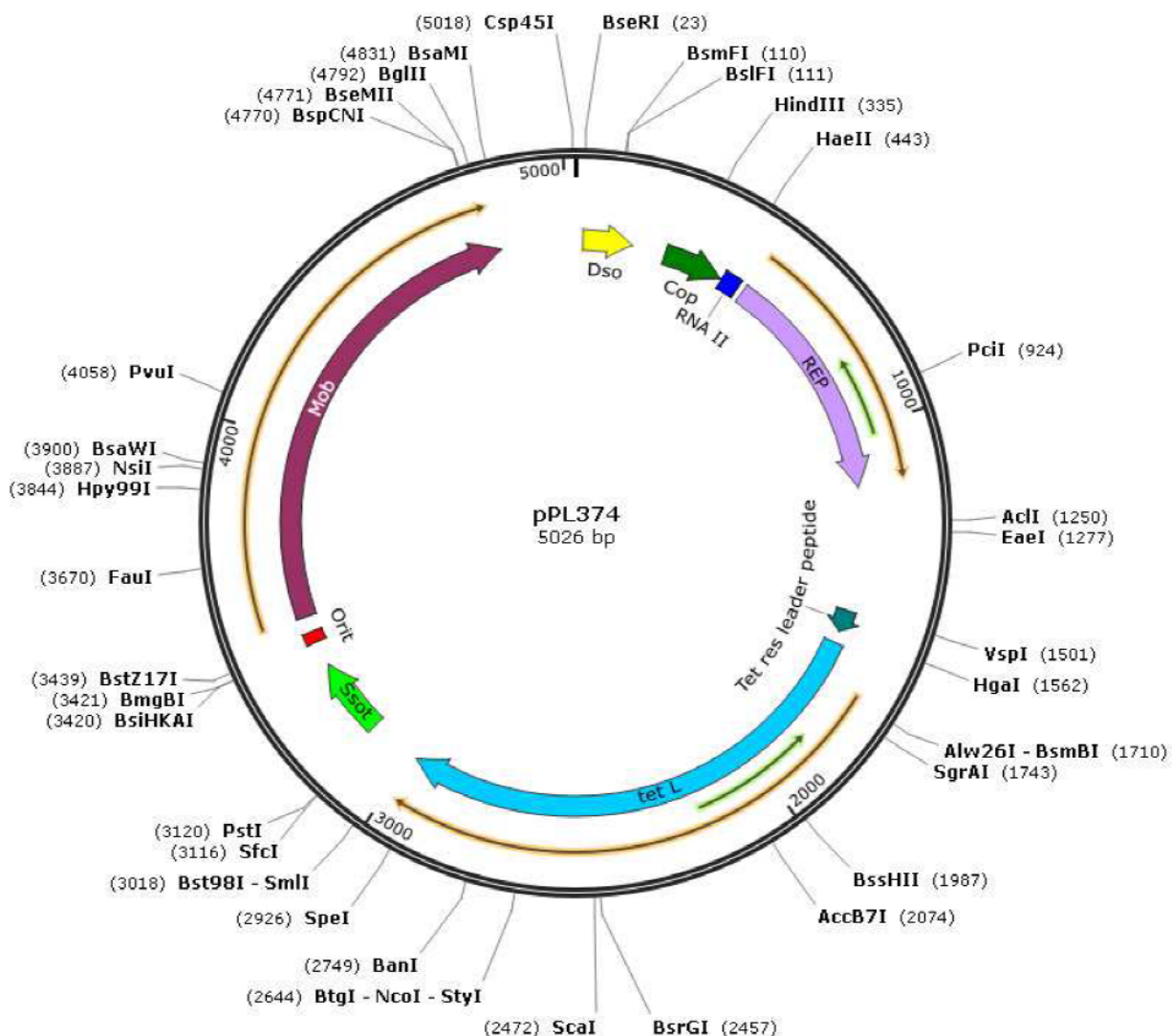


Figura 57: Representación esquemática del plásmido pPL374 aislado de la cepa de *Paenibacillus larvae* PL374 con resistencia a tetraciclina y oxitetraciclina. Los elementos se asignaron de acuerdo con la homología encontrada con otros elementos de plásmidos conocidos: *dso*: Origen de replicación de doble hebra; *Cop*: Represor transcripcional (gen *Cop*), *RNA II*: ARN contra transcrito; *rep*: Inicio de replicación; *tetL*: Gen de resistencia a tetraciclina por eflujo activo; *sso*: Origen de replicación de simple hebra; *mob*: Función de movilización (gen *mob*) y *oriT*: Origen de transferencia. Las flechas más externas (amarillas y verdes) indican la dirección de los marcos de lectura abierta (traducción mínima de 75 aminoácidos). Se señalan también los sitios de corte de distintas enzimas de restricción.

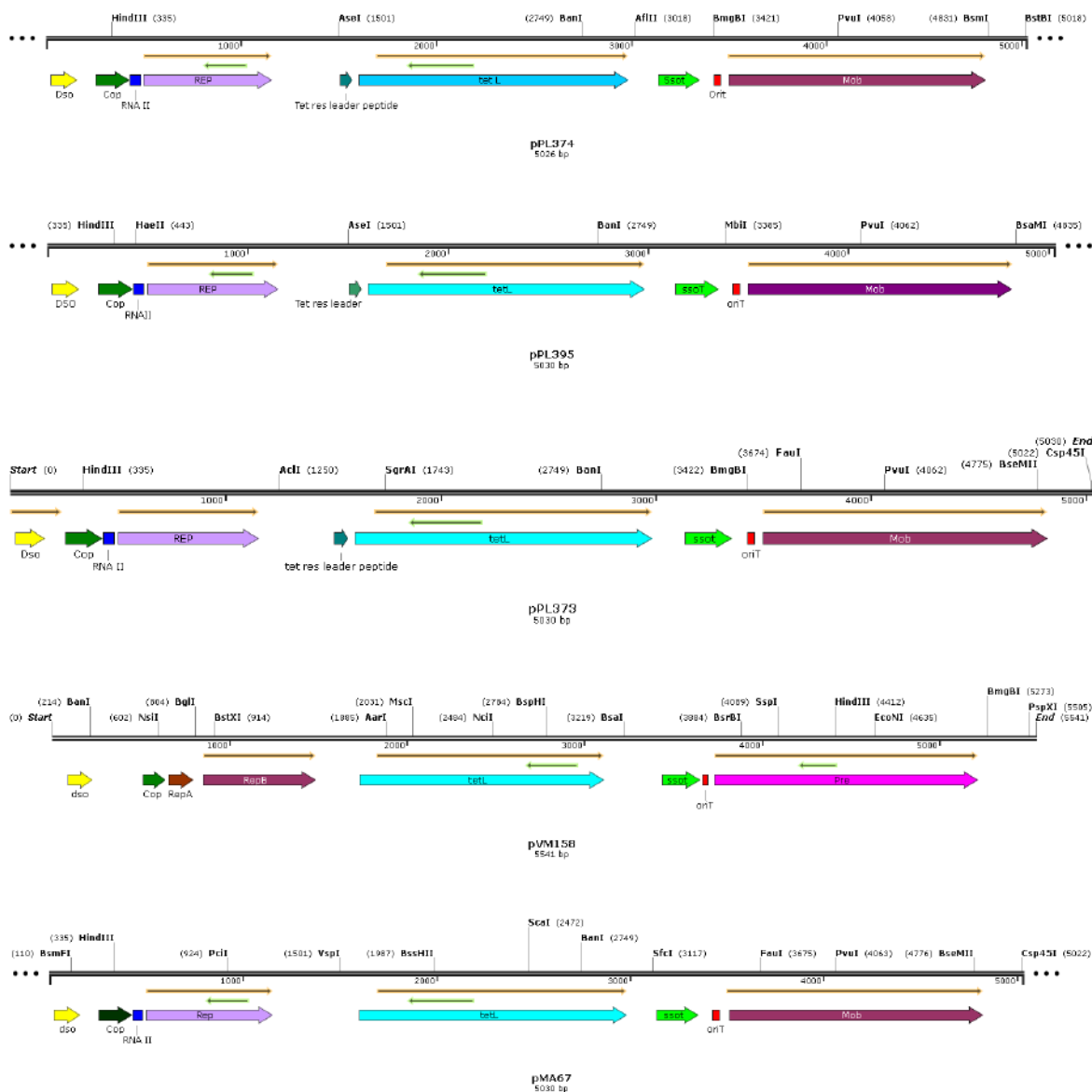


Figura 58: Comparación esquemática de los plásmidos pL374, pL395 y pL373 con el plásmido pM158 de *Streptococcus agalactiae* y pMA67 de *Paenibacillus larvae*. Los elementos se asignaron de acuerdo con la homología encontrada con otros elementos de plásmidos conocidos: *dso*: Origen de replicación de doble hebra; *Cop*: Represor transcripcional (gen *Cop*), *RNA II*: ARN contra transcrito, *rep*: Inicio de replicación; *tetL*: Gen de resistencia a tetraciclina por eflujo activo; *sso*: Origen de replicación de simple hebra; *mob*: Función de movilización (gen *mob*) y *oriT*: Origen de transferencia. Se indican los marcos de lectura abierta de traducción de un mínimo de 75 aminoácidos y que comienzan con el codón ATG.

De acuerdo con la clasificación de plásmidos RCR detallada por Andrup y col. (Andrup *et al.*, 2013), los 3 plásmidos descritos pertenecen al grupo II ya que codifican una típica proteína Rep de alrededor de 200 aminoácidos y un *dso* que se ubica en la región 5' anterior del gen *rep*

(*upstream*). Las mayores homologías encontradas en el GenBank para las proteínas *rep* traducidas de los plásmidos pPL373 (GenBank AGX86137), pPL374 (GenBank AGX24958) y pPL395 (GenBank AGX24952) fueron las proteínas *rep* que han sido descritas como proteínas del inicio de replicación de los plásmidos pBHS24, pBSDMV46A, pSU1, pDMV2, pAST4 y pLS55. Adicionalmente, se encontró un ARN contra transcrito en los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL375 de igual secuencia al encontrado en los plásmidos pMA67 aislado de *P. larvae* (Murray *et al.*, 2007), pMV158 aislado de *Streptococcus agalactiae* (Espinosa, 2013) y pLS1 aislado de *Streptococcus pneumoniae* (del Solar *et al.*, 1995). Este ARN contra transcrito ha sido caracterizado en el plásmido promiscuo pLS1 (Del Solar *et al.*, 1995) y en estos plásmidos se ubica en la región 3' que sigue al gen *Cop* (*downstream*) y en la 5' previa al gen *Rep* (*upstream*) (Figura 56).

Adicionalmente, se encontraron en el GenBank homologías del 100% para las secuencias traducidas de las proteínas *Cop* de los plásmidos pPL373 (GenBank AGX24947), pPL374 (GenBank AGX24955) y pPL395 (GenBank AGX24951) fueron las proteínas *Cop* de los plásmidos pMV67 (*P. larvae*), pBHS24 (*Bacillus* sp.), pBSDMV36 (*Barghavaea cecembensis*), pDMV2 (*Bacillus galactosidilyticus*), pSU1 (*Sporosarcina ureae*), AST4 (bacteria no cultivable) y otros represores transcripcionales *Cop* de diferentes géneros y especies de Bacillales.

El análisis de las secuencias completas de los plásmidos obtenidos de los aislamientos analizados muestra la presencia del mismo sitio de origen de transferencia (*oriT*) y de los genes de movilización (*mob*) hallados en la superfamilia del plásmido pMV158 (Francia *et al.*, 2004; Fernández-López *et al.*, 2013) que replica por el mecanismo RCR dentro del grupo II (Khan, 1997, 2005). Como se muestra en la Figura 59, los *oriT* de los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395 son idénticos entre sí y están conformados por 34 pb, pero difieren del resto de los plásmidos analizados (pMV67, pBSDMV9, pNM5, pDMV2, pBHS24, pSU1, pBSDMV46A, pAST4 y pLS55) los cuales tienen una base más (A) en la posición 9 y una longitud de 35 pb.

De acuerdo con la clasificación de los orígenes de replicación simple hebra (*ssr*) de los pequeños plásmidos que replican por RCR (Andrup *et al.*, 2003), existen 5 grupos denominados *ssrA*, *ssrT*, *ssrU*, y *ssrW* (Andrup *et al.*, 2005; Khan, 1997, 2005, Novick, 1989; Boe *et al.*, 1989; Leer *et al.*, 1992; Seegers *et al.*, 1995), sobre la base de la homología de las secuencias de los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395 (Figura 60) se puede concluir que estos pertenecen al grupo de origen de replicación tipo *ssrT*.

		10	20	35
pPL373	CCAGAAGA			
pPL374	CCAGAAGA			
pPL395	CCAGAAGA			
pMA67	CCAGAAGA			
pVSDMV9	CCAGAAGA			
pNM5	CCAGAAGA			
pDMV2	CCAGAAGA			
pBHS24	CCAGAAGA			
pSU1	CCAGAAGA			
pBSDMV46A	CCAGAAGA			
pAST4	CCAGAAGA			
pLS55	CCAGAAGA			
pMV158	CACTTTATGAATATAAAGTATAGT			

Figura 59: Alineamiento de las secuencias de los *oriT* de los plásmidos de *Paenibacillus larvae* pPL373, pPL374 y pPL395 y de los plásmidos pMA67 (*P. larvae*), pBSDMV9 (*Barghavaea cecembensis*), pBSDMV46A (*B. cecembensis*), pNM5 (bacteria no cultivable), pDMV2 (*Bacillus galactosidilyticus*), pBHS24 (*Bacillus* sp.), pSU1 (*Sporosarcina ureae*), pAST4 (bacteria marina no cultivable) y pLS55 (*Lactobacillus sakei*) respectivamente comparados con el *oriT* del plásmido pMV158 de *Streptococcus agalactiae*. Las diferencias de nucleótidos se indican como áreas sombreadas (gris claro) y el sitio *Nick* (G/T) subrayado.

Seery y Devine (1993) identificaron tres motivos conservados y tres estructuras tipo "loop" involucradas en la actividad del *ssu* en el plásmido pBAA1 aislado de una cepa de *Bacillus subtilis* y sostienen que esa organización está conservada en los diferentes orígenes de replicación simple hebra pertenecientes a la familia *ssuT* (Figura 60). El *ssuT* del pBAA1 está contenido en un fragmento de unos 170 pb, que presenta tres secuencias palindrómicas con potencial para formar tres estructuras tipo tallo-lazo ("stem-loop"). También se ha identificado el *ssu* del plásmido pTX14-3 aislado de *Bacillus thuringiensis* perteneciente a la familia *ssuT* que posee menos de 283 pb y contiene cinco posibles estructuras "stem-loop" (Madsen *et al.*, 1993).

Existen correlaciones entre el *ssu* y el rango de hospedantes de este tipo de plásmidos dado que cada tipo particular de *ssu* es activo sólo en bacterias altamente emparentadas, como el tipo *ssuT* citado en plásmidos aislados de especies de *Bacillus* que fue descrito por primera vez en el plásmido pBAA1 (Devine *et al.*, 1989). Mientras que el origen de replicación simple hebra de tipo *ssuA* es altamente específico, los orígenes del tipo *ssuT* y *ssuU* se han encontrado en distintos géneros y especies de bacterias Gram (+) (del Solar *et al.*, 1993) como en el caso de *Staphylococcus aureus* (Seery & Devine, 1993) y, más recientemente, en *Barghavaea*

cecembensis y *Sporosarcina ureae* (You et al., 2012).

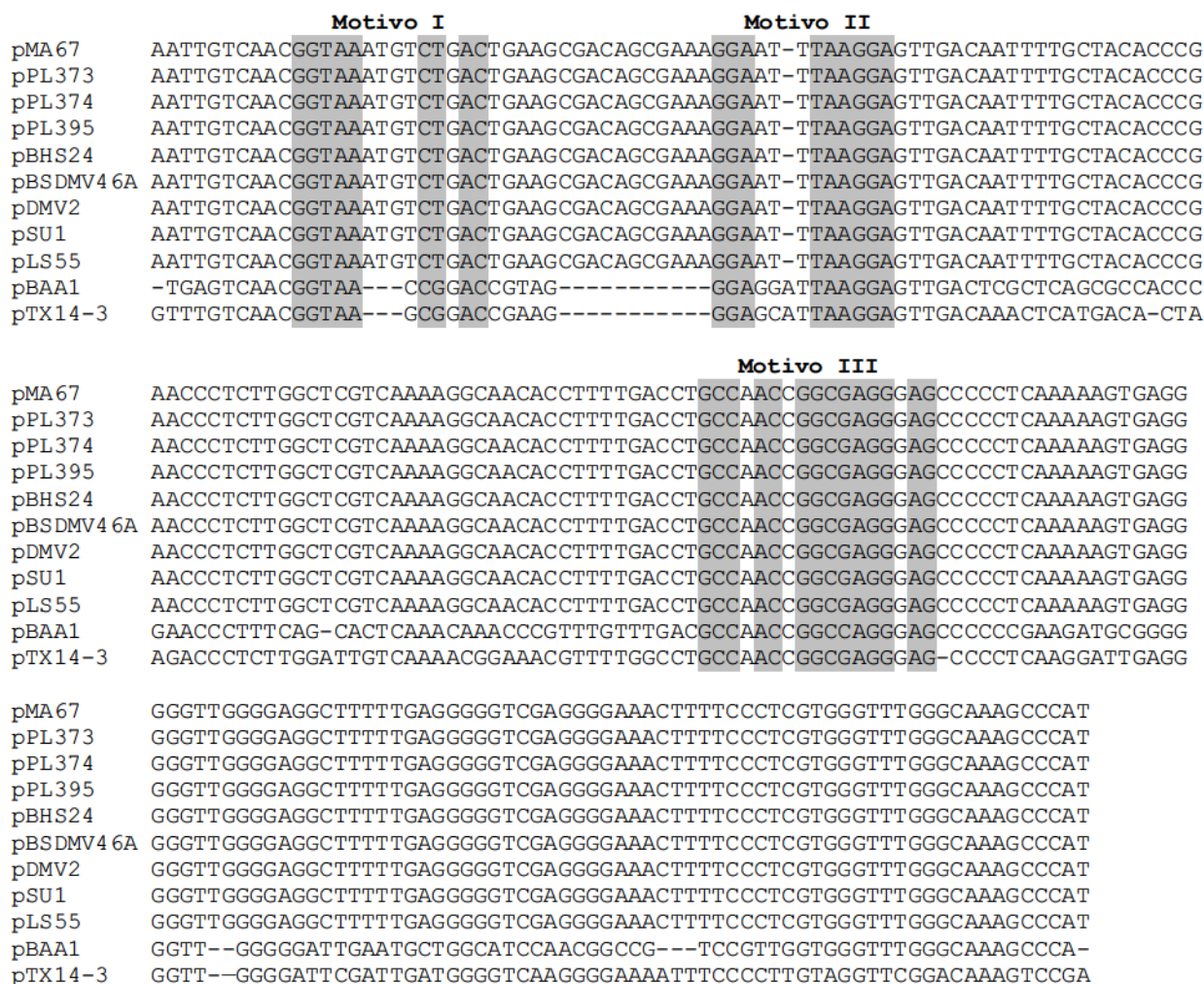


Figura 60: Alineamiento de las secuencias del origen de replicación simple hebra (*ssu*) de los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395 en comparación con otros plásmidos de tipo *ssuT* dentro de los que se replican por el mecanismo de círculo rodante. Los plásmidos usados en la comparación fueron: pMA67 (*Paenibacillus larvae*), pBHS24 (*Bacillus* sp.), pBSDMV46A (*Barghavaea cecembensis*), pDMV2 (*Bacillus galactosidilyticus*), pSU1 (*Sporosarcina ureae*), pLS55 (*Lactobacillus sakei*), pBAA1 (*Bacillus* spp.) y pTX14-3 (*Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*). Se marcan las posiciones de los tres motivos (I, II y III) en distintos tonos de sombreado.

Como se explicó en 1.4.2, en el plásmido pMV158 coexisten dos *ssu*, uno del tipo *ssuA* y el otro del tipo *ssuJ* (Espinosa, 2013), a pesar de que pertenecen a la misma familia, los 3 plásmidos de *P. larvae* estudiados en esta tesis, al igual que el pMA67 (Murray et al., 2007) comparten el mismo *ssu* de tipo *ssuT* (Figura 60) conteniendo 3 motivos de regiones de aminoácidos conservadas y 5 estructuras de tipo "stem-loop" localizadas en la región que se ubica 150 pb 5' por delante (*upstream*) de los genes *Mob* (Figura 61) (Apéndice V).

El alineamiento de las secuencias de los genes *mob* de los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395 localizadas entre las 3.500 y 4.819 pb permitió verificar que las homologías de las mismas es del 100% y además que son iguales a las secuencias de los genes *mob* de los plásmidos pAST4, pBHS24, pSU1, pLS55 y pBSDMV46A que difieren de la secuencia del gen *mob* del plásmido pMA67 sólo en dos nucleótidos. Estas diferencias están localizadas en la posición 4.777 donde al pMA67 le falta una base y el resto tiene G, y en 4.779 donde el pMA67 tiene G en lugar de A (Apéndice V). Las búsquedas a través de la herramienta Blast empleando las secuencias traducidas a proteínas de los genes *mob* indicó que las proteínas *mob* de los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395 estaban más relacionadas con las proteínas *mob* de los plásmidos pAST4, pBHS24, pSU1, pLS55 y pBSDMV46A (100% de homología) que con la proteína *mob* del pMA67 (95% de identidad). Estos alineamientos se presentan en la Figura 60 donde también se indican los motivos conservados (I, II y III) de la familia MOB_V.

La secuencia de las proteínas *mob* se depositaron en el GenBank bajo los números AGX24954 para pPL395, AGX24949 para pPL373 y AGX24957 para pPL474 respectivamente.

Debido a las dos diferencias marcadas anteriormente entre las proteínas *mob* de los plásmidos estudiados aquí con la proteína *mob* del pMA67 se genera una relaxasa diferente en el N terminal (Figura 61).

De acuerdo con el esquema de identificación de las regiones de movilización de los plásmidos propuesto por Francia y col. (Francia *et al.*, 2004) revisado por Garcillán-Barcia y col. (Garcillán-Barcia *et al.*, 2009) los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395 se clasifican dentro de la familia MOB_V a la cual pertenece el plásmido pMV158.

Los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395 contienen el determinante de resistencia a Tc *tetL* cuya secuencia se localiza entre las posiciones 1.603 y 2.985. Esta secuencia es 100% homóloga al determinante *tetL* citado en los plásmidos pMA67, pDMV2 y pSU1 (Apéndice I). Con respecto a las secuencias de los restantes plásmidos empleados en las comparaciones, se hallaron algunas diferencias en las posiciones 1.757, 2.432 y 2.509 del gen *tetL* donde el plásmido pBHS24 contiene G, A y A en lugar de A, C y G y en la posición 1.581 donde el plásmido pBSDMV46A tiene un nucleótido diferente (T en lugar de C). La comparación de las secuencias *tetL* de los plásmidos pLS55, pPL373, pPL374 y pPL395 permitió distinguir 4 diferencias en las posiciones 1.603, 1889, 2461 y 2.799 respectivamente.

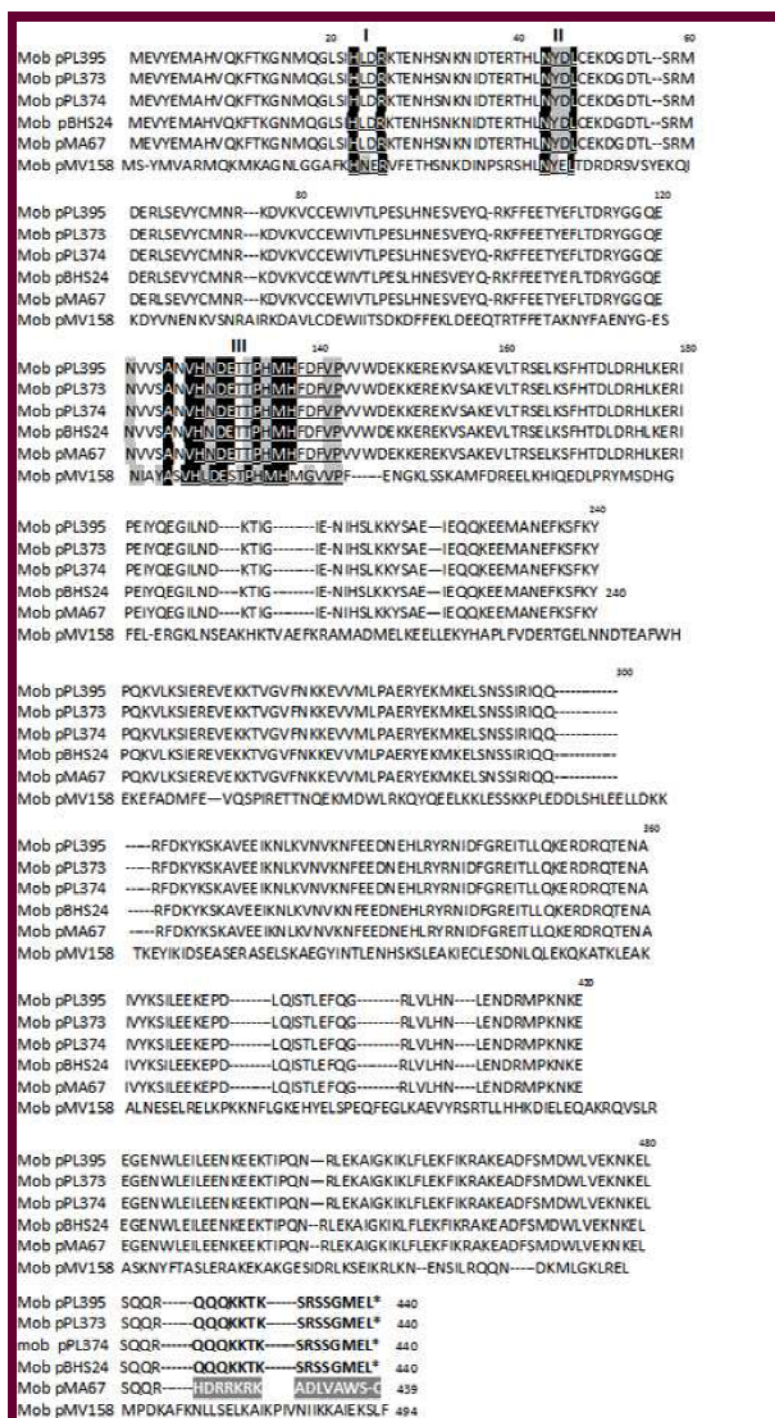


Figura 61: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas Mob de los plásmidos de *Paenibacillus larvae* pPL395, pPL373, pPL374, pBHS24 (*Bacillus* sp.) y pMA67 (*P. larvae*) en comparación con el plásmido pMV158 de *Streptococcus agalactiae*. Sólo se representa el plásmido pBHS24 no obstante, las secuencias de las proteínas Mob son idénticas a las de los plásmidos pBSDMV46A (*Barghavaea cecembensis*), pDMV2 (*Bacillus galactosidilyticus*), pSU1 (*Sporosarcina ureae*), pAST4 (bacteria marina no cultivable) y pLS55 (*Lactobacillus sakei*). En subrayado se indican los motivos conservados (I, II y III) de la familia MOBV; en letras blancas y fondo negro se indican los aminoácidos invariables, en letras negras y gris claro se indican los aminoácidos altamente conservados dentro de la superfamilia pMV158. En letras blancas y gris oscuro se marcan las diferencias con el plásmido pMA67 lo que genera dos relaxasas diferentes en el N terminal.

Para inferir las relaciones filogenéticas entre los plásmidos de *P. larvae* y otros plásmidos bacterianos conteniendo el gen de resistencia a tetraciclina *tetL* que se encontraban disponibles en el GenBank (n=16 hasta la fecha de esta Tesis), se efectuó un análisis de parsimonia basado en los alineamientos de las secuencias completas de aminoácidos empleando el programa MEGA. A partir del dendrograma obtenido que se representa en la Figura 62 se observó un agrupamiento de 10 plásmidos conformado por los plásmidos de *P. larvae* pPL373, pPL374 y pPL395 y los plásmidos pMA67, pAST4, pSU1, pBHS24, pDMV2, pBSDMV46A y pLS55, lo cual estaría indicando un evento evolutivo en estos plásmidos conteniendo determinantes de resistencia a Tc como fuera observado también por You y col. (You *et al.*, 2012) en plásmidos aislados de suelos de criaderos de pollo dónde habitualmente se emplea Tc para el tratamiento de ciertas enfermedades en estas aves.

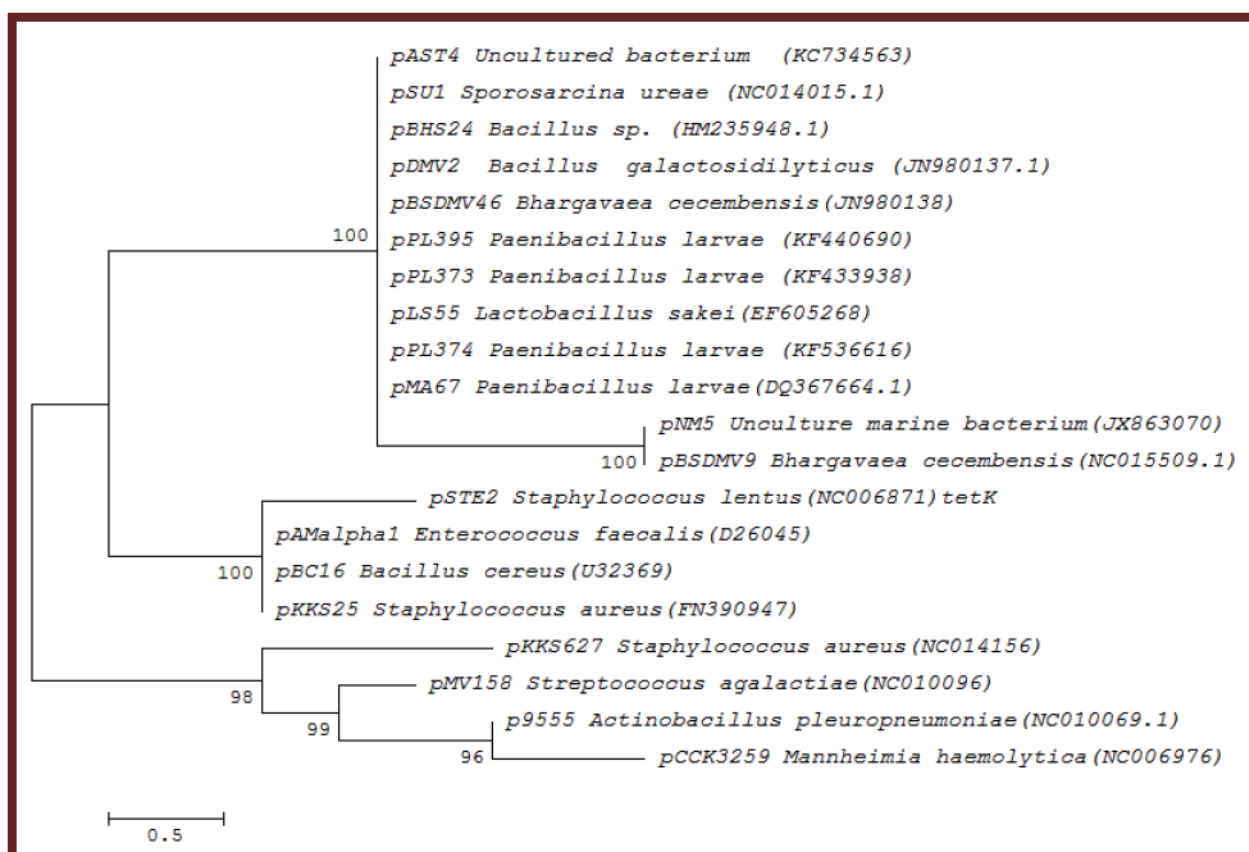


Figura 62: Dendrograma de máxima parsimonia construido con las secuencias completas de aminoácidos de los plásmidos aislados de *P. larvae* comparados con otros plásmidos conteniendo el determinante de resistencia a tetraciclina *tetL* (los números de acceso de GenBank figuran entre paréntesis). Como *outgroup* se empleó la secuencia del plásmido pSTE2 de *Staphylococcus lentus* conteniendo el determinante *tetK*. Se empleó un análisis de Bootstrap con 1.000 repeticiones y los valores obtenidos se indican en las ramas del árbol. La construcción se efectuó mediante el programa MEGA, versión 5.2.

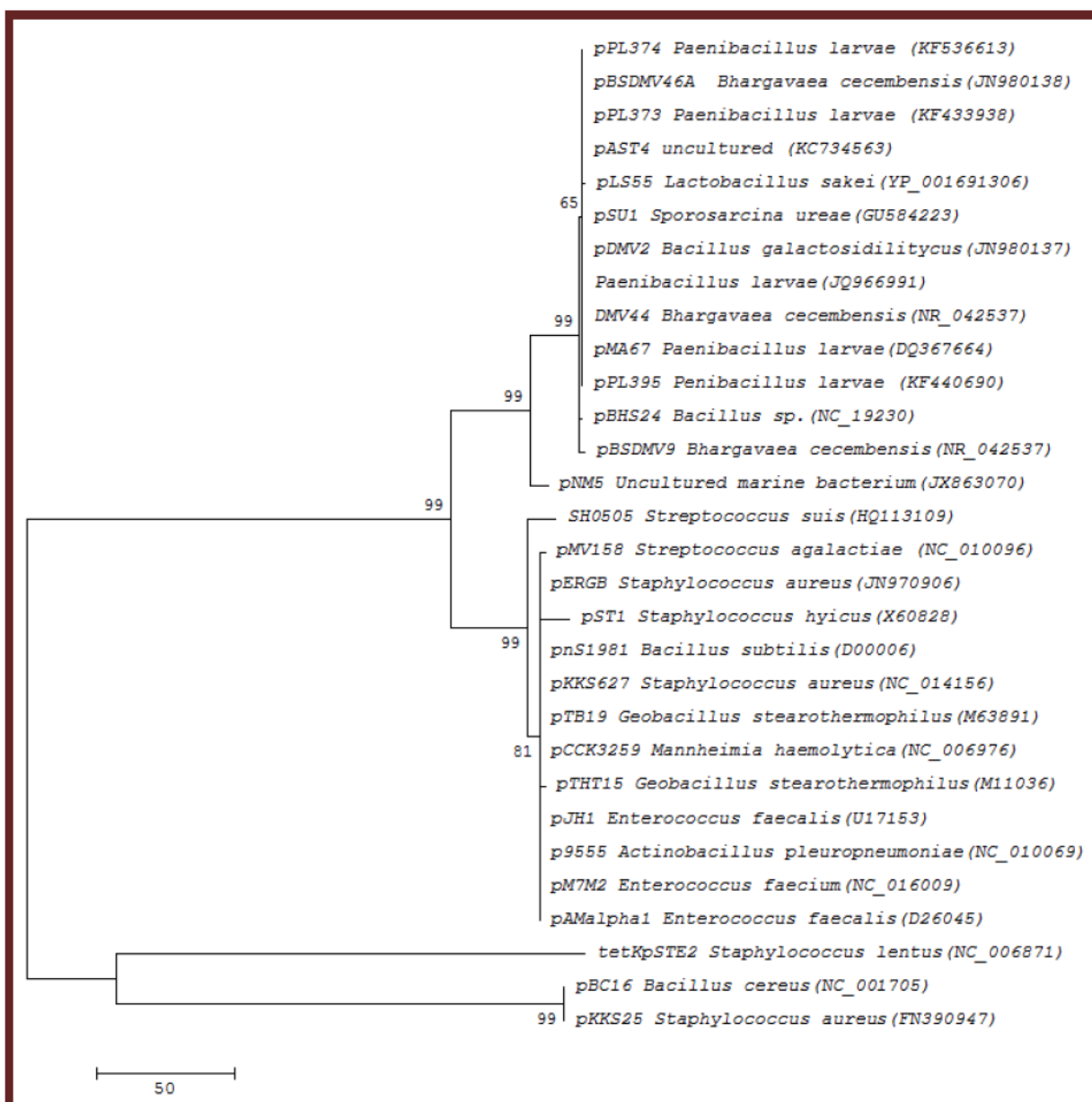


Figura 63: Dendrograma de Máxima Parsimonia construido con las secuencias del determinante *tetL* provenientes de distintos plásmidos obtenidas del GenBank (los números de acceso figuran entre paréntesis) y las de los genes *tetL* de los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395 aislados de cepas de *P. larvae*. Como *outgroup* se empleó la secuencia del determinante *tetK* contenido en el plásmido pSTE2 de *Staphylococcus lentus*. Se empleó un análisis de Bootstrap con 1.000 repeticiones y los valores obtenidos se indican en las ramas del árbol. La construcción se efectuó mediante el programa MEGA, versión 5.2.

Al efectuar un análisis filogenético de máxima parsimonia empleando sólo las secuencias del determinante *tetL* contenidas en los distintos plásmidos disponibles en el GenBank hasta la fecha (n=26), se observó que los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395 se agrupaban en un *cluster* que incluía también a los plásmidos pMA67, pAST4, pSU1, pDMV2, pBSDMV46A, pLS55

y la secuencia JQ966991, este *cluster* está estrechamente relacionado con otro conteniendo las secuencias del gen *tetL* de los plásmidos pBHS24 y pBSDMV9 (Figura 63).

Al comparar ambos dendrogramas (plásmidos completos vs. secuencias *tetL*) se observó una estructura similar de agrupamiento, lo que sugiere que estos plásmidos se movilizan en forma completa entre distintos hospedantes y aparentemente no es frecuente el movimiento de genes aislados como el gen de resistencia a Tc.

En los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395, se identificó una secuencia de 120 aminoácidos de un supuesto péptido líder (*putative leader peptide*) que está ubicada en la región 5' por delante del gen *tetL* (*upstream*). Esta misma secuencia se halló en los plásmidos pBSDMV9, pNM5, pBSDMV46A, pDMV2, pLS55, y pSU1 avalando la hipótesis de una inducción en la expresión del gen *tetL* (Ammor *et al.*, 2008).

Como se explicó anteriormente, las diferencias más importantes entre los plásmidos pPL373, pPL374 and pPL395 y el plásmido pMA67 descrito por Murray y col. (Murray & Aronstein, 2006; Murray *et al.*, 2007) se encuentran en el *oriT* y en los genes *Mob*. Estas diferencias entre los plásmidos estudiados en esta tesis y el pMA67 podrían indicar distintas capacidades de movilización y/o conjugación.

Con el objeto de conocer más sobre los mecanismos de transferencia codificados por los plásmidos descritos se realizó un análisis de las proteínas traducidas de los plásmidos pPL373 (GenBank AGX24950), pPL374 (GenBank AGX24956) y pPL395 (GenBank AGX24953) empleando el servidor TMHMM que permite predecir la presencia de proteínas transmembranales. Con una probabilidad alta (cerca a 1), se predicen 12 hélices transmembranales para estas proteínas lo que se corresponde con la familia 3 de los sistemas de eflujo perteneciente a la superfamilia MFS (*Major Facilitator Superfamily*) de transporte de proteínas (Pao *et al.*, 1998). En la Figura 64 se grafica la topología más probable para la proteína *tetL* del plásmido pPL374 (AGX24956). Considerando que los canales iónicos están formados por al menos 5 α -hélices, la presencia de 12 hélices transmembranales sugiere que los plásmidos descritos podrían codificar proteínas que forman parte de un canal proteico que actúa como bomba expulsando la molécula de Tc hacia el exterior de la bacteria.

Se encontraron plásmidos homólogos en distintos géneros de bacterias Gram (+) pertenecientes a las familias *Lactobacillaceae* y *Bacillaceae*, como *Lactobacillus*, *Bhargavaea*, *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Sporosarcina*. Otros autores (Tamminen *et al.*, 2001) demostraron que el número de transferencias entre ambas familias era mucho más abundante que las esperadas por eventos de transferencia al azar de plásmidos, particularmente en los casos de resistencia a

antibióticos.

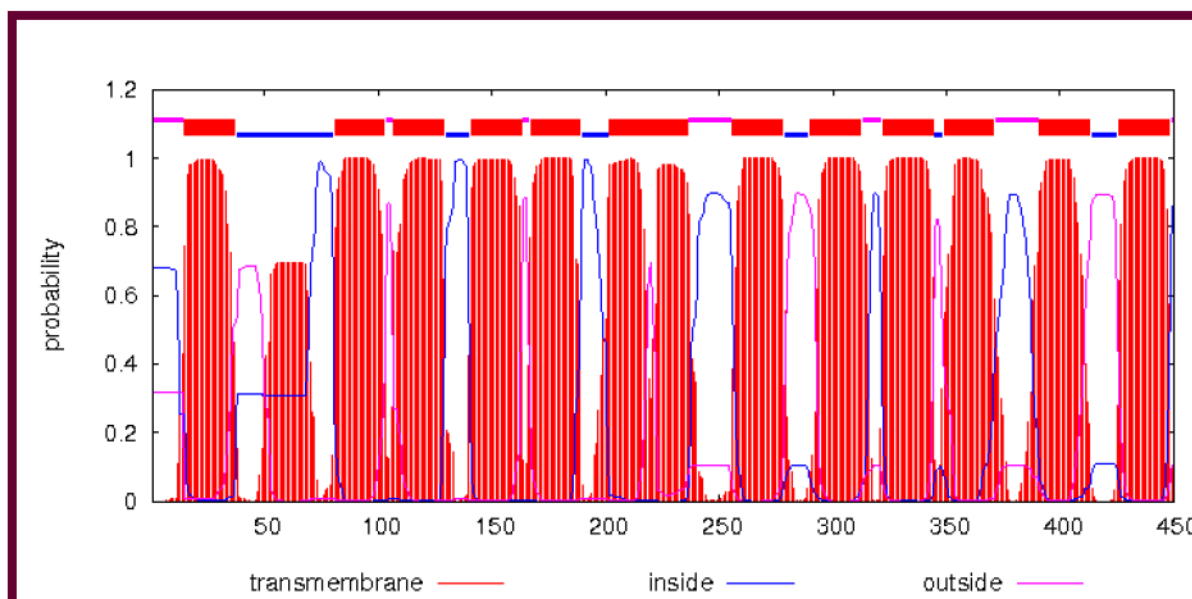


Figura 64: Determinación de la topología más probable para la proteína tetL del plásmido pPL374 (AGX24956) empleando el servidor TMHMM. El gráfico representa la probabilidad total dentro del cual un residuo pertenece a una hélice transmembranal (líneas de color rojo), exterior (líneas de color violeta) o interior (líneas de color azul) de la membrana. En el eje de las abscisas se representa la posición del residuo en la proteína y en el eje de las ordenadas aparece la probabilidad de que el mismo esté en cada uno de los 3 casos. Con una probabilidad alta (cercana a 1) se predicen 12 hélices transmembranales para esta proteína. Habida cuenta de que se necesita un mínimo de 5 α -hélices para poder formar un canal iónico, se postula que las mismas podrían formar parte del canal proteico que actúa como bomba expulsando la molécula de Tc hacia el exterior de la bacteria.

El hecho de que todos estos plásmidos fueron encontrados en especies bacterianas pertenecientes a nichos ecológicos muy diferentes sugeriría la existencia de una transferencia horizontal de genes de resistencia a Tc entre bacterias ambientales y bacterias patógenas de abejas como *P. larvae*.

4.11. Experimentos de conjugación

Para demostrar que la resistencia a Tc podía transmitirse horizontalmente entre cepas bacterianas junto con el plásmido con el determinante de resistencia *tetL* se efectuaron experimentos de conjugación utilizando como cepas dadoras a los aislamientos de *P. larvae* PL373 y PL374 (Figura 65) y como cepasceptoras a dos aislamientos de *B. subtilis*, BSGSY 1104 y BSm351WT según lo detallado en la sección 3.9 de este capítulo. Como controles se

empleó un duplicado de los experimentos que se mantuvo en agitación constante para prevenir la conjugación bacteriana.



Figura 65: Fenotipo de la cepa dadora PL374WT Tc^R

Las dos cepas dadoras transfirieron el fenotipo Tc^R a sus correspondientes cepas receptoras. Los transconjugantes obtenidos, incrementaron su resistencia a Tc con respecto a las cepas receptoras WT (Tabla 14). Se observó que la transferencia ocurrió durante el tiempo de *mating* en medio líquido sin movimiento. Tampoco se observó desarrollo bacteriano cuando los dadores y los aceptores se sembraron en forma separada en el medio selectivo de conjugación (MH suplementado con 8 µg/ml de Tc). Estos resultados sugieren que un mecanismo de conjugación sería el responsable de la transferencia del fenotipo Tc^R entre *P. larvae* y *B. subtilis*.

Todas las colonias de los transconjugantes obtenidos exhibieron una pigmentación verde en todos los medios de cultivo probados (Figura, 66 B) y un pigmento difusible fluorescente cuando se las sembró en medio King II (King *et al.*, 1954) probablemente debido a la presencia de algún compuesto del tipo de los sideróforos. También se observó una reducción en la producción de esporas en los transconjugantes de *B. subtilis* comparados con las cepas salvajes.

La presencia de compuestos del tipo de los sideróforos se encontró en dos cepas de *P. larvae* cuyos genomas fueron recientemente secuenciados (Djucik *et al.*, 2014). Ambas cepas codificaban para sistemas de transporte de hierro del tipo ABC. Los sideróforos son quelantes de hierro que son producidos por ciertas especies bacterianas en respuesta a la deficiencia de hierro en el medio dónde se desarrollan, pero se función en *P. larvae* durante la infección larval todavía no ha sido establecida.

Los valores de FC para los transconjugantes de *B. subtilis* m351 fueron del orden de entre 3×10^{-4} y 6×10^{-4} y, para los transconjugantes de *B. subtilis* GSY1104 del orden de entre 2×10^{-3} y 4×10^{-4} . Cuando se intentaron efectuar conjugaciones entre las cepas PL394 y PL

395 con el aceptor *B. subtilis* m351 no se obtuvieron transconjugantes (FC= 0).

Tabla 14: Resultados de las determinaciones de sensibilidad/resistencia a tetraciclinas de las cepas empleadas en los ensayos de conjugación

Cepa	Origen	Año	Geno-tipo	CIM Tc (µg/ml)	Diámetros discos Tc5 µg	Diámetros discos Tc 30 µg	CIM OTC (µg/ml)	Diámetros discos OTC 30 µg	Tet L
<i>Paenibacillus larvae</i>									
PL 373 wt	miel EE. UU	2001	Tc ^R	128	7.13 ± 0.63	11.75 ± 0.35	128	11.75 ± 0.35	+
PL 373 cur 5	laboratorio	2005	Tc ^S	4	17.50 ± 0.7	26.50 ± 0.7	4	23.50 ± 0.7	-
PL 374 wt	miel EE. UU	2001	Tc ^R	128	9.50 ± 0.93	10.50 ± 0.71	128	11.75 ± 0.35	+
PL 374 cur 10	laboratorio	2004	Tc ^S	0.06	52.50 ± 0.7	63.00 ± 1.41	0.032	58.75 ± 0.35	-
PL 374 cur 22	laboratorio	2004	Tc ^S	0.06	56.00 ± 1.14	71.25 ± 1.06	0.25	57.75 ± 0.354	-
<i>Bacillus subtilis</i>									
BS m351 wt	miel, Argentina	2000	Tc ^S	0.25	31.33 ± 0.4	31.50 ± 0.70	0.032	32.75 ± 0.35	-
BS m351 Tr D	laboratorio	2004	Tc ^R	32	6.00 ± 0.0	10.75 ± 0.35	64	12.50 ± 4.2	+
BS m351 Tr F	laboratorio	2004	Tc ^R	16	9.25 ± 1.06	12.50 ± 2.12	64	12.50 ± 0.7	+
BS m351 curD	laboratorio	2004	Tc ^S	0.25	30.50 ± 0.7	33.00 ± 1.41	0.032	35.50 ± 0.70	-
GSY 1104	recibida como cultivo	2004	Tc ^S	4	19.50 ± 0.7	28.25 ± 0.35	4	22.25 ± 0.35	-
GSY 1104 Tr 3	laboratorio	2004	Tc ^R	64	10.75 ± 0.35	11.50 ± 0.7	64	12.50 ± 0.7	+
GSY 1104 Tr 4	laboratorio	2004	Tc ^R	64	13.75 ± 0.35	15.50 ± 2.12	64	12.75 ± 0.75	+

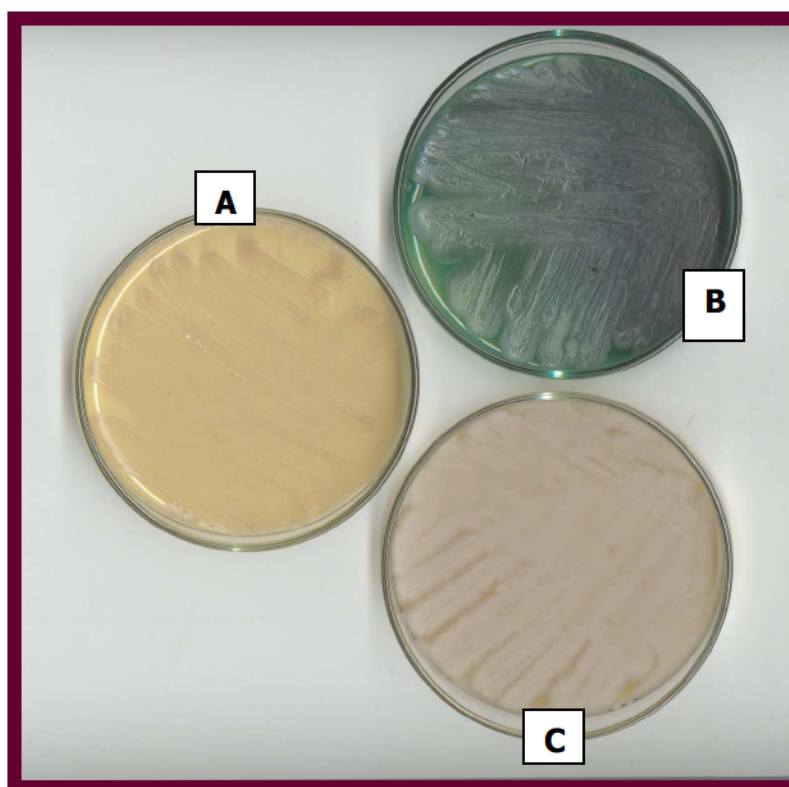


Figura 66: Fenotipos de la cepa aceptora *B. subtilis* BSm351WT Tc^S (A), de la cepa transconjugante BSm351TrD Tc^R (B) y de la cepa curada BSm351TrD cur F Tc^S (C)

4.12. Experimentos de transformación por electroporación

Los experimentos de transformación efectuados con ADN plasmídico de cepas de *P. larvae* con resistencia a Tc y una cepa aceptora de *P. larvae* sensible a Tc y con fenotipo rojo. Los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395 se introdujeron por electroporación, en forma separada en la cepa *P. larvae* NRRL B-14154, a una ET de $3,48 \times 10^5$ transformantes / μg de ADN plasmídico (FT=0,083%) para pPL373; $6,56 \times 10^5$ transformantes / μg de ADN plasmídico para pPL374 (FT=1,25%) y $4,66 \times 10^5$ transformantes/ μg de ADN plasmídico para pPL395 (FT=0,33%), respectivamente. Estos valores de transformación resultaron similares a los obtenidos por Murray y Aronstein (2008) cuando trabajaron con la cepa *P. larvae* B-2605 como aceptora y el plásmido pDM60, un vector puente (*shuttle*) que confiere resistencia a kanamicina y Tc en *P. larvae* y *E. coli*. No obstante, podría haber diferencias debido a que el método de electroporación empleado es altamente dependiente de la cepa aceptora y del tipo de plásmido usado y también a que cepas distintas requieran condiciones diferentes.

Para confirmar la transferencia plasmídica y que efecto había causado en el fenotipo de la

cepa aceptora, se examinaron los perfiles de resistencia a Tc de los transformantes. En total, se seleccionaron 13 transformantes que exhibieron valores de CIM de entre 16 µg/ml y 64 µg/ml de Tc y se denominaron A, B, C, D, E, F, G e I a los que se obtuvieron con el plásmido pPL373; transformante 1 al obtenido con el plásmido pPL373 y transformantes 2,3,4 y 5 a los obtenidos con el pPL395 (Figura 67).

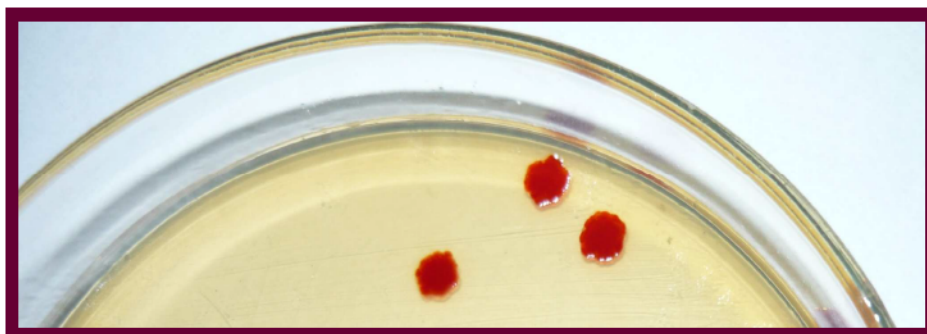


Figura 67: Fenotipo de los transformantes de *P. larvae* NRRL B-14154 desarrollados en MYPGP con 16 µg/ml de Tc

4.13. Estabilidad y curado de los transconjugantes y transformantes

Las cepas transconjugantes BSm351 trD y BSm351 TrF y su correspondiente cepa dadora, PL374 WT, se curaron por calor mediante 10 sucesivos pasajes en agar MH incubado a 45 °C ± 1 . Se seleccionaron dos cepas curadas del dador, las que se denominaron PL374 cur5 y PL374 cur10 y las del aceptor se denominaron BSm351 cur D y BSm351 cur F. Luego del décimo pasaje se determinaron sus CIM (Tabla 18) y se observó la presencia/ausencia de ADN plasmídico por la técnica de lisis *in situ* (Figura 68).

Las cepas transconjugantes BS GSY1104 Tr3 y BS GSY1104 Tr4 y su correspondiente cepa dadora PL373 WT se sometieron a un curado por tratamiento con naranja de acridina a una concentración de 300 µg/ml, pero solamente la cepa PL373 pudo curarse, denominándola PL373 cur5. Por el contrario, los transconjugantes de *B. subtilis* BS GSY1104 Tr3 y BS GSY1104 Tr4 no pudieron curarse por ninguno de los tratamientos ensayados, mientras que la cepa PL42 sufrió un curado espontáneo de ambos plásmidos que se habían visualizado por la técnica de lisis *in situ* y también perdió su resistencia a Tc y OTC por lo que no se pudieron continuar los trabajos con la misma.

Con respecto a los transformantes, las 13 cepas se mantuvieron estables luego de 20 subcultivos en MYPGP sin el agregado de Tc a intervalos de 24 h y a una temperatura de

incubación de $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$. Luego del pasaje número 20, se determinaron sus CIM a Tc y OTC que resultaron las mismas que las obtenidas para los stocks de los transconjugantes originales mantenidos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395 se transfirieron por electroporación a la cepa *P. larvae* NRRL B-14154 dónde se replicaron en forma autónoma. Todos los transformantes y las cepas dadoras de plásmidos PL373, PL374 y PL395 se curaron de sus correspondientes plásmidos por 10 pasajes sucesivos en MYPGP a intervalos de 48 h y posterior tratamiento con naranja de acridina según lo detallado en la sección 3.11. Todas las cepas curadas (transformantes y WT) perdieron su resistencia a Tc y OTC.

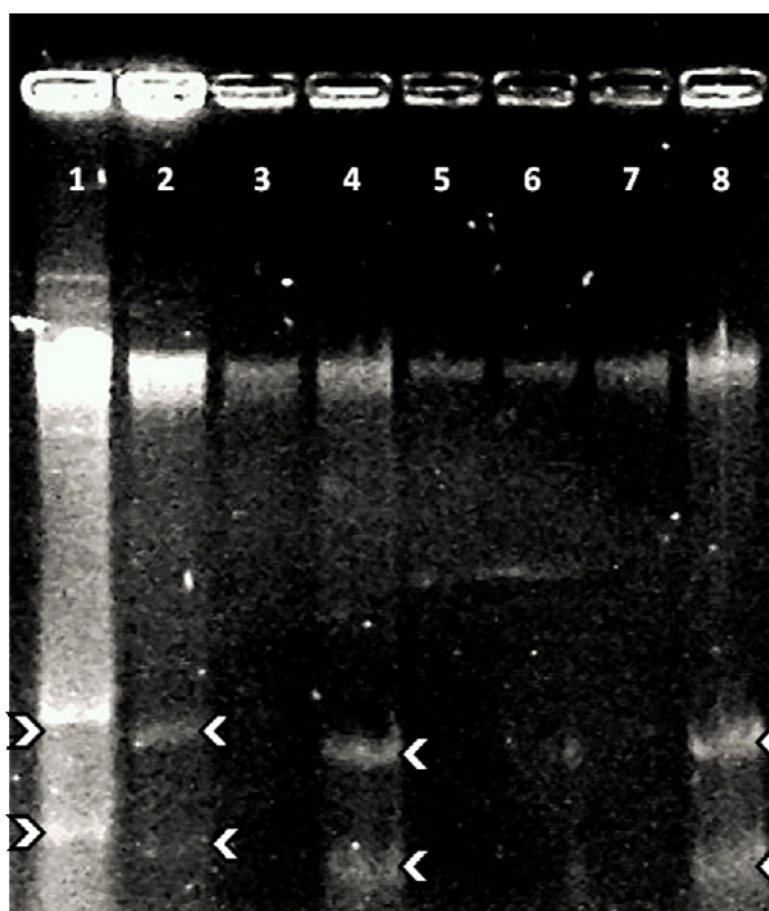


Figura 68: Perfiles de plásmidos obtenidos en geles de lisis-*in situ* tipo Eckhardt para demostrar la conjugación entre cepas salvajes de *P. larvae* y *Bacillus subtilis*. Líneas: 1. Cepa dadora *P. larvae* PL374wt; 2. *B. subtilis* Bsm351TrD (transconjugante); 3. *B. subtilis* BSm351wt (aceptor); 4. *P. larvae* PL373wt (cepa dadora); 5. *P. larvae* PL374 curado10 (cepa curada); 6. *B. subtilis* BSm351curD (transconjugante curado); 7. *B. subtilis* GSY 1104 (aceptor); 8. *B. subtilis* GSY 1104Tr4 (transconjugante). La presencia de plásmidos se indica con una cabeza de flecha.

4.12. Comparación por rep-PCR de los perfiles *fingerprints* de las cepas dadoras, transconjugantes, transformantes y curadas

Para confirmar la identidad de los transconjugantes y de los curados de las distintas cepas, se utilizaron los perfiles *fingerprint* generados por rep-PCR empleando los cebadores BOX y ERIC. Los perfiles, tanto de las cepas transconjugantes de *B. subtilis*: BS m351TrD, BS m351TrF y BS m351curD resultaron idénticos entre si y a los de la cepa WT BS m351. Los perfiles de los transconjugantes de *B. subtilis* BS GSY1104Tr3 y BS GSY1104Tr4 fueron iguales a los generados por la cepa WT BS GSY1104.

Con respecto a las cepas de *P. larvae*, todas las cepas WT coincidieron con sus respectivos curados en sus perfiles: ERIC-I / BOX-D tanto para la cepa PL373 como para la PL374 y ERIC-IV / BOX-E para la cepa aceptora *P. larvae* NRRL B-14154 y sus respectivos transformantes y curados.

Por su parte las cepas salvajes Tc^R de *P. larvae* que contenían plásmidos con el determinante *tetL*, PL42, PL373, PL374, PL394 y PL395, todas presentaron genotipo ERIC-I pero resultaron variables con respecto a su perfil BOX (Tabla 15).

Tabla 15: Perfiles de fingerprints de las cepas de *P. larvae* con resistencia a Tc conteniendo el determinante *tetL*.

CEPA	PERFIL BOX	PERFIL ERIC
PL 42	B	I
PL 373	D	I
PL 374	D	I
PL 394	A	I
PL 395	D	I

5. Conclusiones

En este capítulo hemos demostrado experimentalmente la transferencia del plásmido pPL374 en la cepa de *B. subtilis* m351 y del plásmido pPL373 en la cepa de *B. subtilis* GSY1104 mediante conjugaciones en medio líquido. Al examinar ambas cepas dadoras de *P. larvae* mediante la técnica de lisis *in situ* se observaron dos plásmidos de aproximadamente 5.000 pb y

8.000 pb, conteniendo el más pequeño el gen de resistencia a Tc. Luego de efectuar la secuenciación completa de los dos pequeños plásmidos obtenidos de las cepas PL373 y PL374 confirmamos que el gen de resistencia era el *tetL* y que ambos replican por el mecanismo de círculo rodante encontrado en pequeños plásmidos movilizables de alto número de copias presentes en bacterias Gram (+). Todos los experimentos de conjugación empleando la cepa PL395 que contiene un único plásmido de 5.000 pb denominado pPL395 resultaron infructuosos, no obstante el ADN plasmídico obtenido de la cepa PL395 si pudo transferirse por electroporación a una cepa de *P. larvae* Tc^S. Los plásmidos pPL373 y pPL374 también pudieron transferirse por electroporación a la misma cepa de *P. larvae* Tc^S. En todos los casos los plásmidos se mantuvieron en forma estable en sus respectivos aceptores.

Otros autores también hallaron plásmidos de mayor tamaño (9.000 pb; 9.400 pb y 11.500 pb, respectivamente) (Benada *et al.*, 1998; Bodorova-Urgosikova *et al.*, 1992; Neuendorf *et al.*, 2004) en cepas de *P. larvae* provenientes de la UE, pero estos no han sido secuenciados ni tampoco se encontraron funciones específicas asociados a ellos. Adicionalmente, Murray y Aronstein (2006) encontraron 3 plásmidos aparentemente distintos entre sí y de mayor tamaño que el pMA67 en cepas de *P. larvae* provenientes de EE.UU., pero ninguno fue caracterizado. Recientemente, Djucik y col. (2014) aislaron y secuenciaron dos plásmidos de 9,7 kB en dos cepas de *P. larvae* y los denominaron pPLA1_10 (ADFW01000008.1) y pPLA2_10 (CP003356.1), ambos plásmidos sólo diferían en 45 pb y contenían un factor de inicio de la replicación *rep* (Djucik *et al.*, 2014).

Estos plásmidos más grandes, como los contenidos en las cepas PL373 y PL374, podrían contener funciones conjugativas y, al coexistir en la misma cepa bacteriana aportarían a los plásmidos movilizables pPL373 y pPL374 las funciones necesarias para su movilización y conjugación; por lo que se justifica estudiarlos en profundidad para clarificar los mecanismos de transmisión plasmídica de *P. larvae* en la naturaleza.

Se determinó que los pequeños plásmidos movilizables de 5.000 pb contienen una mínima maquinaria MOB que les permite ser transportados por otros plásmidos. El gen de resistencia a Tc *tetL* contenido en los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395 le confirió resistencia a Tc a una cepa sensible de *P. larvae* (NRRL B-14154) en donde los plásmidos se replicaron en forma autónoma. Estas estirpes sólo se curaron con un tratamiento de calor combinado con naranja de acridina. Cabe destacar que estos experimentos de transformación son los primeros que se efectuaron empleando plásmidos *wild type* obtenidos de cepas resistentes a Tc de *P. larvae* sin el empleo de un vector puente. Estos tres plásmidos casi idénticos y movilizables fueron aislados

de distintas cepas de *P. larvae* con alta resistencia a Tc provenientes de mieles comerciales de EE.UU.

Las relaciones filogenéticas entre los plásmidos estudiados aquí y otros plásmidos con secuencias muy similares aislados de bacterias Gram (+) de los géneros *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Bhargavaea* y *Sporosarcina* de distintos nichos ecológicos y provenientes de distintas zonas geográficas nos sugieren que los genes *mob* presentes en dichos plásmidos pueden estar involucrados en una exitosa THG. El uso extensivo de Tc y OTC para el control de loque americana en algunos países de América pudo haber contribuido al incremento del número de cepas resistentes de *P. larvae*, favoreciendo la transferencia de estos plásmidos entre cepas del mismo patógeno o por transferencia desde otras especies de bacterias Gram (+) que pertenecen a la microbiota de la colmena (miel, tractos digestivos de abejas adultas y larvas, superficies florales y polen), como también entre otras especies de Firmicutes provenientes de nichos ecológicos tan diversos como suelos, sedimentos marinos y alimentos.

Nota: Los resultados de este capítulo se resumen en las siguientes publicaciones:

- **Alippi, A.M., López A.C., Reynaldi F.J., Grasso, D.H. & Aguilar O.M. (2007).** Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus larvae*, the causal agent of a honey bee larval disease. *Veterinary Microbiology* 125: 290-303.
- **Alippi, A.M., Reynaldi, F.J. & López A.C. (2013).** Evaluación del método epsilométrico Etest para la determinación de la sensibilidad a tetraciclina en *Paenibacillus larvae*, agente causal de la loque americana de las abejas. *Revista Argentina de Microbiología* 45 (4): 257-261.
- **de Graaf D.C., Alippi A.M., Antúnez K., Aronstein K.A., Budge G., De Koker D., De Smet L., Dingman D.W., Evans J.D., Foster L.J., Fünfhaus A., Garcia-Gonzalez E., Gregorc A., Human H., Murray K.D., Nguyen B.K., Poppinga L., Spivak M., Van Engelsdorp D., Wilkins S. & Genersch, E. (2013).** Review Article: Standard methods for American foulbrood research. *Journal of Apicultural Research* 52 (1). DOI 10.3896/IBRA.1.52.1.11. ISSN 0021-8839.
- **Alippi, A.M., León, I.E. & López A.C. (2014).** Identical tetracycline-resistance encoding plasmids from different *Paenibacillus larvae* strains isolated from commercial honeys. *International Microbiology* 17: 49-61.

CONCLUSIONES FINALES



Conclusiones Finales

Con el propósito de explorar la diversidad de *Paenibacillus larvae* hemos empleado procedimientos de microbiología clásica y de biología molecular, para analizar 742 aislamientos de bacterias Gram positivas esporuladas aeróbicas y/o microaeróbicas procedentes de distintas fuentes del apiario y realizar un análisis comparativo con cepas provenientes de Colecciones Internacionales o recibidas de otros laboratorios (n=88).

En base a las características fenotípicas y genotípicas se identificaron 306 aislamientos de *Paenibacillus larvae* provenientes tanto de larvas de abejas con síntomas clínicos (n= 54) como de mieles (n= 252). Además se identificaron 282 aislamientos de otras especies Gram positivas esporuladas aeróbicas, en las proporciones que se detallan a continuación: *Paenibacillus alvei* (28%), *Paenibacillus polymyxa* (0,3%), *Bacillus cereus* (45%), *Bacillus circulans* (2%), *Bacillus licheniformis* (1%), *Bacillus megaterium* (18%), *Bacillus mycoides* (3%), *Bacillus pumilus* (0,3%), *Bacillus subtilis* (2%), *Bacillus thuringiensis* (2%), *Brevibacillus laterosporus* (2%) y *Lysinibacillus sphaericus* (2%).

Hemos encontrado que una proporción importante de las larvas con síntomas clínicos de loque americana provenientes de Argentina, EE.UU. y Uruguay contienen poblaciones heterogéneas de *Paenibacillus larvae* y *Paenibacillus alvei*. La alta frecuencia de esporas de *P. alvei* en las muestras de larvas y escamas señalan a esta especie como un colonizador frecuente del apiario que probablemente se multiplica y esporula a expensas de larvas muertas por loque europea, loque americana u otras causas. Los ensayos de laboratorio permitieron establecer que la incorporación de ácido nalidíxico (9 µg/ml) al medio de cultivo MYPGP permite el aislamiento de *P. larvae* inhibiendo completamente el desarrollo de las colonias móviles de *P. alvei*, lo cual es útil para distinguir entre estas dos especies como habitantes de colmenares.

El análisis también permitió revelar que la proporción de las mieles conteniendo más de una especie bacteriana esporulada resistente al *shock* térmico de 80 °C es alta. Concluimos entonces que con el propósito de establecer un protocolo confiable para aislar a *P. larvae* es esencial adicionar ácido nalidíxico y ácido pipemídico al medio de cultivo.

El análisis de la configuración superficial de las esporas bacterianas mediante MEB permite distinguir entre sí a las especies bacterianas que componen la

microbiota de la colmena.

El uso del bacteriófago PPL1c resultó en este trabajo ser una herramienta útil para la identificación de cepas de *P. larvae*, el cual aportó elementos complementarios que se agregaron a las características fenotípicas.

Un objetivo de este trabajo fue la incorporación de criterios de análisis basados en la biología molecular para análisis de genomas. Se utilizó la técnica de rep-PCR para la tipificación de *P. larvae* a nivel de cepa. Se encontró que las cepas de esta especie provenientes de distintos orígenes geográficos son genéticamente homogéneas. La alta homogeneidad genética encontrada entre las cepas de *P. larvae* sugiere la existencia de una limitada presión de selección por parte de fuentes climáticas y ambientales.

El análisis por RFLP de un fragmento del gen 16S rDNA amplificado por PCR permite diferenciar a *Paenibacillus larvae* de otras bacterias esporuladas al emplear las endonucleasas *HaeIII* como *MspI*. Todas las cepas de *P. larvae* analizadas muestran patrones únicos diferenciándose del resto de las especies de *Paenibacillus*, y también de los *Bacillus* y géneros afines comúnmente presentes en miel. Adicionalmente, la restricción realizada con la enzima *HaeIII* muestra que dentro de la colección de aislamientos de *P. larvae*, el grupo ex *pulvificiens* presenta dos patrones distintos y diferentes a su vez del resto de las bacterias estudiadas.

Se encuentran correlaciones entre los perfiles de rep-PCR y de PCR/RFLP ya que los perfiles ERIC I/BOX-A, ERIC I/BOX-B, ERIC I/BOX-C y ERIC I/BOX-D coinciden con el perfil A obtenido con *HaeIII* y no presentan un sitio de corte con *HinfI*, mientras que el perfil ERIC-IV/ BOX-E se correlaciona con el patrón B con *HinfI*. Todos estos resultados permitieron concluir que el uso de marcadores moleculares es una herramienta de utilidad para establecer agrupamientos de las poblaciones de *P. larvae* y caracterizar los genotipos causantes de la enfermedad en determinadas regiones de brotes.

Se demostró que la combinación de las tiras E-Test con el agar ISO-Sensi Test es una excelente alternativa precisa y rápida para establecer las CIM de tetraciclina en las cepas de *P. larvae* y se adapta al trabajo de laboratorio para el análisis de numerosas cepas bacterianas.

Dado que los antibióticos derivados de tetraciclina son aplicados en el control de la enfermedad fue interesante en este trabajo examinar los determinantes genético de ese fenotipo. Encontramos que todas las cepas de *P. larvae* resistentes a Tc y OTC y sensibles a Mn contienen el determinante *tetL*. La resistencia a Tc codificada por el gen *tetL* presente en los plásmidos transfirió resistencia a Tc a cepas de *P. larvae*

susceptibles al antibiótico. Estos resultados y los trabajos de Murray y col. (2007) son los únicos que asocian resistencia a tetraciclinas con la presencia de plásmidos movilizables en *P. larvae*.

Los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395 pertenecen a la familia MOBv y contienen regiones MOB. La presencia de plásmidos con secuencias muy similares aislados de bacterias Gram (+) de distintos nichos ecológicos y provenientes de distintas zonas geográficas sugieren que los genes *mob* presentes en dichos plásmidos están involucrados en la transferencia horizontal de genes (Garcillán Barcia *et al.*, 2009; Tamminen *et al.*, 2011; Syvanem, 2012; Francia *et al.*, 2014).

El uso extensivo de tetraciclina y oxitetraciclina para el control de loque americana en algunos países de América ha generado una presión de selección en las poblaciones bacterianas del apiario que probablemente provocó y favoreció la proliferación y prevalencia de cepas resistentes. Este proceso de diseminación del fenotipo de resistencia es probablemente el resultado de la transferencia horizontal de plásmidos movilizables conteniendo el gen *tetL* entre cepas del patógeno y/o desde o hacia otros géneros de bacterias Gram (+).

Este trabajo aporta nuevas perspectivas en el campo del estudio de la biodiversidad de las poblaciones de *Paenibacillus larvae*, agente causal de la loque americana de las abejas, mediante la caracterización de genotipos de interés aplicado.

Bibliografía



Bibliografía

- Ackermann, H.W. (2007).** 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology* 152: 227-243.
- Adams, M.H. (1959).** Bacteriophages. Interscience Publishers. Inc. New York, 592 pp.
- Agersö, Y. & Guardabassi, L. (2005).** Identification of Tet 39, a novel class of tetracycline resistance determinant in *Acinetobacter* spp. of environmental and clinical origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55: 566-569.
- Ahmed I.; Yokota A.; Yamazoe A. & Fujiwara T. (2007).** Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 57: 1117-1125.
- Alippi, A.M. (1991).** A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee *Apis mellifera* L. in Argentina. *Journal of Apicultural Research* 30: 75-80.
- Alippi, A.M. (1992a).** Characterization of *Bacillus larvae* White the causative agent of AFB of honey bees. 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).** Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium. *Microbiología SEM* 11: 343-350.
- Alippi, A.M. (1999).** Bacterial Diseases, pp. 31-59. In: Bee Disease Diagnosis. (Eds. Colin, M.E.; Ball, B.V., and Kilani, M.). Options Méditerranéennes, Serie B: Etudes et Recherches. No. 25. CIHEAM Publications, Zaragoza. España, 182 pp.
- Alippi, A.M. (2000).** Is Terramycin® losing its effectiveness against AFB? The Argentinian experience. *Bee Biz* 11: 27-29.
- Alippi, A.M. & Aguilar, O.M. (1998a).** Characterization of isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* from diverse geographical origin by the polymerase chain reaction and BOX primers. *Journal of Invertebrate Pathology* 72: 21-27.
- Alippi, A.M. & Aguilar, O.M. (1998b).** Unique fingerprints of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* strains. *Journal of Apicultural Research* 37: 273-280.
- Alippi, A.M.; Albo, G.N.; Leniz, D.; Rivera, I.; Zanelli, M. & Roca, A.E. (1999).** Comparative study of tylosin, erythromycin and oxytetracycline to control

American Foulbrood of honey bees. *Journal of Apicultural Research* 38 : 149-158.

Alippi A.M.; Albo, G.N.; Reynaldi, F.J. & De Giusti, M.R. (2005). *In vitro* and *in vivo* susceptibility of the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* to the antibiotic tylosin. *Veterinary Microbiology* 109: 47-55.

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

Alvarez, M. A.; Herrero, M. & Suárez, J. E. (1998). The site-specific recombination system of the *Lactobacillus* species bacteriophage A2 integrates in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Virology* 250: 185–193.

Amábile-Cuevas, C.F. & Chicurel M.E. (1992). Bacterial plasmids and gene flux. *Cell* 70: 189-199.

Aminov, R.I. (2011). Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Frontiers in Microbiology* 2: 158 doi: 10.3389/fmicb.2011.00158

Ammor, M. S.; Gueimonde, M.; Danielsen, M.; Zagorec, M.; van Hoeck, A. H. A. M.; de los Reyes-Gavilán, C. G.; Mayo, B. & Margolles, A. (2008). Two different tetracycline resistance mechanisms, plasmid-carried *tet(L)* and chromosomally located transposon-associated *tet(M)*, coexist in *Lactobacillus sakei* Rits 9. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 1394–1401.

Andrup, L.; Jenseb, G.B.; Wilcks, A.; Smidt, L.; Hoflack, L. & Mahillon, J. (2003). The patchwork nature of rolling-circle plasmids: comparison of six plasmids from distinct *Bacillus thuringiensis* serotypes. *Plasmid* 49: 205–232.

Antúnez, K.; Piccini, C.; Castro-Sowinski, S.; Rosado, A.S.; Seldin, L. & Zunino, P. (2007). Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus larvae* isolates. *Veterinary Microbiology* 124: 178-183.

Antúnez, K.; Anido, M.; Schlapp, G.; Evans, J. D. & Zunino, P. (2009). Characterization of secreted proteases of *Paenibacillus larvae*, potential virulence factors involved in honeybee larval infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102: 129–32.

Arroyo, L.A.; García-Curiel, A.; Pachón-Ibañez, M.E.; Llanos, A.C.; Ruiz, M.; Pachón, J. & Aznar, J. (2005). Reliability of the E-test method for detection of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 903-905.

Ash, C.; Farrow, J. A. E.; Wallbanks, S. & Collins, M.D. (1991). Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* as revealed by comparative analysis of small subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology* 13: 202-206.

Ash, C.; Priest, F.G. & Collins, M.D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*

64: 253-260.

Ashiralieva, A. & Genersch, E. (2006). Reclassification, genotypes, and virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood in honeybees –a review. *Apidologie* 37: 411–420.

Bailey, L. (1957). The isolation and cultural characteristics of *Streptococcus pluton* (*Bacillus pluton* White) and further observations on *Bacterium eurydice* White. *Journal of General Microbiology* 17: 39-48.

Bailey, L. (1983). *Melissococcus pluton*, the cause of European foulbrood of honey bees (*Apis* spp.). *Journal of Applied Bacteriology* 55:65-69.

Bailey, L. & Ball, B.V. (Eds.) (1991). Honey Bee Pathology, Second Edition, Academic Press, London.

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. & Lee, D.C. (1962). *Bacillus larvae*: its cultivation *in vitro* and its growth *in vivo*. *Journal of General Microbiology* 29: 711-717.

Bakhiet, N. & Stahly, D.P. (1988). Properties of clear plaque mutants of the *Bacillus larvae* bacteriophages PBL0.5 and PBL2. *Journal of Invertebrate Pathology* 52: 78-83.

Barrit, M.M. (1936). The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of alfa-naphtol. *Journal of Pathology and Bacteriology* 42: 441.

Bartholomew, J.W. (1962). Variables influencing results, and the precise definition of steps in Gram staining as a means of standardizing the results obtained. *Stain Technology* 37: 139-155.

Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J.C. & Turck, M. (1996). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal of Clinical Pathology* 45: 493-496.

Benada, O.; Drobníková V.; Kalachová, L. & Ludvík, J. (1988). Plasmid DNA in *Bacillus larvae*. *Journal of Apicultural Research* 27: 35-39.

Bernhard, K.; Schrempf H. & Goebel, W. (1978). Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 133: 897-903.

Blanco, M.A.; Casimir, L. & Lopardo, H.A. (2008). Identificación y sensibilidad de bacilos Gram-negativos. Evaluación de uso de un sistema automatizado directamente de los frascos de hemocultivo. *ABCL* 42: 5-10.

Bodorova-Urgosikova, J.; Benada, O. & Tichy, P. (1992). Large-scale isolation and partial characterization of plasmid DNA from *Bacillus larvae*. *Folia Microbiologica*

37: 82-86.

Boe L.; Gros M.F.; te Riele H.; Ehrlich S.D. & Gruss A. (1989). Replication origins of single-stranded-DNA plasmid pUB110. *Journal of Bacteriology* 171: 2266-3372.

Botstein, D. (1980). A theory of modular evolution for bacteriophages. *Annals of New York Academy of Sciences* 354: 484–90.

Bradley, D.E. (1967). Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriological Reviews* 31: 230-314.

Bradley, D.E. & Franklin, J.G. (1958). Electron microscope survey of the surface configuration of spores of the genus *Bacillus*. *Journal of Bacteriology* 76: 618–630.

Brüssow, H. (2001). Phages of dairy bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55:283–303.

Brüssow, H. & Desiere, F. (2001). Comparative phage genomics and the evolution of *Siphoviridae*: Insights from dairy phages. *Molecular Microbiology* 39:213–222.

Bulla, L.A.; St. Julian, R.A.; Rhodes, R.A. & Hesseltine, C.W. (1969). Scanning-electron and phase-contrast microscopy of bacterial spores. *Applied Microbiology* 18: 490-495.

Caetano-Anollés, G. & Gresshoff, P.M. (eds.) (1998). DNA markers. Protocols, applications and overviews. Wiley-VCH, New York- Chichester-Weinheim-Brisbane-Singapore-Toronto, 363 pp.

Calesnich E.J. & White, J.W. (1952). Thermal resistance of *Bacillus larvae* spores in honey. *Journal of Bacteriology* 64: 9-15.

Campbell, M.A. (1992). Chromosomal insertion sites for phages and plasmids. *Journal of Bacteriology* 174:7495–7499.

Camugli, E.N. (1962). Estudio bacteriológico de la loque europea grave enfermedad de las larvas de abejas en la Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía de la UNLP* 38: 73-82.

Cantatore de Frank, N. (1980). *Capítulo X: Teoría del muestreo*. Manual de Estadística Aplicada, Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. páginas 207-228.

Carpana, E. (1991). Morphology of *Bacillus larvae* bacteriophage PBL3 and physical map of its DNA. *Journal of Invertebrate Pathology* 57: 141-143.

Carpana, E.; Marocchi, L. & Gelmini, L. (1995). Evaluation of the API system for the identification and biochemical characterization of *Bacillus larvae*. *Apidologie* 26: 11-16.

Chantawannakul, P. & Dancer, B.N. (2001). American Foulbrood in honey

bee. *Bee World* 82: 168-180.

Charbonneau, R.; Gosselin, P. & Thibault, C. (1992). Irradiation and American foulbrood. *American Bee Journal* 132: 249–251.

Cheshire, F.R. & Cheyne, W.W. (1885). The pathogenic history and history under cultivation of a new bacillus (*B. alvei*), the cause of a disease of the hive bee hitherto known as foulbrood. *Journal of the Royal Microscopical Society* 5: 581-601.

Chibani-Chennoufi, S.; Bruttin, A.; Dillmann, M-L. & Brüssow, H. (2004) Phage-Host Interaction: an Ecological Perspectiv. *Journal of Bacteriology* 186:3677.

Chopra, I. & Roberts, M.C. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology Molecular Biology Reviews* 65: 232–260.

Clinical and Laboratory Standards Institute –CLSI- (2006a). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; M7-A7, Wayne PA, EE.UU.

Clinical and Laboratory Standards Institute –CLSI- (2006b). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 17th Informational Supplement; M100- S16. Wayne PA, EE.UU.

Cluzel, R.J.; Serio, J. & Accolas, J.R. (1987). Interactions of *Lactobacillus bulgaricus* temperate bacteriophage 0448 with host strains. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 1850–1854.

Cremer, S.; Armitage, S. A.O. & Schmid-Hempel, P. (2007). Social immunity. *Current Biology* 17: R693–702. doi:10.1016/j.cub.2007.06.008

Dale J. W. & Park, S.F. (2010). Molecular genetics of bacteria. 5th Edition. John Wiley & Sons, 388 pp.

Davidson, E.W. (1973). Ultrastructure of AFB disease pathogenesis in larvae of the worker bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* 21: 53-61.

De Graaf, D.C.; Alippi, A.M.; Brown, M.; Evans, J.D.; Feldlaufer, M.; Gregorc, A.; Hornitzky, M.; Pernal, S.F.; Schuch, D.M.T.; Titěra, D.; Tomkies, V. & Ritter, W. (2006). Under the microscope. Diagnosis of American foulbrood disease in honeybees: A synthesis and proposed analytical protocols. *Letters in Applied Microbiology* 43: 583-590.

del Solar, G.; Kramer, M.G.; Ballester, S. & Espinosa, M. (1993). Replication of the promiscuous plasmid pLS1: a region encompassing the minus origin of replication is associated with stable plasmid inheritance. *Molecular General Genetics* 241: 97-105.

del Solar, G. ;Acebo, P. & Espinosa, M. (1995). Replication control of plasmid pLS1: efficient regulation of plasmid copy number is exerted by the combined action of two plasmid components, copG and RNA II. *Molecular Microbiology* 18: 913-924.

- Devine, K.M.; Hogan, S.T.; Higgins, D.G. & McConnell, D.J. (1989).** Replication and segregational stability of *Bacillus* plasmid pBAA1. *Journal of Bacteriology* 171: 1166-1172.
- 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.
- de la Cruz, F. & Davies, J. (2000).** Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends in Microbiology* 8: 128-133.
- Del Hoyo, M.; Basualdo, M., Lorenzo, A; Palacio, A.M., Rodriguez, E.M. & Bedascarrasburre, E. (2001).** Effect of shaking honey bee colonies affected by American Foulbrood on *Paenibacillus larvae larvae* spore loads. *Journal of Apicultural Research* 40: 65-69.
- Del Solar, G.; Kramer, M. G.; Ballester, S. & Espinosa, M. (1993).** Replication of the promiscuous plasmid pLS 1: a region encompassing the minus origin of replication is associated with stable plasmid inheritance. *Molecular and General Genetics* 241: 97-105.
- D´erelle, F. (1917).** Sur un microbe invisible antagonistes des bacilles disenteriques. *Comptes Rendus* 165: 373-375.
- Di Pinto, A.; Novello, L.; Terio, V. & Tantillo, G. (2011).** ERIC-PCR genotyping of *Paenibacillus larvae* in Southern Italian honey and brood combs. *Current Microbiology* 63: 416-419.
- Dingman, D.W. (2012).** *Paenibacillus larvae* 16S-23S rDNA intergenic transcribed spacer (ITS) regions: DNA fingerprinting and characterization. *Journal of Invertebrate Pathology* 110: 352-358.
- Dingman, D.W.; Bakhiet, N.; Field, C.C. & Stahly, D.P. (1984).** Isolation of two bacteriophages from *Bacillus larvae*, PBL1 and PBL0.5, and partial characterization of PBL1. *Journal of General Virology* 65: 1101-1105.
- Dingman, D.W. & Stahly, D.P. (1983).** Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 860-869.
- Djordjevic S.; Ho-Shon, M. & Hornitzky, M. (1994).** DNA restriction endonucleases profiles and typing of geographically diverse isolates of *Bacillus larvae*. *Journal of Apicultural Research* 33: 95-103.
- Djucik, M.; Brzuszkiewicz, E.; Fünfhaus, A.; Voss, J.; Gollnow, K.; Poppinga, L.; Liesegang, H.; Garcia-Gonzalez, E.; Genersch, E. & Rolf, D. (2014).** How to kill the honey bee larva: Genomic potential and virulence mechanisms of *Paenibacillus larvae*. *PLoS One* 9 (3): e90914.
Doi: 10.1371/journal.pone.0090914.

Drobniková, V.; Richter, V.; Häusler, J. & Pytelova, I. (1994). Characterization of *Bacillus larvae* and related bacilli by chromatography of cell fatty acids. *Journal of Apicultural Research* 33: 69-74.

Dunn, P.E. (1986). Biochemical aspects of insect immunology. *Annual Review of Entomology* 31: 321-339.

Dupont, L.; Boizet-Bonhoure, B.; Coddeville, M.; Auvray, F. & Ritzenthaler, P. (1995). Characterization of genetic elements required for site-specific integration of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bacteriophage mv4 and construction of an integration-proficient vector for *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology* 177: 586-595.

Eckhardt, T. (1978). A rapid method for identification of plasmid DNA in bacteria. *Plasmid* 1: 584-588.

Ellis, J.D. & Munn, P.A. (2005). The worldwide health status of honey bees. *Bee World* 86: 88-101.

Espinosa, M. (2013). Plasmids as models for studying macromolecular interactions: the pMV158 paradigm. *Research in Microbiology* 164: 199-204.

Evans, J.D. (2003). Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 83: 46-50.

Evans, J.D. (2004). Transcriptional immune response by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen *Paenibacillus larvae larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 85: 105-111.

Fernández-López, C.; Lorenzo-Díaz, F.; Pérez-Luque, R.; Rodríguez-González, L.; Boer, R.; Lurz, R.; Bravo, A.; Coll, M. & Espinosa, M. (2013). Nicking activity of the pMV158 MobM relaxase on cognate and heterologous origins of transfer. *Plasmid* 70: 120-130.

Fink, P.S.; Korman, R.Z.; Odebralski, J.M. & Zahler, S.A. (1981). *Bacillus subtilis* bacteriophage SPβcl is a deletion mutant of SPβ. *Molecular and General Genetics* 182: 514-515.

Forsgren, E.; Stevanovic, J. & Fries, I. (2008). Variability in germination and in temperature and storage resistance among *Paenibacillus larvae* genotypes. *Veterinary Microbiology*, 129: 342-349.

Fortina, M. G.; Pukall, R.; Schumann, P.; Mora, D.; Parini, C.; Manachini, P. L. & Stackebrandt, E. (2001). *Ureibacillus* gen. nov., a new genus to accommodate *Bacillus thermosphaericus* (Andersson et al. 1995), emendation of *Ureibacillus thermosphaericus* and description of *Ureibacillus terrenus* sp. nov. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 51: 447-455.

Francia, M. V.; Varsaki, A.; Garcillan-Barcia, M.P.; Latorre, A.; Drainas, C. & de la Cruz, F.A. (2004). Classification scheme for mobilization regions of

bacterial plasmids. *FEMS Microbiology Reviews* 28: 79-100.

Fries, I. & Camazine, S. (2001). Implications of horizontal and vertical pathogen transmission on honey bee epidemiology. *Apidologie* 32: 199-214.

Fries, I. & Raina, S. (2003). American Foulbrood and African honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* 96: 1641-1646.

Fries, I.; Lindstrom, A. & Korpela S. (2006). Vertical transmission of American Foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honey bees (*Apis mellifera*). *Veterinary Microbiology* 114: 269-274.

Garcillán-Barcia, M. P.; Francia, M.V. & de la Cruz, F.A. (2009). The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiology Reviews* 33: 657-687.

Gelvin, S.B. (2010). *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 223-256.

Genersch E. (2010). American Foulbrood in honey bees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: S10-S19.

Genersch, E. & Otten, C. (2003). The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) for genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Apidologie* 34: 195-206.

Genersch E.; Forsgren E.; Pentikainem J.; Ashiralieva A.; Rauch S.; Kilwiski J. & Fries I. (2006). Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 56: 501-511.

Gilliam, M. (1979). Microbiology of pollen and bee bread: the genus *Bacillus*. *Apidologie* 10: 269-274.

Gilliam, M. (1997). Identification and roles of non-pathogenic micro- flora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters* 155: 1-10.

Gilliam, M. & Dunham, D.R. (1978). Recent isolations of *Bacillus pulvifaciens* from powdery scales of honeybee, *Apis mellifera*, larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 32: 222-223.

Gilliam, M. & Valentine, D.K. (1976). Bacteria isolated from the intestinal contents of foraging workers honey bees, *Apis mellifera*: the genus *Bacillus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 28: 275-276.

Glinsky, Z. & Jarosz, J. (1995). Cellular and humoral defences in honey bees. *Bee World* 76: 195-205.

Glinsky, Z. & Rzedzicki, J. (1977a). Evaluation of *Bacillus larvae* to antibiotics

and sulphonamides isolated in Poland in 1962-1971. *Polskie Archiwum Weterynaryjne* 20: 9-16 .

Glinsky, Z. & Rzedzicki, J. (1977b). A comparison of the activity of certain new sulphonamide preparations against *Bacillus larvae* and other bacilli isolated from honey bees. *Polskie Archiwum Weferynaryjne* 20: 9-19.

Gochnauer, T.A. (1973). Growth, protease formation, and sporulation of *Bacillus larvae* in aerated broth culture. *Journal of Invertebrate Pathology* 22: 251-257.

Gochnauer, T.A. & Corner, J. (1987). Detection and identification of *Bacillus larvae* in a commercial pollen sample. *Journal of Apicultural Research* 13: 264-267.

González-Huici, V.; Salas, M. & Hermoso, J.M. (2004). The push-pull mechanism of bacteriophage ϕ 29 DNA injection. *Molecular Microbiology* 52: 529-540.

González-Huici, V.; Salas, M. & Hermoso, J.M. (2006). Requirements for *Bacillus subtilis* bacteriophage [Phi]29 DNA ejection. *Gene* 374: 19-25.

Gordon, R.E.; Haynes, W.C. & Pang, C.H-N (1973). The genus *Bacillus*, Agricultural Handbook No. 427, Washington, D.C., USDA Agricultural Research Service, USA.

Goodwin, M. & Van Eaton, C. (1999). *Elimination of American Foulbrood without the use of drugs*. National Beekeepers' s Association of New Zealand, 78 pp.

Govan V.A.; Allsopp, M.H. & Davidson, S. (1999). A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2243-2245.

Gregorc, A., & Bowen, I. D. (1998). Histopathological and histochemical changes in honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) after infection with *Bacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood disease. *Cell Biology International* 22: 137-144.

Grohmann, E.; Muth, G. & Espinosa, M. (2003). Conjugative plasmid transfer in Gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 277-301.

Gürtler, V. & Stanisich, V.A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*. 142: 3-16.

Halgasova, N.; Ugorcakova, J.; Gerova, M.; Timko, J.; Bukovska, G. (2010). Isolation and characterization of bacteriophage θ BP from *Paenibacillus polymyxa* CCM 7400. *FEMS Microbiology Letters* 305: 128-135.

Hannay, C.L. (1953). Crystalline inclusions in aerobic spore forming bacteria. *Nature* 172: 1004.

Hansen, H. (1984a). Methods for determining the presence of the foulbrood bacterium *Bacillus larvae* in honey. *Danish Journal of Plant and Soil Science* 88: 325-

328.

Hansen, H. (1984b.) The incidence of the foulbrood bacterium *Bacillus larvae* in honeys retailed in Denmark. *Danish Journal of Plant and Soil Science* 88: 329-336.

Hansen, H. & Broodsgaard C.J. (1999). American Foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World* 80: 5-23.

Hansen, H. & Rasmussen, B. (1986). The investigation of honey from bee colonies for *Bacillus larvae*. *Danish Journal of Plant and Soil Science* 90: 81-86.

Haseman, L. (1961). How long can spores of American Foulbrood live? *American Bee Journal* 101: 298-299.

Harmon, S.M.; Katter, D. & Lancett, G. (1991). Lipid globule staining to aid in differentiating *Bacillus* species. *Journal - Association of Official Analytical Chemists* 74: 649-651.

Haynes, W.C. (1972). The catalase test. An aid in the identification of *Bacillus larvae*. *American Bee Journal* 111: 130-131.

Heyndrickx, M.; Vandemeulebroecke, K.; Hoste, B.; Janssen, P.; Kersters, K.; De Vos, P.; Logan, N.A.; Ali, N. & Kerkeley, R.C.W. (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.

Hinnebusch, J. & Tilly, K. (1993). Linear plasmids and chromosomes in bacteria. *Molecular Microbiology* 10: 917-922.

Hitchcock, J.D.; Moffet, J.O.; Lackett, J.J. & Elliot, J.R. (1970). Tylosin for the control of AFB disease in honey bees. *Journal of Economic Entomology* 63: 204-207.

Hitchcock, J.D.; Stoner, A.; Wilson, W.T. & Menapace, D.M. (1979). Pathogenicity of *Bacillus pulvifaciens* to honey bee larvae of various ages (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 52: 238-246.

Höfte, H. & Whiteley, R. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology Reviews* 53: 242-255.

Holst, E.C. (1946). A single field test for American foulbrood. *American Bee Journal* 86: 14, 34.

Holst, E.C. & Sturtevant, A.P. (1940). Relation of proteolytic enzymes to phase of life cycle of *Bacillus larvae* and two new culture media for this organism. *Bacteriology* 40: 723-731.

Hornitzky, M.A.Z. & Clark, S. (1991). Culture of *Bacillus larvae* from bulk honey

samples for the detection of AFB. *Journal of Apicultural Research* 30: 13-16.

Hornitzky, M.A.Z & Djordjevic, S.P. (1992). Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide profiles and western blots of *Bacillus larvae*. *Journal of Apicultural Research* 31: 47-49.

Hornitzky, M.A.Z. & Karlovskis, S. (1989). A culture technique for the detection of *Bacillus larvae* in honeybees. *Journal of Apicultural Research* 28: 118-120.

Hornitzky, M.A.Z. & Wilson, S.C. (1989). A system for the diagnosis of the major bacterial brood diseases of honey bees. *Journal of Apicultural Research* 28: 191-195.

Hucker, G.J. & Conn, H.J. (1923). Methods of Gram staining. *Technical Bulletin of the New York State Agricultural Experimental Station*, 93.

Iurlina M.O. & Fritz, R. (2005). Characterization of microorganisms in Argentinian honeys from different sources. *International Journal of Food Microbiology* 105: 297-304.

Jaros J. & Gliński, Z. (1990). Selective Inhibition of Cecropin-like Activity of Insect Immune Blood by Protease from American Foulbrood Scales. *Journal of Invertebrate Pathology* 56: 143-149.

Jelinski, M. (1985). Some biochemical properties of *Bacillus larvae* White. *Apidologie* 16: 69-76.

Juhas M.; Crook, D.W. & Hood, D.W. (2008). Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell Microbiology* 10: 2377-2386.

Jung, M.Y.; Kim, J.S.; Paek, W.K.; Styrak, I.; Park, I.S.; Sin, Y.; Paek, J.; Park, K.A.; Kim, H.; Kim, H.L. & Chang, Y.H. (2012). Description of *Lysinibacillus sinduriensis* sp. nov., and transfer of *Bacillus massiliensis* and *Bacillus odysseyi* to the genus *Lysinibacillus* as *Lysinibacillus massiliensis* comb. nov. and *Lysinibacillus odysseyi* comb. nov. with emended description of the genus *Lysinibacillus*. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 62: 2347-2355.

Katznelson, H. (1950). *Bacillus pulvifaciens* (n. sp.), an organism associated with powdery scale of honey bee larvae. *Journal of Bacteriology* 59: 153-155.

Katznelson, H. & Jamieson, J.A. (1951). Antibiotics and other chemotherapeutic agents in the control of bee diseases. *Science Agriculture* 32: 219-225.

Kawamura, F. & Ito, J. (1974). Bacteriophage gene expression in sporulating cells of *Bacillus subtilis* 168. *Virology* 62: 414-425.

Khan, S. A. (1997). Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiology Molecular Biology Reviews* 61: 442-455.

Khan, S. A. (2005). Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research. *Plasmid* 53: 126-136.

Kim, M.K.; Kim, Y-A.; Park, M-J. & Yang, D-C. (2008). *Paenibacillus ginsengihumi* sp. nov., a bacterium isolated from soil in Taiwan. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 58: 1164-1168.

King, E. O.; Ward, M.K. & Raney, D.E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44: 301-307.

Ko, K.S.; Yeon-Sook K.; Lee, M.I.; Shin, S.Y.; Jung, D.K.; Peck, K.R. & Song, J-H. (2008). *Paenibacillus konsidensis* sp. nov. isolated from a patient. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 58: 2164-2168.

Kochansky, J.; Knox, D.A.; Feldlaufer, M. & Pettis, J.S. (2001). Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and -resistant *Paenibacillus larvae*. *Apidologie* 32: 215-222.

Kokubo, Y.; Jinbo, K.; Kaneko, S. & Matsumoto, M. (1984). Prevalence of spore-forming bacteria in commercial honey. *Annual Report Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health* 35: 192-196.

Kosteci, R. & Jelinski, M. (1977). Investigation on the sterilization of beeswax for foundation production. *Biuletyn Instytutu Weterynarii Pulawy* 21: 6-9.

Kovacs, N. (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature* 178: 703.

Krogh, A.; Larsson, B.; von Heijne, G. & Sonnhammer, E.L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* 305: 567-580.

Lauro, F. W.; Favaretto, M.; Covolo, L.; Rassa, M. & Bertoloni, G. (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.

Leer, R.J.; van Luijk, N.; Posno, M. & Pouwels P.H. (1992). Structural and functional analysis of two cryptic plasmids from *Lactobacillus pentosus* MD353 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. *Molecular and General Genetics* 234: 265-274.

Levy, S.B.; McMurry, L.M.; Barbosa, T.M.; Burdett, V.; Courvalin, P.; Hillen, W.; Roberts, M.C.; Rood, J.I. & Taylor, D.E. (1999). Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43: 1523-1524.

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

Loewen, P.C. (1997). Bacterial catalases, pp. 273-308. In: Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidants Defenses. (Scandalios, JG, ed.). Cold Spring

Harbor Laboratory Press, Woodbury, New York, USA.

Loeza Lara, P.D.; Valdez Alarcón, J. J.; Baizabal Aguirre, V.M. & López Mesa, J.E. (2004). Mecanismos de replicación de los plásmidos bacterianos. *Revista de Educación Bioquímica (REB)* 23: 71-78.

Loncaric, I.; Derakhshifar, I.; Oberlerchner, J.T.; Köglberger, H. & Moosbeckhofer, R. (2009). Genetic diversity among isolates of *Paenibacillus larvae* from Austria. *Journal of Invertebrate Pathology* 100: 44-46.

López, A.C.; De Ortúzar R.V.M. & Alippi, A.M. (2008). Tetracycline and oxytetracycline resistance determinants detected in *Bacillus cereus* strains isolated from honey samples. *Revista Argentina de Microbiología* 40: 231-236.

Lorenzo-Díaz, F.; Solano-Collado, V.; Lurz, R.; Bravo, A. & Espinosa, M. (2012). Autoregulation of the synthesis of the MobM relaxase encoded by the promiscuous plasmid pMV158. *Journal of Bacteriology* 7: 1789-1799.

Louws, F.J.; Fulbright, D.W.; Stephens, C.T. & de Bruijn, F.J. (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2286-2295.

Louws, F.J.; Bell, J.; Medina-Mora, C.M.; Smart, C.D.; Opgenorth, D.; Ishimaru, C.A.; Hausbeck, M.K.; de Bruijn, F.J. & Fulbright, D.W. (1998). Rep-PCR- mediated genomic fingerprinting: A rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology* 88: 862-868.

Lucchini, S.; Desiere, F. & Brüßow, H. (1999). Similarly organized lysogeny modules in temperate Siphoviridae from low G C content Gram-positive bacteria. *Virology* 263: 427-435.

Máchová, M. (1993). Resistance of *Bacillus larvae* in beeswax. *Apidologie* 24: 25-31.

Madsen, S.M.; Andrup, L. & Boe, L. (1993). Fine mapping and DNA sequence of replication functions of *Bacillus thuringiensis* plasmid pTX14-3. *Plasmid* 30: 119-130.

Matheson, A. (1993). World bee health report. *Bee World* 74: 176-212.

Matheson, A. (1996). World bee health update 1996. *Bee World* 77: 45-51.

Matheson, A. & Reid, M. (1992). Strategies for the prevention and control of AFB. Parts I, II and III. *American Bee Journal* 132(6): 399-402; 133(7): 471-475; 134(8): 534-547.

Matsuka, W.A. & Nakamura, H. (1990). Oxytetracycline residues in honey and royal jelly. *Journal of Apicultural Research* 29: 112-117.

Mayr-Harting, A.M.; Hedges, A.J. & Berkeley, R.C.W. (1972). Methods for

studying bacteriocins. *Methods in Microbiology* 7 A, 315-422.

Meade, H.M.; Long, S.R.; Ruvkun, G.B.; Brown, S.E. & Ausubel, F.M. (1982). Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *Journal of Bacteriology* 149: 114-122.

Michalova, E.; Novotna, P. & Schlegelova, J. (2004). Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. *Veterinarni Medicina (Vet. Med.-Czech.)* 49: 79-100.

Miyagi, T.; Peng, C.Y.S.; Chuang, R.Y.; Mussen, E.C.; Spivak, M.S. & Doi, R. H. (2000). Verification of Oxytetracycline-Resistant American Foulbrood Pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology* 75: 95-96.

Mohamed, M.J.; Marston, C.K.; Popovic, T.; Weyant, R.S. & Tenover, F.C. (2002). Antimicrobial susceptibility testing of *Bacillus anthracis*: Comparison of results obtained by using the National Committee for Clinical Laboratory Standards broth microdilution reference and Etest agar gradient diffusion methods. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 1902-1907.

Morar, M. & Wright, G.D. (2010). The genomic enzymology of antibiotic resistance. *Annual Review of Genetics* 44: 25-51.

Moreno, F. (1979). On the trapping of phage genomes in spores of *Bacillus subtilis* 168. Reciprocal exclusion of phages $\phi 29$ and ϕe during outgrowth of spores. *Virology* 93: 357-368.

Morse R.A. & Nowogrodzki R. (Eds.) (1990). Honey bee pests, predators and diseases. Second Ed., *Cornell University Press*, 474 pp.

Morse, R.A. & Shimanuki, H. (1990). Summary of control methods, pp. 341-361. In: *Honey Bee Pests, Predators and Diseases*, 2nd ed., Morse, R.A and Nowogrodzki, R. (eds). Cornell University Press, USA.

Murray, D. & Aronstein, K. A. (2006). Oxytetracycline-resistance in the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae* is encoded on novel plasmid pMA67. *Journal of Apicultural Research* 46: 207-214.

Murray, K.D.; Aronstein, K.A. & de León, J.H. (2007). Analysis of pMA67, a predicted rolling-circle replicating, mobilizable, tetracycline-resistance plasmid from the honey bee pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Plasmid* 58: 89-100.

Murray, K.D. & Aronstein, K.A. (2008). Transformation of the Gram-positive honey bee pathogen, *Paenibacillus larvae* by electroporation. *Journal of Microbiological Methods* 75: 325-328.

Muyzer, G. (1999). DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2: 317-322.

Nakamura, L.K. (1984). *Bacillus pulvifaciens* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34: 410-413.

Nazina, T.N.; Tourova, T.P.; Poltarau, A.B.; Novikova E.V.; Grigoryan, A.A.; Ivanova A.E.; Lysenko, A.M.; Petrunyaka, V.V.; Osipov, G.A.; Belyaev, S.S. & Ivanov, M.V. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 51: 433-446.

Neuendorf, S.; Hedtke, K.; Tangen, G. & Genersch, E. (2004). Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae*, a honey bee bacterial pathogen. *Microbiology* 150: 2381-2390.

Ng, L-K.; Martin, I.; Alfa, M. & Mulvey, M. (2001). Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular Cell Probes* 15: 209-215.

Niimura, Y.; Koh, E.; Yanagida, F.; Suzuki, K.-I.; Komagata, K. & Kozaki, M. (1990). *Amphibacillus xylanus* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic sporeforming xylan-digesting bacterium which lacks cytochrome, quinone, and catalase. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40: 297-301.

Nördstrom, S. & Fries, I. (1995). A comparison of media and cultural conditions for identification of *Bacillus larvae* in honey. *Journal of Apicultural Research* 34: 97-103.

Novick, R.P. (1989). Staphylococcal plasmids and their replication. *Annual Review of Microbiology* 43: 537-565.

OIE (2011). Chapter 9.2. American Foulbrood. In OIE. Terrestrial Animal Health Code, vol. 2, OIE, France; Pp 504-506 (Twentieth Edition).

Oldroyd, B.P.; Goodman, R.D.; Hornitzky, M.A.Z. & Chandler, D. (1989). The effect on AFB of standard oxytetracycline hydrochloride treatments for the control of EFB of honeybees (*Apis mellifera*). *Australian Journal of Agricultural Research* 40: 691-697.

Olembo, R. (1991). Importance of microorganisms and invertebrates as components of biodiversity. pp. 7-15. In: D.L. Hawksworth (ed.). *The biodiversity of microorganisms and invertebrates: Its role in sustainable agriculture*. Redwood Press, Melksham, UK.

Olive, D.M. & Bean, P. (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1661-1669.

Olsen, P.E.; Grant, G.A.; Nelson, D.L. & Rice, W.A. (1990). Detection of American Foulbrood disease of the honey-bee, using a monoclonal antibody specific to *Bacillus larvae* in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Canadian Journal of Microbiology* 36: 732-735.

Otte, E. (1973). Contribution to the laboratory diagnosis of American Foulbrood (AFB) of the honeybee with particular reference to the fluorescent antibody technique. *Apidologie* 4: 331-339 (En alemán).

Otvos, L. Jr. (2000). Antibacterial peptides isolated from insects. *Journal of Peptide Science* 6: 497-511.

Pang, Y.; Bosch, T. & Roberts, M.C. (1994). Single polymerase chain reaction for the detection of tetracycline resistant determinants *Tet K* and *Tet L*. *Molecular Cell Probes* 8: 417-422.

Parry, J.M.; Turnbull, P.C.B. & Gibson, J.R. (1983). A Colour Atlas of *Bacillus* species. Wolfe Medical Publications Limited, 272 pp.

Pao, S.S.; Paulsen, I.T.; & Saier, M.H. (1998). Major Facilitator Superfamily. *MMBR* 62: 1-34.

Peng, C.Y-S.; Mussen, E.; Fong, A.; Cheng, P.; Wong, G. & Montague, M.A. (1996). Laboratory and field studies on the effects of the antibiotic tylosin on honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Development and prevention of AFB disease. *Journal of Invertebrate Pathology* 67: 65-71.

Phelan, R.W.; Clarke, C.; Morrissey, J.P.; Dobson, A.D.W.; O'Gara, F., & Barbosa, T.M. (2011). Tetracycline Resistance-Encoding Plasmid from *Bacillus* sp. Strain #24, Isolated from the Marine Sponge *Haliclona simulans*. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 327-329.

Peters M.; Kilwinski J.; Beringhoff A.; Reckling, D. & Genersch, E. (2006). American foulbrood of the honey bee: occurrence and distribution of different genotypes of *Paenibacillus larvae* in the administrative district of Arnsberg (North Rhine-Westphalia). *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 53: 100-104.

Piana, M.L.; Poda, G.; Cesaroni, D.; Cuetti, L.; Bucci, M.A. & Gotti, P. (1991). Research on microbial characteristics of honey samples of Udine province. *Rivista della Societa Italiana di Scienza dell'Alimentazione* 20: 293-301.

Piccini, C. & Zunino, P. (2001). American Foulbrood in Uruguay: Isolation of *Paenibacillus larvae* from larvae with clinical symptoms and adult honey bees and susceptibility to oxytetracycline. *Journal of Invertebrate Pathology* 78: 176-177.

Pirttijärvi, T.S.M.; Graeffe, T.H. & Salkinoja-Salonen, M.S. (1996). Bacterial contaminants in liquid packaging boards: assessment of potential for food spoilage. *Journal of Applied Bacteriology* 81: 445-458.

Pirttijärvi, T.S.M.; Ahonen, L.M.; Maunuksela, L.M. & Salkinoja-Salonen,

M.S. (1998). *Bacillus cereus* in a whey process. *International Journal of Food Microbiology* 44: 31-41.

Pirttijärvi, T.S.M.; Andersson, M.A.; Scoging, A.C. & Salkinoja-Salonen, M.S. (1999). Evaluation of methods for recognising strains of the *Bacillus cereus* group with food poisoning potential among industrial and environmental contaminants. *Systematic and Applied Microbiology* 22: 133-144

Plagemann, O. (1985). A simple culture method for the bacteriological identification of *Bacillus larvae* on Columbia-blood slant agar. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 98: 61-62. (En alemán).

Plagemann, O. (1991). Sensitivity of *Bacillus larvae* to antibiotics and sulphonamides. *Tierärztliche Umschau*, 46: 24-27. (En alemán).

Poole, K. (2002). Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology* 92, Suppl. 1: 55S-64S.

Priest, F.G.; Goodfellow, M. & Todd, C. (1988). A numerical classification of the genus *Bacillus*. *Journal of General Microbiology* 143: 1847-1882.

Projan, S.J. & Novick, R.P. (1988). Comparative analysis of five related staphylococcal plasmids. *Plasmid* 19: 203-221.

Puerta Puerta, F. ; Flores Serrano, J.M.; Ruiz Martínez, J.A.; Ruz Luque, J.M.; Campano Cabanes, F. (2001). Enfermedades de las abejas. Prevención, diagnóstico y tratamiento. COAG, Andalucía, España. 189 pp.

Rademaker, J.L.W.; Louws, F.J. & de Bruijn, F.J. (1997). Characterization of the diversity of ecological important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D. & De Bruijn, F.J. *Molecular Microbial Ecology Manual*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Supplement 3, Chapter 3.4.3, pp. 1-26.

Ratnieks, F.L.W. (1992). American Foulbrood: the spread and control of an important disease of the honey bee. *Bee World* 73: 177- 191.

Reynaldi, F.J.; Albo, G.N. & Alippi, A.M. (2008). Effectiveness of tilmicosin against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood Disease of honey bees. *Veterinary Microbiology* 132: 119-128.

Roberts, M.C. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Letters* 245: 195-203.

Roberts, M.C. (2011). Environmental macrolide–lincosamide–streptogramin and tetracycline resistant bacteria. *Frontiers in Microbiology* 2: 40.

Rosado, A. S.; Duarte, G. F.; Seldin, L. & van Elsas J. D. (1997). Molecular Microbial Ecology: A Minireview. *Revista de Microbiologia* 28:135-147.

Rusenova, N.; Parvanov, P. & Stanilova, S. (2013). Molecular typing of

Paenibacillus larvae strains isolated from Bulgarian apiaries based on repetitive element polymerase chain reaction (Rep-PCR). *Current Microbiology* 66: 573-577.

Salyers, A.A. & Amabile-Cuevas, C.F. (1997). Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41:2321-2325.

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

Schaeffer, A.B. & Fulton, M. (1933). A simplified method of staining endospores. *Science* 77: 194, New York.

Schäfer, M.O.; Genersch, E.; Fünfhaus, A.; Poppinga, L.; Formella, N.; Bettin, B. & Karger, A. (2014). Rapid identification of differentially virulent genotypes of *Paenibacillus larvae*, the causative organism of American Foulbrood of honey bees, by whole cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Veterinary Microbiology* 170: 291-297.

Schlesner, H.; Lawson, P.A.; Collins, M.D.; Weiss, N., Wehmeyer, U.; Volker, H. & Thomm, M. (2001). *Filobacillus milensis* gen. nov., sp. nov., a new halophilic spore-forming bacterium with Orn-D-Glutype peptidoglycan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 425-431.

Schröder, G. & Lanka, E. (2005). The mating pair formation system of conjugative plasmids - A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. *Plasmid* 54: 1-25.

Schuch, D.M.T.; Madden, R.H. & Sattler, A. (2001). An improved method for the detection and presumptive identification of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in honey. *Journal of Apicultural Research* 40: 59-64.

Seegers, J.F.M.L.; Zhao, A.; Meijer, W.J.J.; Khan, S.A.; Venema, G. & Bron, S. (1995). Structural and functional analysis of the single-strand origin of replication from the lactococcal plasmid pWVo1. *Molecular and General Genetics* 249: 43-50.

Seeley, T.D. (1985). *Honeybee ecology. A study of adaptation in social life.* Princeton University Press, New Jersey, USA, 201 pp.

Seery, L.T & Devine, K.M. (1993). Analysis of Features Contributing to Activity of the Single-Stranded Origin of *Bacillus* Plasmid pBAA1. *Journal of Bacteriology* 175: 1988-1994.

Shida, O.; Takagi, H.; Kadowaki, K. & Komagata, K. (1996). Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 939-946.

Shimanuki, H. (1990). Bacteria, pp. 27-47. In: *Honey bee pests, predators and diseases.* Second Ed., Morse R.A and Nowogrodzki R. (eds.). Cornell University Press, USA.

Shimanuki, H. & Knox, D.A. (1988). Improved method for the detection of *Bacillus larvae* spores in honey. *American Bee Journal* 128: 353-354.

Shimanuki, H. & Knox, D.A. (1991). Diagnosis of honey bee diseases. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook N°. AH-690, 53 pp.

Shimanuki, H. & Knox, D.A. (1994). Susceptibility of *Bacillus larvae* to terramycin. *American Bee Journal* 134: 125-126.

Snowdon, J.A. & Cliver, D.O. (1996). Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology* 31: 1-26.

Sonenshein, A.L. (1970). Trapping of unreplicated phage DNA into spores of *Bacillus subtilis* and its stabilization against damage by 32P decay. *Virology* 42: 488-495.

Spivak, M. & Gilliam, M. (1998a). Hygienic behaviour of honey bees and its application to control brood diseases and varroa, Part I. Hygienic behaviour and resistance to American Foulbrood. *Bee World* 79: 124-134.

Spivak, M. & Gilliam, M. (1998b). Hygienic behaviour of honey bees and its application to control brood diseases and varroa, Part II. Studies on hygienic behavior since the Rothenbullen era. *Bee World* 79: 169-186.

Spivak, M. & Reuter, G.S. (2001) Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies, *Apis mellifera*, bred for hygienic behavior. *Apidologie* 32: 555-565.

Sporns, P.; Kwan, S. & Roth, L.A. (1986). HPLC analysis of oxytetracycline residues in honey. *Journal of Food Protection* 49: 383-388.

Stahly, D.P. & Ryan, K.C. (1995). Minimal inhibitory concentrations of virginiamycin and flavomycin for *Bacillus larvae*. *Bee Science* 3: 162-164.

Stahly, D.P.; Alippi, A.M.; Bakhiet, N.; Campana, C.F.; Novak, C.C. & Cox, R. (1999). PPL1c, a virulent mutant bacteriophage of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae*, that may be of value for bacterial identification. *Journal of Invertebrate Pathology* 74: 295-296.

Syanem, M. (2012). Evolutionary implications of horizontal gene transfer. *Annual Review of Genetics* 46: 341-358 DOI: 10.1146/annurev-genet-110711-155529.

Tamminen, M.; Virta, M.; Fani, R. & Fondi, M. (2012). Large-scale analysis of plasmid relationships through gene-sharing networks. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1225–1240. doi:10.1093/molbev/msr292.

Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher G.; Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

Tanada, Y. & Kaya, H.K. (eds.).(1993). *Insect Pathology*. Academic Press Inc., Harcourt Brace Jovanovich Publishers, 666 pp.

Tenover, F.C.; Arbeit, R.D. ; Goering, R. V. ; Mickelsen, P.A. ; Murray, B.E. Persing, D.H. & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulse-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 2233-2239.

te Riele, H.; Michel, B. & Ehrlich, S.D. (1986). Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 83: 2541-2545.

Twort, F.W. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*, 186 (4814): 1241-1243.

Tysset, C.; Durand, C. & Taliergio, Y.P. (1970). Contributions to the study of the microbial contamination and the hygiene of commercial honey. *Recueil de Medecine Veterinaire* 146: 1471-1492.

Vandamme, P.; Pot, B.; Gillis, M.; De Vos, P.; Kersters, K. & Swings, J. (1996). Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. *Microbiological Reviews* 60: 407-438.

Vary, P.S.; Garbe, J.C.; Franzen, M. & Frampton, E. (1982). MP13, a generalized transducing bacteriophage from *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology* 149: 1112-1119.

Ventura, M.; Zomer, A.; Canchaya, C.; O'Connell-Motherway, M.; Kuipers, O.; Turrioni, F.; Ribbera, A.; Foroni, E.; Buist, G.; Wegmann, U.; Shearman, C.; Gasson, M.J.; Fitzgerald, G.F. & van Sinderen, D. (2007). Comparative analysis of prophage-like elements present in two *Lactococcus lactis* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 7771-7780.

Versalovic, J.; Schneider, M.; de Bruijn, F.J. & Lupski, J.R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5: 25-40.

Wainø, M.; Tindall, B.J.; Schumann, P. & Ingvorsen, K. (1999). *Gracilibacillus* gen. nov., with description of *Gracilibacillus halotolerans* gen. nov., sp. nov.; transfer of *Bacillus dipsosauri* to *Gracilibacillus dipsosauri* comb. nov., and *Bacillus salexigens* to the genus *Salibacillus* gen. nov., as *Salibacillus salexigens* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 821-831.

Wang, M.; Yang, M.; Zhou, G.; Luo, X.; Zhang, L.; Tang, Y. & Fang, C. (2008). *Paenibacillus tarimensis* sp. nov., isolated from sand in Xinjiang, China. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 58: 2081-2085.

Watson, L.P.; McKee, A.E. & Merrell, B.R. (1980). Preparation of microbiological specimens for scanning electron microscopy. *Scanning Electron Microscopy* 2, 45-56.

Wheatcroft, R.; McRae, D.G. & Miller, R.W. (1990). Changes in the *Rhizobium*

meliloti genome and the ability to detect supercoiled plasmids during bacteroid development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 3: 9-17.

White, G.F. (1906). *The bacteria of the apiary with special reference to bee disease.* US Department of Agriculture, Bureau of Entomology, Technical Series No. 14, 50 pp.

White, G.F. (1907). *The cause of American Foulbrood.* U.S. Department of Agriculture, Bureau of Entomology, Circular 94, 4 pp.

White, G.F. (1912). *The cause of European Foulbrood.* U.S. Department of Agriculture, Bureau of Entomology, Circular 157, 15 pp.

White, G.F. (1920a). *American Foulbrood.* U.S. Department of Agriculture, Bureau of Entomology, Bulletin No. 809, 54 pp.

White, G.F. (1920b). *European Foulbrood .* U.S. Department of Agriculture, Bureau of Entomology, Bulletin No 810, 47 pp.

Wisotzkey, J. D.; Jurtshuk, P.; Jr, Fox, G.E.; Deinhard, G. & Poralla, K. (1992). Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematics Bacteriology* 42: 263-269.

Woese, C.R. (1987). Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews* 51: 221-271.

Woodrow, A.W. (1942). Susceptibility of honeybee larvae to individual inoculations with spores of *Bacillus larvae*. *Journal of Economic Entomology* 35: 892-895.

Wu, X-Y; Chin, J.; Ghalayini, A. & Hornitzky, M. (2005). Pulsed-field gel electrophoresis typing and oxytetracycline sensitivity of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* isolates of Australian origin and those recovered from honey imported from Argentina. *Journal of Apicultural Research* 44: 87-92.

Yoon, B.S. (1997). Phylogeny of *Paenibacillus larvae* sp. based on 16S rRNA sequences. Unpublished reference, GenBank Accession number: U86605.

Yoon, J.H.; Weiss, N.; Lee, K.C.; Lee, I.S., Kang, K.H. & Park, Y.H. (2001). *Jeotgalibacillus alimentarius* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium isolated from jeotgal with L-lysine in the cell wall, and reclassification of *Bacillus marinus* Ruger 1983 as *Marinibacillus marinus* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 51: 2087–2093.

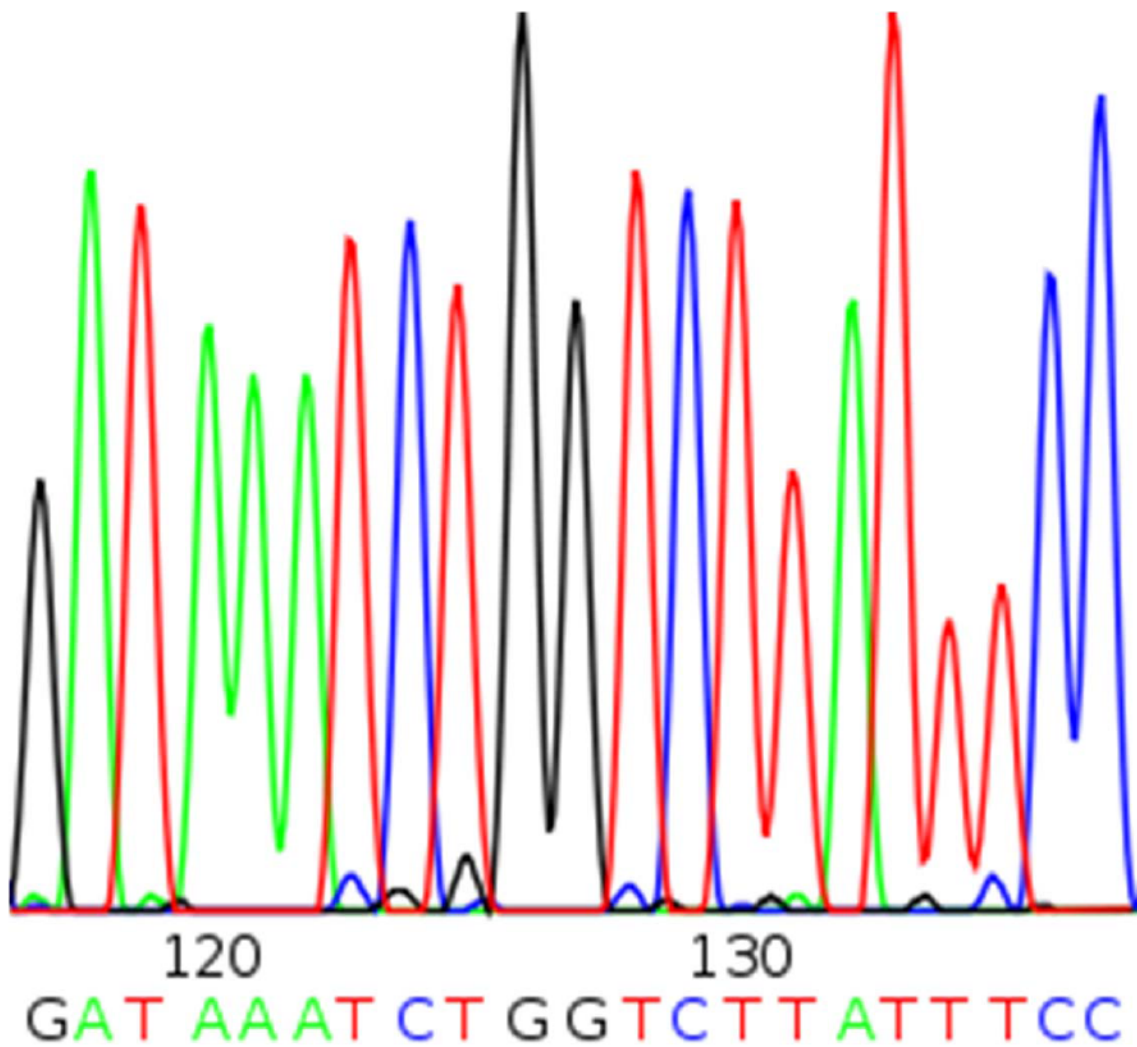
Yoon, J.H.; Seo, W.T.; Shin, Y.K., Kho, Y.H.; Kang, K.H. & Park, Y.H. (2002). *Paenibacillus chinjuensis* sp. nov., a novel exopolysaccharide-producing bacterium. *International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology* 52: 415-421.

You, Y.; Hilpert, M. & Ward, M.J. (2012). Detection of a common and persistent

tet(L)-carrying plasmid in chicken-waste-impacted farm soil. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 3203-3213.

Yue, D.; Nordhoff, M.; Wieler, L.H. & Genersch, E. (2008). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology* 10: 1612-1620.

Apéndices



Apéndice I

Cepario de trabajo de *Paenibacillus larvae*

Cepa	Origen	Localidad	Año	Fuente
PL 1	restos larvales	Argentina, Zárate, Bs. As.	1992	a
PL 2	restos larvales	Argentina, Lobos, Bs. As.	1992	a
PL 3	restos larvales	Argentina, Concordia, E. Ríos.	1992	a
PL 4	restos larvales	Argentina, Punta Alta, Bs. As.	1994	a
PL 5	restos larvales	Argentina, La Plata, Bs. As.	1994	a
PL 6	restos larvales	Argentina, Lincoln, Bs. As.	1994	a
PL 7	restos larvales	Argentina, Pigüé, Bs. As.	1994	a
PL 8	restos larvales	Argentina, Bs. As.	1994	a
PL 9	restos larvales	Argentina, Olavarría, Bs.As.	1994	a
PL 10	restos larvales	Argentina, Gral. Pico, La Pampa	1994	a
PL 11	restos larvales	Argentina, La Plata, Bs. As.	1994	a
PL 12	restos larvales	Argentina, Arroyito, Córdoba	1995	a
PL 13	restos larvales	Argentina, Balnearia, Córdoba	1995	a
PL 14	restos larvales	Argentina, San Martín, La Pampa	1995	a
PL 15	restos larvales	Argentina, La Plata, Bs. As.	1995	a
PL 16	restos larvales	Argentina, City Bell, Bs. As.	1995	a
PL 18	restos larvales	Argentina, Bavio, Bs. As.	1995	a
PL 19	restos larvales	Argentina, Tandil, Bs. As.	1995	a
PL 20	restos larvales	Argentina, Mar del Plata, Bs. As.	1995	a
PL 21	escamas	Nueva Zelanda	1995	c
PL 22	escamas	Nueva Zelanda	1995	c
PL 23	escamas	Nueva Zelanda	1995	c
PL 24	escamas	Nueva Zelanda	1995	c
PL 25	escamas	Nueva Zelanda	1995	c
PL 26	escamas	Nueva Zelanda	1995	c
PL 27	restos larvales	Argentina, Tornquist, Bs. As.	1995	a
PL 28	restos larvales	Argentina, C. Choel, R. Negro.	1995	a
PL 29	escamas	Nueva Zelanda	1995	c
PL 30	escamas	Nueva Zelanda	1995	c
PL 31	escamas	Nueva Zelanda	1995	c
PL 32	restos larvales	Argentina, Alto Alegre, Córdoba.	1995	a
PL 33	restos larvales	Argentina, Chascomús, Bs. As.	1995	a
PL 34	restos larvales	Argentina, Valle Medio, R. Negro.	1995	a
PL 35	restos larvales	Argentina, Chimpay, R. Negro.	1995	a
PL 36	restos larvales	Argentina, Valle Medio, R. Negro	1995	a
PL 37	restos larvales	Argentina, Valle Medio, R. Negro.	1995	a

PL 38	restos larvales	Argentina, Chimpay, R. Negro.	1995	a
PL 39	restos larvales	Argentina, Gral. Alvear, Mendoza.	1995	a
PL 40	escamas	Italia, Pescara	1994	d
PL 41	escamas	Italia, Lecce	1991	d
PL 42	escamas	Italia, Modena	1992	d
PL 43	escamas	Italia, Modena	1995	d
PL 44	escamas	Italia, Padova	1995	d
PL 45	escamas	Francia, Vanchuse	1995	e
PL 46	escamas	Francia, Vanchuse.	1995	e
PL 47	escamas	Francia, Var	1995	e
PL 48	escamas	Francia, Var	1995	e
PL 49	escamas	Francia, Var	1995	e
PL 50	restos larvales	Argentina, Lincoln, Bs. As.	1995	a
PL 51	restos larvales	Argentina, Lincoln, Bs. As.	1995	a
PL 52	restos larvales	Argentina, Chascomus, Bs. As.	1995	a
PL 53	restos larvales	Argentina, Chascomus, Bs. As.	1995	a
PL 54	restos larvales	Argentina, Balcarce, Bs. As.	1995	a
PL 55	restos larvales	Argentina, Balcarce, Bs. As.	1995	a
PL 56	escamas	Suecia, Uppsala	1995	f
PL 57	escamas	Suecia, Uppsala	1995	f
PL 58	escamas	Suecia, Uppsala	1995	f
PL 59	escamas	Suecia, Uppsala	1995	f
PL 60	restos larvales	Argentina, Bolivar, Bs. As.	1995	a
PL 61	restos larvales	Argentina, Bolivar, Bs. As.	1995	a
PL 62	miel	Argentina, Ranchos, Bs. As.	1995	a
PL 63	miel	Argentina, Ranchos, Bs. As.	1995	a
PL 64	miel	Argentina, Ranchos, Bs. As.	1995	a
PL 65	restos larvales	Argentina, Las Flores, Bs. As.	1995	a
PL 66	restos larvales	Argentina, Las Flores, Bs. As.	1995	a
PL 67	larva de reina	Argentina, La Plata, Bs. As.	1995	a
PL 68	escamas	Polonia, Swar	1996	g
PL 69	escamas	Polonia, Swar	1996	g
PL 70	escamas	Polonia, Grye	1996	g
PL 71	escamas	Polonia, Grye	1996	g
PL 72	escamas	Polonia, Grye	1996	g
PL 73	escamas	Polonia, Skierne	1996	g
PL 78	miel	Argentina	1996	a
PL 79	restos larvales	Argentina, Tres Arroyos, Bs. As.	1996	a
PL 80	restos larvales	Argentina, Dufour, Bs.As.	1996	a
PL 81	restos larvales	Argentina, Dufour, Bs.As.	1996	a
PL 82	restos larvales	Argentina, I. Correa, Bs. As.	1996	a
PL 83	cultivo	EE.UU., Arkansas (95961)	1996	h
PL 84	cultivo	EE.UU., Indiana (96039)	1996	h

PL 85	cultivo	EE.UU., N. York (95117)	1996	h
PL 86	cultivo	EE.UU. , Ohio (95105)	1994	h
PL 87	cultivo	EE.UU. , Ohio (95106)	1994	h
PL 88	cultivo	EE.UU., Ohio (95237)	1996	h
PL 89	escamas	Alemania, Holzkirchen	1994	i
PL 90	escamas	Alemania, Holzkirchen	1994	i
PL 91	escamas	Alemania, Holzkirchen	1994	i
PL 92	restos larvales	Argentina, Córdoba, Marcos Juárez	1995	a
PL 93	restos larvales	Argentina, Córdoba	1995	a
PL 94	miel	Argentina, Santiago del Estero	1996	a
PL 95	cultivo	Inglaterra, Devon (2)	1997	j
PL 96	cultivo	Inglaterra, Leicester (25)	1997	j
PL 97	cultivo	Inglaterra, Kent (26)	1997	j
PL 98	miel	Argentina	1997	a
PL 99	miel	Argentina	1997	a
PL 100	restos larvales	Túnez	1997	a
PL 102	miel	Argentina	1997	a
PL 105	miel	Argentina, Magdalena, Bs. As.	1997	a
PL 106	miel	Argentina, La Plata, Bs. As.	1997	a
PL 107	miel	Argentina, Magdalena, Bs. As.	1997	a
PL 108	miel	Argentina, Magdalena, Bs. As.	1997	a
PL 109	restos larvales	Argentina, Córdoba, Marcos Juárez	1995	a
PL 110	miel	Argentina, Magdalena, Bs. As.	1997	a
PL 111	miel	Argentina, Magdalena, Bs. As.	1998	a
PL 112	miel	Argentina, Rauch, Bs. As.	1998	a
PL 113	miel	Argentina, Saavedra, Bs. As.	1999	a
PL 114	miel	Argentina, Guaminí, Bs. As.	1999	a
PL 115	miel	Argentina, Laprida, Bs. As.	1999	a
PL 116	miel	Argentina, Laprida, Bs. As.	1999	a
PL 117	miel	Argentina, Pta. Indio, Bs. As.	1999	a
PL 118	miel	Argentina, Los Toldos, Bs. As.	1999	a
PL 119	miel	Argentina, Saavedra, Bs. As.	1999	a
PL 120	miel	Argentina, Laprida, Bs. As.	1999	a
PL 121	miel	Argentina, Laprida, Bs. As.	1999	a
PL 122	miel	Argentina, Laprida, Bs. As.	1999	a
PL 123	miel	Argentina, Laprida, Bs. As.	1999	a
PL 124	miel	Argentina, Laprida, Bs. As.	1999	a
PL 125	miel	Argentina, Magdalena, Bs. As.	1999	a
PL 126	miel	Argentina, Laprida, Bs. As.	1999	a
PL 127	miel	Argentina, Laprida, Bs. As.	1999	a
PL 128	miel	Argentina, Laprida, Bs. As.	1999	a
PL 129	miel	Argentina, Laprida, Bs. As.	1999	a
PL 130	miel	Argentina, Laprida, Bs. As.	1999	a

PL 131	miel	Argentina, Ranchos, Bs. As.	1999	a
PL 132	restos larvales	Argentina, Río Negro	1999	a
PL 133	miel	Argentina, Tandil, Bs. As.	1999	a
PL 134	miel	Argentina, Tandil, Bs. As.	1999	a
PL 135	miel	Argentina, Tandil, Bs. As.	1999	a
PL 136	miel	Argentina, Tandil, Bs. As.	1999	a
PL 137	miel	Argentina, Tandil, Bs. As.	1999	a
PL 138	miel	Argentina, Tandil, Bs. As.	1999	a
PL 139	miel	Argentina, Tandil, Bs. As.	1999	a
PL 140	miel	Argentina, Magdalena, Bs. As.	1999	a
PL 141	miel	Argentina, Tapalqué, Bs. As.	1999	a
PL 142	miel	Argentina, Chaco	1999	a
PL 143	miel	Argentina, Guaminí, Bs. As.	1999	a
PL 144	miel	Argentina, Tapalqué, Bs. As.	1999	a
PL 145	miel	Argentina, 25 de Mayo, Bs. As.	1999	a
PL 146	miel	Argentina, La Plata, Bs. As.	1999	a
PL 147	miel	Argentina, Magdalena, Bs. As.	1999	a
PL 148	miel	Argentina, La Plata, Bs. As.	1999	a
PL 149	miel	Argentina, Magdalena, Bs. As.	1999	a
PL 150	miel	Argentina, Saavedra, Bs. As.	1999	a
PL 151	miel	Argentina, Córdoba, Marcos Juárez	1999	a
PL 152	miel	Argentina, C. de Patagones, Bs. As.	1999	a
PL 153	miel	Argentina, Sta. Teresita, Bs. As.	1999	a
PL 154	miel	Argentina, Bavio, Bs. As.	1999	a
PL 155	miel	Argentina, Bavio, Bs. As.	1999	a
PL 156	miel	Argentina, Prov. Bs. As.	1999	a
PL 157	miel	Argentina, Pehuajó, Bs. As.	1999	a
PL 158	miel	Argentina, 9 de Julio, Bs. As.	1999	a
PL 159	miel	Argentina, Gral. Belgrano, Bs. As.	1999	a
PL 160	miel	Argentina, Las Flores, Bs. As.	1999	a
PL 161	miel	Argentina, Los Toldos, Bs. As.	1999	a
PL 162	miel	Argentina, Los Toldos, Bs. As.	1999	a
PL 163	miel	Argentina, Los Toldos, Bs. As.	1999	a
PL 164	miel	Argentina, Cañuelas, Bs. As.	1999	a
PL 165	miel	Argentina, Lincoln, Bs. As.	1999	a
PL 166	miel	Argentina, Lincoln, Bs. As.	1999	a
PL 167	miel	Argentina, Cañuelas, Bs. As.	1999	a
PL 168	miel	Argentina, Chacabuco, Bs. As.	1999	a
PL 169	miel	Argentina, San Vicente, Bs. As.	1999	a
PL 170	miel	Argentina, Gral. Alvear, Mendoza.	1999	a
PL 171	miel	Argentina, Luján, Bs.As.	1999	a
PL 172	miel	Argentina, San Vicente, Bs. As.	1999	a
PL 173	miel	Argentina, Bragado, Bs. As.	1999	a

PL 174	miel	Argentina, Villegas, Bs. As.	1999	a
PL 175	miel	Argentina, Lamadrid, Bs. As.	1999	a
PL 176	miel	Argentina, Bragado, Bs. As.	1999	a
PL 177	miel	Argentina, Gral. Lavalle, Bs. As.	1999	a
PL 178	miel	Argentina, 25 de Mayo, Bs. As.	1999	a
PL 179	miel	Argentina, San Cayetano, Bs. As.	1999	a
PL 180	miel	Argentina, Salto, Bs. As.	1999	a
PL 181	miel	Argentina, P. Perón, Bs. As.	1999	a
PL 182	miel	Argentina, Saladillo, Bs. As.	1999	a
PL 183	miel	Argentina, Villarino, Bs. As.	1999	a
PL 184	miel	Argentina, San Francisco, Bs. As.	1999	a
PL 185	miel	Argentina, San Francisco, Bs. As.	1999	a
PL 186	miel	Argentina, Mercedes, Bs. As.	1999	a
PL 187	miel	Argentina, Olavarría, Bs. As.	1999	a
PL 188	miel	Argentina, Las Flores, Bs. As.	1999	a
PL 189	miel	Argentina, Verónica, Bs. As.	1999	a
PL 190	miel	Argentina, Verónica, Bs. As.	1999	a
PL 191	miel	Argentina, La Plata, Bs. As.	1999	a
PL 192	miel	Argentina, La Plata, Bs. As.	1999	a
PL 193	miel	Argentina, Gran Bs. As.	1999	a
PL 194	miel	Argentina, Payró, Bs. As.	1999	a
PL 195	miel	Argentina, Chascomús, Bs. As.	1999	a
PL 196	miel	Argentina, La Plata, Bs. As.	1999	a
PL 197	miel	Argentina, Verónica, Bs. As.	1999	a
PL 198	miel	Argentina, Verónica, Bs. As.	1999	a
PL 199	miel	Argentina, Ayacucho, Bs. As.	1999	a
PL 200	miel	Argentina, Loma Verde, Bs. As.	1999	a
PL 201	miel	Italia	1999	a
PL 202	miel	Italia	1999	a
PL 203	miel	Italia	1999	a
PL 204	miel	Argentina, Gral. Pinto	1999	a
PL 205	miel	Argentina, Gral. Pinto, Bs. As.	1999	a
PL 206	miel	Argentina, Gral. Pinto, Bs. As.	1999	a
PL 207	miel	Argentina, Gral. Pinto, Bs. As.	1999	a
PL 208	miel	Argentina, Huanguelén, Bs. As.	1999	a
PL 209	miel	Argentina, Gral. Pinto, Bs. As.	1999	a
PL 210	miel	Argentina, Huanguelén, Bs. As.	1999	a
PL 211	miel	Argentina, La Plata, Bs. As.	1999	a
PL 212	miel	Canadá, Toronto	1999	a
PL 213	miel	Canadá, Toronto	1999	a
PL 214	miel	Canadá, Toronto	1999	a
PL 215	miel	Argentina, Delta, bs. As.	1999	a
PL 216	miel	Argentina, Ranchos, Bs. As.	1999	a

PL 217	miel	Argentina, Etcheverry, Bs. As.	1999	a
PL 218	miel	Argentina, G. Madariaga, Bs. As.	1999	a
PL 219	miel	Argentina, C. Suarez, Bs. As.	1999	a
PL 220	miel	Argentina, C. Suarez, Bs. As.	1999	a
PL 221	miel	Argentina, América , Bs. As.	1999	a
PL 222	miel	Argentina, Chivilcoy, Bs. As.	1999	a
PL 223	miel	Argentina, Bragado, Bs. As.	1999	a
PL 224	miel	Argentina, Bragado, Bs. As.	1999	a
PL 225	miel	Argentina, Urdampilleta, Bs. As.	1999	a
PL 226	miel	Argentina, Urdampilleta, Bs. As.	1999	a
PL 227	miel	Argentina, Urdampilleta, Bs. As.	1999	a
PL 228	miel	Francia	1999	a
PL 229	miel	Francia	1999	a
PL 230	miel	Francia	1999	a
PL 231	miel	Francia	1999	a
PL 232	miel	Francia	1999	a
PL 233	miel	Argentina, Brandsen, Bs. As.	1999	a
PL 234	miel	Argentina, Brandsen, Bs. As.	1999	a
PL 235	miel	Argentina, 25 de Mayo, Bs. As.	2000	a
PL 236	miel	Argentina, 25 de Mayo, Bs. As.	2000	a
PL 237	miel	Argentina, 25 de Mayo, Bs. As.	2000	a
PL 238	miel	Argentina, 25 de Mayo, Bs. As.	2000	a
PL 239	miel	Argentina, 25 de Mayo, Bs. As.	2000	a
PL 240	miel	Argentina, Trenque Lauquen, Bs. As.	2000	a
PL 241	miel	Argentina, Trenque Lauquen, Bs. As.	2000	a
PL 242	miel	Argentina, Trenque Lauquen, Bs. As.	2000	a
PL 243	miel	Argentina, Trenque Lauquen, Bs. As.	2000	a
PL 244	miel	Argentina, Trenque Lauquen, Bs. As.	2000	a
PL 245	miel	Argentina, Trenque Lauquen, Bs. As.	2000	a
PL 246	miel	Argentina, Trenque Lauquen, Bs. As.	2000	a
PL 247	miel	Argentina, Roque Perez, Bs. As.	2000	a
PL 248	miel	Argentina, Los Toldos, Bs. As.	2000	a
PL 249	miel	Argentina, Castelli, Bs. As.	2000	a
PL 250	miel	Argentina, Brandsen, Bs. As.	2000	a
PL 251	miel	Argentina, Brandsen, Bs. As.	2000	a
PL 252	miel	España	2001	k
PL 253	miel	España	2001	k
PL 254	miel	España	2001	k
PL 255	miel	España	2001	k
PL 256	miel	España	2001	k
PL 257	miel	Argentina, Tapalqué, Bs. As.	2000	a
PL 258	miel	Argentina, Tapalqué, Bs. As.	2000	a
PL 259	miel	Argentina, Tapalqué, Bs. As.	2000	a

PL 260	miel	Argentina, Carlos Casares, Bs. As.	2001	a
PL 261	miel	Argentina, Carlos Casares, Bs. As.	2001	a
PL 262	miel	Argentina, 9 de Julio, Bs. As.	2001	a
PL 263	miel	Argentina, 9 de Julio, Bs. As.	2001	a
PL 264	miel	Argentina, 9 de Julio, Bs. As.	2001	a
PL 265	miel	Argentina, C. Casares, Bs. As.	2001	a
PL 266	miel	Argentina, C. Casares, Bs. As.	2001	a
PL 267	miel	Argentina, 9 de Julio, Bs. As.	2001	a
PL 268	miel	Argentina, C. Casares, Bs. As.	2001	a
PL 269	miel	Argentina, C. Casares, Bs. As.	2001	a
PL 270	miel	Argentina, C. Casares, Bs. As.	2001	a
PL 271	miel	Argentina, 9 de Julio, Bs. As.	2001	a
PL 272	miel	Argentina, Glew, Bs. As.	2001	a
PL 273	miel	Argentina, Lanús, Bs. As.	2001	a
PL 274	miel	Argentina, Cnel. Vidal, Bs. As.	2001	a
PL 275	miel	Argentina, Miramar, Alvarado, Bs. As.	2001	a
PL 276	miel	Argentina, Balcarce, Bs. As.	2001	a
PL 277	miel	Argentina, Zárate, Bs. As.	2001	a
PL 278	miel	Argentina, Punta Indio, Bs. As.	2001	a
PL 279	miel	Argentina, Chascomús, Bs. As.	2001	a
PL 280	miel	Argentina, Chascomús, Bs. As.	2001	a
PL 281	miel	Argentina, Chascomús, Bs. As.	2001	a
PL 282	miel	Argentina, Chascomús, Bs. As.	2001	a
PL 283	miel	Argentina, La Plata, Bs. As.	2001	a
PL 284 (NP2)	restos larvales	Uruguay , N. Palmira	2005	l
PL 285 (A8)	restos larvales	Uruguay, Paysandú	2005	l
PL 286 (A4)	restos larvales	Uruguay, Paysandú	2005	l
PL 287 (NP 1)	restos larvales	Uruguay, N. Palmira	2005	l
PL 288	miel	Francia	2001	a
PL 289	cultivo	Japón, P 41	ND	m
PL 290	cultivo	Japón, P 55	ND	m
PL 291 (G11)	restos larvales	Uruguay ,Paysandú	2005	l
PL 292 (A7)	restos larvales	Uruguay, Paysandú	2005	l
PL 293 (NP3)	abejas	Uruguay, Nueva Palmira	2005	l
PL 294 (M3)	restos larvales	Uruguay	2005	l
PL 295	miel	EE.UU.	2001	k
PL 296	miel	EE.UU.	2001	k
PL 297	miel	Argentina, Quilmes, Bs. As.	2001	a
PL 298	miel	Argentina, Ptunta de Indio, Bs. As.	2001	a
PL 299	miel	Argentina, Tres Arroyos, Bs. As.	2001	a
PL 300	miel	Argentina, 25 de Mayo, Bs. As.	2001	a
PL 301	cultivo	Argentina, SAG	2001	k
PL 302	cultivo	Argentina, SAG	2001	k

PL 303	restos larvales	Argentina, La Plata, Bs. As.	2001	a
PL 304	cultivo	Belgica, West Flanders	ND	n
PL 305	cultivo	Belgica, Brabant	ND	n
PL 306	miel	Argentina, Mercedes, Bs. As.	2001	a
PL 307	miel	Argentina, Mercedes, Bs. As.	2001	a
PL 308	miel	Argentina, Cnel. Pringles, Bs. As.	2001	a
PL 309	miel	Argentina, Mercedes, Bs. As.	2001	a
PL 310	miel	Argentina, Los Hornos, Bs. As.	2001	a
PL 311	miel	Argentina, Balcarce, Bs. As.	2001	a
PL 312	miel	Argentina, Balcarce, Bs. As.	2001	a
PL 313	miel	Argentina, Roque Perez, Bs. As.	2001	a
PL 314	miel	Argentina, Roque Perez, Bs. As.	2001	a
PL 315	miel	Argentina, Roque Perez, Bs. As.	2001	a
PL 316	miel	Argentina, Mar Chiquita, Bs. As.	2001	a
PL 317	miel	Argentina, G.eneral Alvear, Bs. As.	2001	a
PL 318	cultivo	Chile, SAG	2001	k
PL 319	cultivo	Chile, SAG	2001	k
PL 320	miel	Argentina, Tres Arroyos, Bs. As.	2001	a
PL 321	miel	Argentina, Luján, Bs. As.	2001	a
PL 322	miel	Argentina, Tres Arroyos, Bs. As.	2001	a
PL 323	miel	Argentina, Delta, Bs. As.	2001	a
PL 324	miel	Argentina, Exaltación de la Cruz, Bs.As.	2001	a
PL 325	miel	Argentina, Rauch, Bs. As.	2001	a
PL 326	miel	Argentina, Chivilcoy, Bs. As.	2001	a
PL327	miel	Argentina, La Plata, Bs. As.	2001	a
PL328	miel	Argentina, Roque Perez; Bs. As.	2001	a
PL329	miel	Argentina, Las Flores, Bs. As.	2001	a
PL330	miel	Argentina, Las Flores, Bs. As.	2001	a
PL331	miel	Argentina, La Plata, Bs. As.	2001	a
PL332	miel	Argentina, La Plata, Bs. As.	2001	a
PL333	miel	Argentina, Magdalena, Bs. As.	2001	a
PL334	miel	Argentina, Villarino, Bs. As.	2001	a
PL 335	miel	Argentina, Magdalena, Bs. As.	2001	a
PL 337	restos larvales	Argentina, Río Colorado, R.Negro.	2001	a
PL 338	miel	Argentina, Ranchos	2001	a
PL 339	miel	Chile	2006	k
PL 340	miel	Argentina, Gorina, Bs. As.	2001	a
PL 341	miel	Argentina, Pergamino, Bs. As.	2001	a
PL 342	miel	Argentina, Pigué, Bs. As.	2001	a
PL 343	miel	Argentina, Pigué, Bs. As.	2001	a
PL 344	miel	Argentina, Pigué, Bs. As.	2001	a
PL 345	miel	Argentina, 9 de julio, Bs As.	2001	a
PL 346	miel	Argentina, Pigué, Bs. As.	2001	a

PL 347	miel	Argentina, Bragado, Bs. As.	2001	a
PL 348	miel	Argentina, Gorina, Bs. As.	2001	a
PL 349	miel	Argentina, San Pedro, Bs. As.	2001	a
PL 350	miel	Argentina, Brandsen, Bs. As.	2001	a
PL351	miel	Argentina, Henderson, Bs. As.	2001	a
PL352	miel	Argentina, 25 de Mayo, Bs. As.	2001	a
PL 353	miel	Argentina, Quilmes, Bs. As.	2001	a
PL 354	miel	Argentina, La Plata, Bs. As.	2001	a
PL 355	miel	Argentina, La Plata, Bs. As.	2001	a
PL 356	miel	Argentina, S.M. del Monte, Bs. As.	2001	a
PL 357	miel	Argentina, Chascomús, Bs. As.	2001	a
PL 358	miel	Argentina, San Miguel del Monte, Bs. As.	2001	a
PL 359	miel	Argentina, Berisso, Bs. As.	2001	a
PL 360	miel	Argentina, Berisso, Bs. As.	2001	a
PL 361	miel	Argentina, Berisso, Bs. As.	2001	a
PL 362	miel	Argentina, Berisso, Bs. As.	2001	a
PL 363	miel	Argentina, Bolívar, Bs. As.	2001	a
PL 364	miel	Argentina, Ranchos, Bs. As.	2001	a
PL 365	miel	Argentina, Salta	2001	a
PL 366	miel	Argentina, La Plata, Bs. As.	2001	a
PL 367	miel	Argentina, G. Pueyrredón, Bs. As.	2001	a
PL 368	miel	Brasil, Buzios	2001	a
PL 369	miel	Argentina, G. Pueyrredón, Bs. As.	2001	a
PL 370	miel	Argentina, La Plata, Bs. As.	2001	a
PL 371	miel	Argentina, G. Pueyrredón, Bs. As.	2001	a
PL 372	miel	Argentina, Berisso, Bs. As.	2001	a
PL 373	miel	EE.UU., Boston	2005	a
PL374	miel	EE.UU., Boston	2005	a
PL 375	miel	Argentina, General Conesa, Río Negro	2005	a
PL 376	miel	Argentina, Lincoln, Bs. As.	2005	a
PL 377	miel	Argentina, Las Flores, Bs. As.	2005	a
PL 378	restos larvales	Argentina, Haedo, Bs. As.	2006	a
PL 379	restos larvales	Argentina, Haedo, Bs. As.	2006	a
PL 380	miel	Argentina, Brandsen, Bs. As.	2006	a
PL 381	miel	Argentina, Castelli, Bs. As.	2006	a
PL 382	restos larvales	Argentina, La Plata, Bs. As.	2006	a
PL 383	miel comercial	Argentina, Prov. Bs. As.	2006	a
PL 384	miel comercial	Argentina, Prov. Bs. As.	2006	a
PL 385	restos larvales	Argentina, Córdoba.	2007	a
PL 386	miel	Argentina, General Belgrano, Bs. As.	2007	a
PL 387	miel comercial	Argentina	2007	a
PL 388	miel	Panamá	2007	a
PL 389	miel	EE.UU., Miami	2008	a

PL 390	miel	EE.UU., Miami	2008	a
PL 391	miel	EE.UU., Miami	2008	a
PL 392	miel	EE.UU., Miami	2008	a
PL 393	miel	EE.UU., Miami	2008	a
PL 394	miel	EE.UU. Miami	2008	a
PL 395	miel	EE.UU. Miami	2008	a
PL 396	miel	Argentina, Bolívar, Bs. As.	2008	a
PL 397	miel	Argentina, Córdoba	2008	a
PL 398	miel	Argentina, 25 de Mayo, Bs. As.	2008	a
PL 399	miel	Italia	2008	a
PL 400	miel	Italia	2008	a
PL 401	miel	Italia	2008	a
PL 402	miel	Italia	2008	a
PL 403	miel	EE.UU.	2009	a
PL 404	miel	EE.UU.	2009	a
PL 405	miel	EE.UU.	2009	a
PL 406	miel	EE.UU.	2009	a
PL 407	miel	EE.UU.	2009	a
PL 408	miel	EE.UU.	2009	a
PL 409	miel comercial	Argentina	2009	a
PL 410	miel comercial	Argentina	2009	a
PL 411	miel comercial	Argentina	2009	a
PL 412	miel comercial	Argentina	2009	a
PL 413	miel comercial	Argentina	2009	a
PL 414	miel	Italia, Trento	2010	a
PL 415	miel	Italia, Trento	2010	a
PL 416	miel	Italia, Novaledo	2010	a
PL 417	miel	Italia, Novaledo	2010	a
PL 418	miel comercial	Italia	2010	a
PL 419	miel comercial	Italia	2010	a
PL 420	miel comercial	Italia	2010	a
PL421	miel comercial	Italia	2010	a
PL 422	miel comercial	Italia	2010	a
PL 423	miel comercial	Italia	2010	a
PL 424	miel comercial	Italia	2010	a
PL 425	miel	Sudafrica, Pretoria	2010	ñ
PL 426	restos larvales	Sudafrica, Pretoria	2010	ñ
PL 427	restos larvales	Sudafrica, Pretoria	2010	ñ
PL 428	abejas	Sudafrica, Pretoria	2010	ñ
PL 429	restos larvales	Sudafrica, Pretoria	2010	ñ
PL 430	miel	Sudafrica, Pretoria	2010	ñ
PL 431	restos larvales	Sudafrica, Pretoria	2010	ñ
PL 432	restos larvales	Sudafrica, Pretoria	2010	ñ

PL 433	abejas	Sudafrica, Pretoria	2010	ñ
PL 434	restos larvales	Sudafrica, Pretoria	2010	ñ
PL 435	restos larvales	Sudafrica, Pretoria	2010	ñ
PL 436	pelechos	Sudafrica, Pretoria	2010	ñ
PL 437	pelechos	Sudafrica, Pretoria	2010	ñ
PL 438	miel comercial	Francia, Gan	2010	a
PL 439	miel	Argentina, Gral. Belgrano, Bs. As.	2010	a

Nombre del Investigador o Colección:

- a) *A.M. Alippi, (CIDEFI) Centro de Investigaciones de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, La Plata, Argentina para esta Tesis.*
- b) *CCT, Coleção de Culturas Tropical, Fundação André Tosello, Campinas, SP, Brasil.*
- c) *M. R. Goodwin, Apicultural Research Unit, Ruakura Research Center, Hamilton, Nueva Zelandia.*
- d) *E. Carpana, Istituto Nazionale de Apicoltura, Bologna, Italia;*
- e) *M. Colin, Station de Phytopharmacie, INRA Avignon, Francia.*
- f) *I. Fries., Bee Division, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suecia.*
- g) *M. Jelinski, Instytut Weterynarii, Swarzedz, Polonia.*
- h) *M. Gilliam, Carl Hayden Honey Bee Reseach Center, USDA-ARS, Tucson, Arizona EE.UU.*
- i) *U. Rdest, Biozentrum der Universität Würzburg, Lehrstuhl Mikrobiologie, Alemania.*
- j) *B. Dancer, School of Pure and Applied Biology, University of Wales, Cardiff.*
- k) *P. Avalos, Laboratorio y Estación Cuarentenaria Lo Aguirre, SAG, Chile.*
- l) *C. Piccini, Lab. Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay.*
- m) *A. Kataoka, Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology, Kanawaga, Japón.*
- n) *W. Dobbelaere, Veterinary and Agrochemical Research Centre, Brussels, Bélgica.*
- ñ) *T. Goszczynska, ARC-Plant Protection Research Institute, Queenswood, Pretoria, South Africa.*

Género y especie	Cepa	Origen	Localidad
<i>Bacillus licheniformis</i> n=2	m39b, m347	miel	Prov. Bs. As., Argentina
<i>Bacillus mycoides</i> n=8	m55, mv59, m282, m336, m357, m420, m425 m440b	miel miel	Prov. Bs. As., Argentina Entre Ríos, Argentina
<i>Bacillus pumilus</i>	m350	miel	Prov. Bs. As., Argentina
<i>Bacillus subtilis</i> n=6	m116,m329, m351 DC, DrRo, DrB	miel filoplano	Prov. Bs. As, Argentina Argentina
<i>Bacillus thuringiensis</i> n= 5	m59, m282, m391 m5, m441	miel miel	Prov. Bs. As., Argentina Sta. Fe, Argentina
<i>Brevibacillus laterosporus</i> n= 5	BLA 168, BLA 169, BLA 170, BLA171 m460a	larvas miel	Argentina Prov. Bs. As., Argentina
<i>Paenibacillus alvei</i> n=65	cm13, cm17, m44, mv50, mv51, mv52, mv53a, mv53b, mv56, mv60, mv71, mv74, mv81, mv82, mv83, mv84, mv85, mv87, mv94,m154, m163, mv121, cm202, m225, m291, m293, m303, m311, m314, m319,m321, m323, m324, m331, m343, m344, m347, m348, m 349, m351,m355, m356, m361, m368, m369, m372, m377, m361, m379, m386, m402, m415, m418, m421a,m437a, m443a, m445a mSaltaA, m437a Tornq, PM2, BA159, LP1 Mdza mv48	miel larvas larvas larvas miel	Prov. Bs. As., Argentina Salta, Argentina Prov. Bs. As., Argentina Mendoza Argentina, La Rioja, Argentina
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	mv46	miel	Prov. Bs. As., Argentina
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> n=5	MdelPlata mv111, mv119, m282, m338	larvas miel	Prov. Bs. As., Argentina Prov. Bs. As., Argentina

Apéndice III

Cepas de *Paenibacillus larvae* provenientes de Colecciones Internacionales

Género y especie	Denominación de la cepa	Colección	Origen	Medio de cultivo	Temperatura
<i>Paenibacillus larvae</i> n = 21	ATCC 9545 (PL101) Cultivo Tipo	ATCC	EE.UU.	MYPGP	37 °C
	ATCC 25747 (PL104)	ATCC	EE.UU.		
	ATCC 25748 (PL336)	ATCC	EE.UU.		
	CCM 4483 (PL74)	CCM	R. Checa		
	CCM 4484 (PL 75)	CCM	R. Checa		
	CCM 4485 (PL 76)	CCM	R. Checa		
	CCM 4486 (PL 77)	CCM	R. Checa		
	NRRL B-3555 (PL103)	NRRL	EE. UU.		
	CCT 491 (PL17)	CCT	Desconocido		
	SAG 8977	SAG	Desconocido		
	SAG 5476	SAG	Desconocido		
	SAG 9648	SAG	Desconocido		
	SAG 10823	SAG	Desconocido		
	SAG 11231	SAG	Desconocido		
	SAG 8671	SAG	Desconocido		
SAG 10991	SAG	Desconocido			
	SAG m289	SAG	Desconocido		
	SAG m290	SAG	Desconocido		
	SAG 10230	SAG	Desconocido		
	SAG 10754	SAG	Desconocido		
	SAG 10367	SAG	Desconocido		
<i>Paenibacillus larvae</i> (<i>ex. pulvificiens</i>) n= 5	ATCC 13537 (Syn= NRRL B-3688 = NRRL B- 3670 = NRRL B-3685)	ATCC	EE.UU.	MYPGP / TS	37 °C
	ATCC 25367	ATCC	Desconocido		
	ATCC 25368	ATCC	Desconocido		
	CCM 38	CCM	Canadá		
	NRRL B-14154	NRRL	Francia		

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE.UU.; **CCM:** Czech Collection of Microorganisms, Brno, República Checa; **CCT:** Coleção de Culturas Tropical, Fundação André Tosello, Campinas, SP, BRASIL; **NRRL:** Northern Utilization Research and Development Division, Peoria, Illinois, EE.UU.; **SAG:** Servicio Agrícola Ganadero, Chile.

Apéndice IV

Cepas de referencia de otros géneros y especies bacterianas provenientes de Colecciones Internacionales o cedidas por otros investigadores.

Género y especie	Designación	Colección u Origen*	Medio de cultivo	Temperatura de incubación
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	ATCC	TSA	32 ° C
<i>Bacillus circulans</i>	ATCC 4515	ATCC	MYPGP	37 ° C
<i>Bacillus coagulans</i>	ATCC 35670	ATCC	TSA	37 ° C
<i>Bacillus firmus</i>	ATCC 8247	ATCC	TSA	30 ° C
<i>Bacillus licheniformis</i>	NRRL B-1001	NRRL	TSA	30 ° C
<i>Bacillus megaterium</i>	NRRL B-939	NRRL	TSA	32 ° C
<i>Bacillus mycoides</i>	ATCC 10206	ATCC	TSA	30 ° C
<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 7061	ATCC	TSA	30 ° C
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 10783 GSY 1104	ATCC IBBM ***	TSA TSA	30 ° C 30 ° C
<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 10792	ATCC	TSA	32 ° C
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	CCT 31 BEL	CCT Bélgica *	TSA	37 ° C
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	ATCC	TSA / LB	37 ° C
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	ATCC 245	ATCC	TSA	30 ° C
<i>Paenibacillus alginolyticus</i>	NRRL NRS-1347	NRRL	TSA	30 ° C
<i>Paenibacillus alvei</i>	NRRL B-383	NRRL	TSA	32 ° C
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	NRRL B-14940	NRRL	TSA	37 ° C
<i>Paenibacillus apiarius</i>	ATCC 29575	ATCC	MYPGP	37 ° C
<i>Paenibacillus azotofixans</i>	NRRL B-14372	NRRL	TSA	30 ° C
<i>Paenibacillus azotoformans</i>	CCT-195	CCT	TSA	30 ° C
<i>Paenibacillus borealis</i>	KK 19	Finlandia **	TSA	28 ° C
<i>Paenibacillus chondroitinus</i>	NRRL NRS-1351	NRRL	TSA	30 ° C
<i>Paenibacillus curdlanolyticus</i>	NRRL B-23243	NRRL	TSA	30 ° C
<i>Paenibacillus dendritiformis</i>	NRRL B-23299	NRRL	LB	30 ° C
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	NRRL B-14679	NRRL	MYPGP	30 ° C
<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	NRRL NRS-1356	NRRL	TSA	37 ° C
<i>Paenibacillus kobensis</i>	NRRL B-23246	NRRL	TSA	30 ° C
<i>Paenibacillus lautus</i>	NRRL NRS-666	NRRL	TSA	30 ° C

Género y especie	Designación	Colección u Origen*	Medio de cultivo	Temperatura de incubación
<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	NRRL B-2522	NRRL	MYPGP	30 ° C
<i>Paenibacillus macerans</i>	ATCC 8244	ATCC	TSA	30 ° C
<i>Paenibacillus macquariensis</i>	NRRL B-14306	NRRL	LB	22 ° C
<i>Paenibacillus pabuli</i>	NRRL NRS-924	NRRL	TSA	30 ° C
<i>Paenibacillus peoriae</i>	NRRL B-14750	NRRL	TSA	30 ° C
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	NRRL B-510	NRRL	MYPGP	30 ° C
<i>Paenibacillus popilliae</i>	ATCC 14706	ATCC	MYPGP	30 ° C
<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	ATCC 11377	ATCC	TSA	30 ° C
<i>Paenibacillus validus</i>	NRRL NRS-1000	NRRL	TSA	30 ° C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	ATCC	TSA / LB	28 ° C
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	ATCC	LB	28 ° C
<i>Virgibacillus panthotenticus</i>	ATCC 14576	ATCC	TSA	30 ° C

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, EE.UU.; **CCM:** Czech Collection of Microorganisms, Brno, República Checa; **CCT:** Coleção de Culturas Tropical, Fundação André Tosello, Campinas, SP, BRASIL; **NRRL:** Northern Utilization Research and Development Division, Peoria, Illinois, EE.UU.; **SAG:** Servicio Agrícola Ganadero, Chile. * S. Elo, Department of Biosciences, Division of General Microbiology, University of Helsinki, Finlandia; **W. Dobbelaere, Veterinary and Agrochemical Research Centre, Brussels, Bélgica; *** O. M. Aguilar, IBBM, Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, Argentina.

Apéndice V

Alineamientos de las secuencias completas de los plásmidos pPL374 de *Paenibacillus larvae* (esta Tesis), pPL373 de *Paenibacillus larvae* (esta Tesis), pMA67 de *Paenibacillus larvae* (Murray *et al.*, 2006), pPL373 de *Paenibacillus larvae* (esta Tesis), pBHS24 aislado de una cepa de *Bacillus* spp. asociada con la esponja marina *Haliclona simulans* (Phelan *et al.*, 2011), pBSDMV46A aislado de *Barghavaea cecembensis* (You *et al.*, 2012), pDMV2 aislado de *Bacillus galactosidilyticus* (You *et al.*, 2012) y pSU1 aislado de *Sporosarcina ureae*, todos ellos conteniendo el gen de resistencia a tetraciclina *tetA* localizado entre las bases 1.603 y 2985.

