

Optimización de 3 PCR para la Detección de Virus en Abejas

Optimization of 3 PCR for Honeybee Virus Detection

Alejandro del Pozo López, Sandra Barroso Arévalo y José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez

Tutores:

José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez y Sandra Barroso Arévalo

Universidad Complutense de Madrid

Resumen

Las abejas cumplen una importante labor mediante la conservación de los ecosistemas, siendo los principales insectos polinizadores tanto a nivel silvestre como empleado por el hombre. Recientemente se ha detectado una disminución de la población en las colmenas, fenómeno que ha sido denominado como síndrome de despoblamiento de colmenas (SDC). Entre los factores implicados en este síndrome de carácter multifactorial se encuentran los agentes patógenos, entre los cuales destacan los virus. Se han descrito hasta 24 virus que afectan a las abejas, siendo algunos de los más frecuentes el virus de la realera negra (BQCV), el virus de la parálisis aguda israelí (IAPV) y el virus de la cría sacciforme (SBV). Para la detección de estos agentes se utiliza la técnica PCR por su alta especificidad y elevada sensibilidad. Sin embargo, una mala optimización de la técnica o variaciones en la secuencia de material genético diana pueden dar lugar a resultados erróneos (falsos negativos). En el presente trabajo, se han optimizado tres RTq-PCR con el kit comercial SuperScript®III Platinum® SYBR® Green one-step qRT-PCR. Para ello, se han variado distintos parámetros (temperatura de anillamiento, concentración de cebadores). Nuestros resultados han mostrado una mejora de la técnica, aumentando la especificidad y sensibilidad de la misma.

Palabras clave: abejas, diagnóstico, PCR, virus.

Abstract

Honeybees play an important role in the conservation of the ecosystem, being the main specie responsible for pollination in both wild and agricultural settings. Losses have occurred in colonies around the world. This phenomenon has been named collapse colony disorder (CCD). Many factors are involved in this disorder, amongst which pathogens are one of the most important, with viruses playing a key role. So far, 24 different viruses that affect honeybees have been described. Some of the most frequent viruses are Black Queen Cell Virus (BQCV), Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV) and Sacbrood Bee Virus (SBV). PCR is used for the detection of these pathogens, due to its high specificity and sensibility. Nevertheless, poor development of the technique as well as changes in the target sequence can lead to wrong results (false negatives). In this work, three RTq-PCR have been developed with the new commercial kit SuperScript®III Platinum® SYBR® Green one-step qRT-PCR. Different parameters have been adjusted. Our results have demonstrated an improvement of the technique, increasing the specificity and the sensibility of the technique.

Keywords: honey bees, diagnosis, PCR, virus.

Introducción

La polinización es esencial para el mantenimiento de los ecosistemas, así como para la agricultura y explotaciones ganaderas. Las abejas son la especie más importante en la polinización por su eficiencia a la hora de transportar y almacenar polen, además de producir miel.

Recientemente, se ha producido un descenso en la población de las colmenas, fenómeno que se ha denominado SDC. Este hecho puede estar producido por diversos factores (Asensio, Vicente-Rubiano, Muñoz, Fernández-Carrión, Sánchez-Vizcaíno y Carballo, 2016) como: hábitat, condiciones ambientales, manejo de las colmenas y agentes patógenos entre los que encontramos virus y parásitos. Este trabajo se centrará en la detección de 3 virus que destacan por su alta prevalencia: BQCV, IAPV y SBV. Estos virus son ARN de cadena sencilla con polaridad positiva. Para su detección se han utilizado técnicas moleculares basadas en PCR. Se opta por esta técnica en lugar de otras como ELISA o IFI debido a que las abejas no generan anticuerpos. La PCR presenta una alta especificidad y sensibilidad, basándose en la amplificación del material genético de los agentes que se pretenden diagnosticar (Kukielka, y Sánchez-Vizcaíno, 2009). Actualmente se puede realizar la técnica tanto con ADN como ARN mediante el empleo de una RT-PCR, permitiendo así la detección de virus ARN. Diferenciamos dos tipos de PCR: PCR convencional y PCR a tiempo real (qPCR). En el caso de la PCR convencional, tras la amplificación del material genético, los resultados se visualizan mediante un gel de agarosa, desplazándose las cadenas en función de su peso molecular por electroforesis. Por otro lado, en la qPCR, no es necesario este paso, sino que a partir de un software informático se permite la visualización de los resultados tras la amplificación de la muestra. Otra ventaja de la qPCR con respecto a la PCR convencional es que permite cuantificar la cantidad de copias de material genético presentes en la muestra realizando cuantificación absoluta. Pese a las ventajas de este método, existen inconvenientes como la obtención de falsos negativos (muestras positivas que no se detectan) como consecuencia de diferentes factores: mala optimización del protocolo utilizado o un mal diseño de los cebadores, lo que también puede dar lugar a falsos positivos (muestras que se detectan como positivas, pero son negativas). Igualmente, se pueden obtener resultados confusos como consecuencia de errores durante la realización de la técnica, contaminación de las muestras o de los productos utilizados, así como una incorrecta conservación de la enzima y reactivos.

En la optimización de una PCR se debe conocer las fases que se producen en el termociclador: la primera es la desnaturalización, en la que se produce la separación de las hebras de material genético; la segunda es el anillamiento, donde los cebadores se unen a las regiones complementarias; la siguiente es la de alargamiento, en la que se produce la réplica

del material genético; y, por último, se produce la repetición del ciclo. La temperatura de anillamiento tiene una destacada importancia en la optimización de PCR porque se ha demostrado que un aumento de la misma produce un aumento de la especificidad, aunque podría disminuir la sensibilidad de la técnica.

Material y métodos

Se han utilizado tres RTq-PCR para la detección de los virus BQCV, IAPV y SBV. El kit comercial utilizado ha sido el SuperScript® III Platinum® SYBR® Green one-step qRT-PCR. Al tratarse de un mix con el que no se habían detectado estos virus previamente, ha sido necesaria la optimización de las PCR. Para ello, se han seleccionado tres muestras de cada virus que representan tres cargas conocidas: carga baja, carga media y carga alta como se muestra en la tabla (Tabla 1).

Tabla 1
Cargas virales de las muestras expresadas en copias de genoma equivalente (CGE)/

BQCV	IAPV	SBV
1,75 * 10 ²	2,95 * 10 ¹	4,77 * 10 ¹
1,606 * 10 ⁵	1,57 * 10 ³	6,55 * 10 ³
3,12 * 10 ⁸	1,99 * 10 ¹⁰	1,01 * 10 ⁷
μl		

La categorización de carga viral se realizó en función de Esmaeil Amiri, Marina Meixner, Steen Lykke Nielsen y Per Kryger (2015). Para la carga baja, se escogieron muestras con niveles entre 10¹ y 10³ CGE/μl, para la carga media se usan muestras con cargas de entre 10³ y 10⁵ CGE/μl y para la carga alta se utilizan niveles superiores a 10⁷ CGE/μl. Las muestras se obtuvieron a partir de homogeneizados de un pool de 10 abejas. De este homogeneizado se realizó la extracción del ARN utilizando el kit Nucleospin II virus® (Macherey-Nagel), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Optimización de la PCR frente a BQCV

Se realizó una primera PCR con el protocolo estándar de la enzima en el que la temperatura de desnaturalización fue 95°C y la temperatura de alargamiento 40°C, usando 61°C como temperatura de anillamiento. Tras esto, se realizó una nueva PCR en la que se variaron dos parámetros: se utilizaron diferentes concentraciones de cebadores (5μM y 10μM) con el fin de escoger la que obtuviese mejor definición de dímero y se utilizó 59°C como temperatura de anillamiento con el objetivo de aumentar la sensibilidad.

Tabla 2.

Comparativa de los ciclos en los que empieza a emitir fluorescencia necesarios entre el antiguo kit y el nuevo.

	BQCV			IAPV			SBV		
	Carga baja	Carga media	Carga alta	Carga baja	Carga media	Carga alta	Carga baja	Carga media	Carga alta
SYBER KAPA	22	28	38	15	14	7	21	33	27
SYBER PALTINUM	12	21	23	17	12	1	18	23	24

Optimización de la PCR frente a IAPV

Se realizó una PCR con protocolo estándar, usando como temperatura de anillamiento 61°C. En este caso fue necesario ajustar la temperatura de anillamiento para aumentar la especificidad de la PCR. Con el fin de poder determinar la temperatura óptima se realizó un gradiente de temperaturas en el que se probaron las siguientes temperaturas: 61,5°C, 62°C, 62,5°C, 63,1°C, 63,6°C y 64°C.

Optimización de la PCR frente a SBV

Se realizó una primera PCR con el protocolo estándar y una temperatura de anillamiento de 58°C, ya que esta era la temperatura de anillamiento óptima del par de cebadores. El resultado de esta PCR fue correcto, pero se obtuvieron unas curvas de carga media y baja ligeramente desplazadas. Se repitió la PCR, pero usando los cebadores a una concentración de 10µM con el fin de definir mejor el dímero de cebadores.

Resultados y discusión

La PCR para detectar BQCV fue optimizada con una temperatura de anillamiento de 59°C y una concentración de cebadores de 5µM. La curva de control positivo y de dímero se encontraban bien definidas, por lo que no fue necesario aumentar la temperatura de anillamiento a 61°C ni la concentración de cebador a 10µM. Además, se detectó una mejoría en la detección de ARN como se puede apreciar en la siguiente tabla (Tabla 2) ya que se detecta a menos ciclos a los que empieza a emitir fluorescencia, que es cuando se empieza a considerar positiva la muestra, y, por tanto, es más sensible.

La PCR frente a IAPV se optimizó con una temperatura de anillamiento de 61,5°C y una concentración de cebadores de 5µM. También se apreció una mejoría en la detección como podemos comprobar en la siguiente tabla (Tabla 2).

La PCR frente a SBV fue optimizada con una temperatura de anillamiento de 58°C y una concentración de cebador de 5µM. En este caso también se aprecia una mejoría en la detección de ARN (Tabla 2).

Conclusiones

El nuevo kit supone una mejora en la detección de virus en las colmenas ya que nos permite detectar cargas menores al necesitar menos ciclos que el kit anterior y por tanto mejora la sensibilidad de la técnica.

Referencias

- Amiri, E., Meixner, M., Nielsen, S. L., & Kryger, P. (2015). Four categories of viral infection describe the health status of honey bee colonies. *PLoS ONE*, *10*(10), e0140272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140272>
- Asensio, I., Vicente-Rubiano, M., Muñoz, M. J., Fernández-Carrión, E., Sánchez-Vizcaíno, J. M., & Carballo, M. (2016). Importance of ecological factors and colony handling for optimizing health status of apiaries in Mediterranean ecosystem. *PLoS ONE*, *11*(10), e0164205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164205>
- Kukielka, D., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2009). One-step real-time quantitative PCR assays for the detection and field study of Sacbrood honeybee and acute bee paralysis viruses. *Journal of Virological Methods*, *161*, 240-246. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.06.014>