

Tesina presentada para obtener el grado de
Licenciada en Ciencias Biológicas

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN
HOSPEDERO – PATÓGENO (*Paenibacillus larvae*)
MEDIANTE TÉCNICAS DE FLUORESCENCIA**



http://www.redicecreations.com/ul_img/826bees2.jpg

**“Si la abeja desapareciera del planeta, al hombre sólo le
quedarían cuatro años de vida”**

Albert Einstein

Br. Daniela Arredondo

Orientador: Dra. Karina Antúnez
Laboratorio de Microbiología
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

1. Agradecimientos:

En primer lugar, me gustaría agradecer a Pablo Zunino por permitirme realizar esta pasantía en su laboratorio y por asignar a Karina Antúnez como mi tutora.

A Karina tengo que agradecerle que en todo momento estuviera presente y dispuesta a enseñarme, guiarme, escucharme y aconsejarme, pero sobre todo porque con paciencia me mostró que la microbiología no es un trabajo, es una pasión.

A toda la colonia por estar siempre ahí para dar una mano, a discutir resultados, a ver una y otra vez las mismas presentaciones, por esos brebajes salvadores y por la buena onda constante.

A mi madre, mis hermanos y a mi cuñada, por apoyarme en todo momento, por soportar mis malos humores, por reír y festejar conmigo cada vez que salvé un examen y por ofrecerme su hombro y darme su aliento cuando no era así.

Al resto de mi familia (postiza incluida) por compartir tantas alegrías y tristezas.

A mis amigos, por estar siempre cuando los necesito, por alegrarme la vida. Especialmente a Cacho, Caro, Ceci, Gabo, Gonza, Lau, Luley, Mauri, Pablo y Pompa gracias chiquilines por estar a mi lado todos estos años.

Y por último pero no menos importante, a la gente que en mi camino por f100 compartió conmigo las rondas de mate, de truco, las horas de estudio, a quienes me prestaron algún material y a los que me ayudaron de alguna forma a llegar hasta acá.

2. Resumen:

La enfermedad de origen bacteriano más severa y destructiva que afecta a la cría de las abejas melíferas (*Apis mellifera*) es la Loque Americana, producida por *Paenibacillus larvae*. En trabajos previos de nuestro laboratorio se observó que la enolasa de *P. larvae* podría ser un importante factor de virulencia implicado en el establecimiento de la infección. Esta proteína además de tener un rol esencial en la glicólisis, es secretada al medio exterior, pudiendo estar involucrada en la degradación de los tejidos larvales. Otro factor de virulencia de *P. larvae* es una metaloproteasa. Se ha comprobado que este microorganismo secreta metaloproteasas durante la infección que podrían estar involucradas en el daño directo de los tejidos o en el clivaje de componentes del sistema inmune. El objetivo de este trabajo fue estudiar el mecanismo de interacción hospedero-patógeno entre las larvas de *A. mellifera* y *P. larvae* evaluando especialmente la producción de dos posibles factores de virulencia por parte de *P. larvae*, la enolasa y la metaloproteasa.

En primer lugar se evaluaron distintos protocolos para obtener esporas de *P. larvae*. El número de células vegetativas y esporas se determinó mediante tinción con DAPI y posterior análisis por microscopía de epifluorescencia. Dicha suspensión se utilizó para poner a punto un modelo de cría e infección de larvas en el laboratorio. Luego de 3 y 6 días de infección se tomaron grupos de larvas infectadas y grupos control, y se sometieron a distintos tratamientos para obtener cortes histológicos. Luego se realizaron ensayos de *Fluorescence in Situ Hybridization (FISH)* e Inmunofluorescencia sobre los cortes obtenidos, con el fin de visualizar a *P. larvae* y las células intestinales de la abeja. Se utilizaron las sondas PL16S, específica para *P. larvae* y la sonda EUK516, para visualizar las células intestinales. Los cortes se visualizaron empleando microscopía confocal.

Las larvas incubadas en el laboratorio alcanzaron un desarrollo normal hasta los 6 días de vida y fue posible reproducir *in vitro* la infección con una suspensión pura de esporas de *P. larvae*. También se observó que tanto la enolasa como la metaloproteasa son producidas activamente por las células vegetativas y forman parte de la cubierta de las esporas. Ambas proteínas son producidas por *P. larvae* tanto en condiciones de cultivo como *in vivo* durante la infección lo que apoyaría la hipótesis de que son potenciales factores de virulencia y que están involucradas en el desarrollo de la enfermedad.

3. Índice:

1. Agradecimientos:	1
2. Resumen:	2
3. Índice:	3
4. Introducción:	5
4.1 Generalidades e importancia de las abejas melíferas	5
4.2 Descripción de la Loque Americana.....	6
4.3 Paenibacillus larvae en la región	9
4.4 Factores de virulencia de P. larvae.....	11
5. Objetivos:	14
5.1 Objetivo general.....	14
5.2 Objetivos específicos	14
6. Materiales y métodos:.....	15
6.1 Obtención de esporas	15
6.1.1 Aislamientos bacterianos y condiciones de cultivo:	15
6.1.2 Obtención de esporas:	15
6.2 Cuantificación de esporas de P. larvae	16
6.3 Cría e infección de larvas en el laboratorio.....	16
6.3.1 Cría de larvas:	16
6.3.2 Infección de larvas:	17
6.3.3 PCR:	17
6.4 Obtención de cortes de larvas	18
6.4.1 Preparación de portaobjetos y cubreobjetos:	18
6.4.2 Preparación de la muestra y corte con el Crióstato	19
6.4.3 Preparación del bloque de albúmina-gelatina y corte con el vibrátomo:	19
6.5 Interacción hospedero-microorganismo	20

6.5.1 Inmunofluorescencia sobre cultivos puros de <i>P.larvae</i> :	20
6.5.2 Inmunofluorescencia sobre esporas de <i>P. larvae</i> :	21
6.5.3 Preparación de las sondas para FISH:	21
6.5.4 Inmunofluorescencia y FISH sobre células vegetativas a partir de un cultivo puro:	22
6.5.5 Inmunofluorescencia y FISH sobre esporas de <i>P. larvae</i> :	23
6.5.6 Protocolo de FISH e inmunofluorescencia sobre cortes de larvas: ...	23
6.5.7 Obtención de imágenes y visualización de la interacción hospedero-microorganismo:	24
7. Resultados:	25
7.1 Obtención de esporas	25
7.2 Cuantificación de esporas de <i>P. larvae</i>	26
7.3 Cría e infección de larvas en el laboratorio:	26
7.3.1 Cría de larvas:	26
7.3.2 Infección de larvas:	26
7.3.3 PCR:	27
7.4 Obtención de cortes de larvas	28
7.4.1 Preparación de la muestra y corte con el crióstato:	28
7.4.2 Preparación del bloque de albúmina-gelatina y corte con el vibrátomo:	28
7.5 Interacción hospedero-microorganismo	29
7.5.1 Inmunofluorescencia sobre células vegetativas y esporas de <i>P. larvae</i> :	29
7.5.2 Inmunofluorescencia y FISH sobre células vegetativas y esporas de <i>P. larvae</i> :	30
7.5.3 Protocolo de FISH e inmunofluorescencia sobre cortes de larvas: ...	32
8. Discusión:	33
9. Conclusiones y perspectivas:	36
10. Bibliografía:	37

4. Introducción:

4.1 Generalidades e importancia de las abejas melíferas

En Uruguay al año 2009 el sector apícola contaba con 497.647 colmenas de 3217 productores aptos para canalizar su miel a la exportación. Estas colmenas en octubre del año pasado produjeron 7.000 toneladas de miel, con un precio promedio de 2,50 dólares el kilo (Díaz, 2010; JUNAGRA, 2009a, 2009b). El principal destino de las exportaciones fue Alemania, concentrando el 86 % de las ventas de miel al exterior, España fue el segundo destino en importancia (8 %) y el resto de las exportaciones fueron dirigidas a otros siete países (Errea & Licandro, 2009).

La importancia económica que poseen las abejas melíferas (*Apis mellifera*) a veces no es reconocida, hay que tener en cuenta que además de la comercialización de los diversos productos derivados de las colmenas (miel, polen, jalea real, propóleos, núcleos, venta de reinas y paquetes de abejas), las abejas también cumplen un rol muy importante en la polinización de muchas especies.

El polen y el néctar forman parte de la dieta de las abejas ya que aportan proteínas, lípidos, minerales y vitaminas, por lo tanto las abejas necesitan visitar grandes cantidades de flores diariamente para satisfacer los requerimientos nutricionales de la colmena (Santos *et al.*, 2009a). La abeja melífera es el principal insecto polinizador que existe en la naturaleza; su abundancia puede variar entre el 60 y el 95 % de todos los polinizadores, y se ha observado que participan en la polinización tanto de cultivos agrícolas como de especies silvestres, manteniendo de esta forma los diversos ecosistemas (Mendoza *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2009b; Simó, 2002).

Según datos de Santos *et al.* (2009b), en 2008 la producción de cultivos de interés comercial aumentó en aproximadamente 70 % debido al aporte de las abejas, estos fueron los resultados de un estudio preliminar realizado para determinar cual es el valor económico que se le puede atribuir a la polinización realizada por estos insectos.

En Uruguay, la rentabilidad del sector apícola en los últimos años se está viendo amenazada por el deterioro creciente de la sanidad de las colmenas y la importancia de la apicultura en el sector agro-exportador está cada vez más comprometida. Periódicamente los apicultores deben afrontar graves pérdidas debidas a las restricciones de los países importadores y al ataque de patógenos de distintas clases que llevan al despoblamiento de las colmenas (Antúnez *et al.*, 2006; Antúnez *et al.*, 2009b; Evans & Weaver, 2003; Morse & Flottum, 1997; Santos & Martínez, 2010). Las enfermedades infecciosas de la cría son muy perjudiciales para las abejas, destacándose como la enfermedad de origen bacteriano más destructiva a la Loque Americana.

4.2 Descripción de la Loque Americana

La Loque Americana esta distribuida mundialmente y afecta a las larvas de las abejas *A. mellifera* y otras *Apis* spp. (Hansen & Brodsgaard, 1999; OIE, 2004). El agente causal es *Paenibacillus larvae* (Genersch *et al.*, 2006), un bacilo Gram positivo, catalasa negativo, anaerobio facultativo, con bajo porcentaje de GC y formador de endosporas (Hansen & Brodsgaard, 1999; Stahly, 2002). Las esporas son muy resistentes al calor, a los agentes químicos y a la desecación, pudiendo conservar su capacidad para germinar durante muchos años, dificultando su eliminación (Dobbelaere *et al.*, 2001; Hansen & Brodsgaard, 1999).

Las vías de dispersión de las esporas son muchas, pero se pueden destacar el pillaje de colmenas débiles y enfermas, los enjambres y el mal manejo por parte del apicultor (De Graaf *et al.*, 2001; Hansen & Brodsgaard, 1999).

El manejo que realiza el apicultor es muy importante ya que puede propagar las esporas al alimentar las abejas con miel y polen, al intercambiar cuadros de cría de una colmena a otra, al comprar, vender o trasladar paquetes, núcleos, colmenas y reinas sin control sanitario, así como al utilizar palancas, guantes y otros equipos contaminados (Hansen & Brodsgaard, 1999; Hornitzky & Karlovskis, 1989). Se considera que la transmisión de esporas por la utilización de cera estampada y la deriva de abejas tiene menor importancia en la diseminación de este patógeno (Goodwin *et al.*, 1994; Lindström *et al.*, 2008).

Las larvas de las abejas obreras, reinas y zánganos se infectan al ingerir alimento contaminado con esporas cuando son alimentadas por las abejas nodrizas luego de la eclosión del huevo (Hornitzky, 1998). Las esporas se diseminan dentro de la colmena cuando las abejas encargadas de la limpieza contaminan su aparato bucal al remover las larvas muertas y posteriormente las transmiten a las larvas sanas cuando las alimentan.

Se ha demostrado que la edad de las larvas está relacionada con la susceptibilidad de contraer Loque Americana. Las larvas con menos de 24 hs son las más propensas a infectarse, con una dosis de esporas muy baja contraen la enfermedad. A medida que la larva se desarrolla la susceptibilidad disminuye y las larvas con más de 72 hs de vida ante la misma dosis son resistentes (Brodsgaard *et al.*, 1998; Crailsheim & Riessberger-Gallé, 2001; Wedenig *et al.*, 2003; Woodrow, 1942; Woodrow & Holst, 1942). Se han propuesto varias teorías sobre la causa de esta resistencia dependiente de la edad. Algunos autores proponen que esto se debe a la presencia de inhibidores del crecimiento bacteriano en el intestino de las larvas mayores a 24 hs. Estos inhibidores pueden estar relacionados con la dieta de las larvas o ser proteínas antibacteriales propias del sistema inmune de las abejas (Casteels *et al.*, 1989; Crailsheim & Riessberger-Gallé, 2001). Otros autores proponen que la resistencia puede depender de la membrana peritrófica, ya que en las larvas más jóvenes, no está del todo desarrollada y por lo tanto no impide la colonización e invasión de los patógenos (Gregorc & Bowen, 1998; Yue *et al.*, 2008).

Las abejas adultas no son susceptibles a la enfermedad, pero las esporas sobreviven en su tracto digestivo hasta por dos meses, favoreciendo así su diseminación. La mayoría de las larvas menores a 24 hs que son infectadas, muere a los 9 días de vida, una vez que las celdas han sido operculadas y las larvas se preparan para pupar (Bailey & Lee, 1962; Hansen & Brodsgaard, 1999).

Aunque la Loque Americana y *P. larvae* han estado bajo estudio desde hace por lo menos un siglo (White, 1906), es escasa la información sobre la interacción entre el hospedero y el patógeno. Los diferentes pasos en el

proceso de infección de la larva (Figura 1) permanecen aún sin elucidar completamente. Los pasos que siguen a la ingestión de las esporas están muchas veces descritos solo superficialmente: las esporas germinan en el lumen del intestino medio; luego las células vegetativas penetran el epitelio y proliferan en la hemolinfa (Hansen & Brodsgaard, 1999).

Con el advenimiento de la microscopía electrónica se obtuvo una primera aproximación de cómo ocurre el proceso de infección; de acuerdo a esta información las esporas germinarían preferencialmente en la parte anterior y posterior del intestino medio, donde las células vegetativas penetrarían al epitelio por fagocitosis (Davidson, 1973; Gregorc & Bowen, 1998).

Sin embargo, aún no estaba claro cuándo tenía lugar la proliferación bacteriana, entonces Yue *et al.*, (2008) demostraron por ensayos de *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)* que una vez ingeridas, las esporas llegan al lumen del intestino donde germinan dando lugar a células vegetativas. Éstas proliferan y se mueven hacia el epitelio, destruyen las interacciones célula-célula e invaden el espacio intercelular, llegando a la hemolinfa del hospedero de manera muy veloz. Cabe destacar que en estos estudios no encontraron preferencia por alguna zona particular del intestino.

Durante muchos años se pensó que *P. larvae* comienza a esporular en las etapas finales de la infección mientras el hospedero se descompone (Davidson, 1973), pero estudios más recientes demostraron que la esporulación se da desde etapas muy tempranas y es continuo durante todo el proceso de infección (Yue *et al.*, 2008); este proceso finaliza cuando la larva se deshidrata formando una “escama” que permanece adherida a la pared de la celda. Se estima que en cada larva muerta puede haber cerca de 2.5×10^9 esporas viables (Gregorc & Bowen, 1998; Hansen & Brodsgaard, 1999; Sturtevant, 1932).

Los síntomas clínicos de la Loque Americana se manifiestan en los cuadros de cría ya que dejan de tener un aspecto normal y se observa la cría salteada, las celdas afectadas presentan los opérculos hundidos, oscurecidos, de apariencia húmeda y con perforaciones irregulares (Figura 2B).

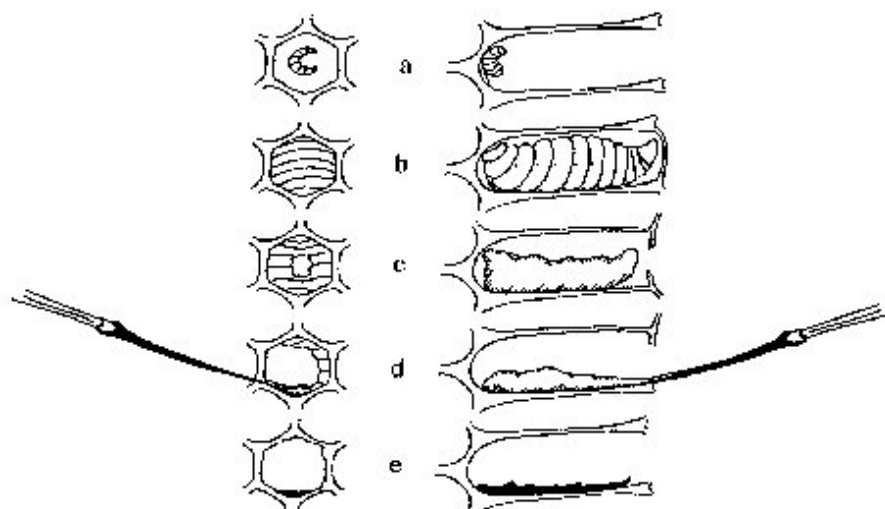


Figura 1.- Desarrollo de la enfermedad: (a) Larva menor a 24 hs ingiere alimento contaminado con esporas de *P. larvae*. (b) Desarrollo larval hasta el estadio de prepupa. (c) El contenido de la celda se reduce y el opérculo se hunde y se perfora (d) El contenido de la celda se convierte en una masa gelatinosa. (e) La escama se adhiere al fondo y las paredes de la celda (OIE, 2004).

Al introducir un palillo a través del opérculo se extrae una masa viscosa de color variable entre amarillento y marrón oscuro, casi negro, que se estira más de 2,5 cm (Figura 2C). Este aspecto se debe a la presencia de proteasas características de *P. larvae* (Dancer & Chantawannakul, 1997).

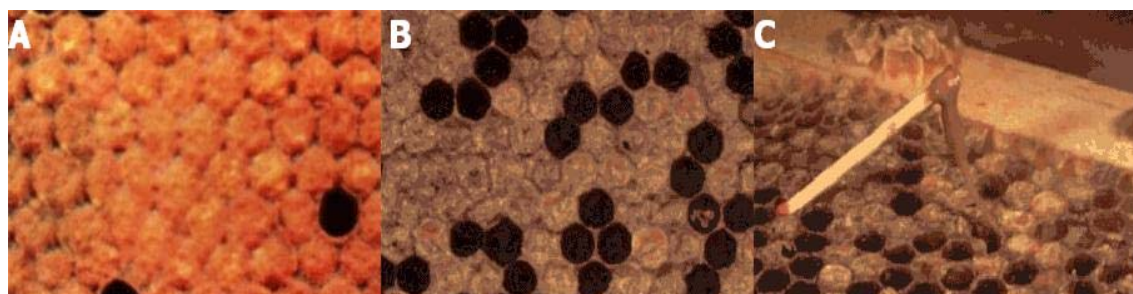


Figura 2.- (A) Se puede observar un cuadro de cría normal. (B) Se puede observar un cuadro de cría enfermo con cría salteada, los opérculos perforados y/o hundidos así como las escamas dentro de las celdas. (C) Se puede apreciar la "sustancia viscosa", caracterizada por adoptar esa forma cuando se le realiza la prueba del "palillo" (Beekeeping.cl, <http://www.beekeeping.cl/news.php?newsid=83>; Hansen & Brodsgaard, 1999).

4.3 *Paenibacillus larvae* en la región

La Loque Americana es una enfermedad distribuida mundialmente, habiéndose detectado casos en todos los continentes en los que se practica la apicultura (Alippi & Aguilar, 1998).

Los primeros aislamientos de *P. larvae* en la región se realizaron en Argentina en 1989, más específicamente en la provincia de Buenos Aires. Posteriormente se observó que este microorganismo se encontraba en todos los apiarios de este país (Alippi, 1992, 1996).



Figura 3.- Patrón de distribución de esporas de *P. larvae* / g de miel en Uruguay (Antúnez *et al.*, 2004).

En Uruguay en 1999 la Oficina Internacional de Epizootías (OIE) informó la detección de esporas de *P. larvae* en 44 muestras de mieles uruguayas de exportación. Desde ese momento un grupo de investigadores del Departamento de Microbiología del IIBCE ha estado avocado al estudio de este patógeno.

Los primeros aislamientos se realizaron en el 2000 a partir de abejas adultas de apiarios aparentemente sanos de la zona de Colonia y Paysandú (Piccini & Zunino, 2001). Estos aislamientos resultaron sensibles a la oxitetraciclina, el antibiótico más comúnmente utilizado frente a la Loque Americana (Hansen & Brodsgaard, 1999) y para el que se han descrito cepas resistentes en Argentina, España y Estados Unidos (Alippi, 1996; Evans, 2003; Miyagi *et al.*, 2000).

En 2002, Piccini *et al.* desarrollaron una técnica para detectar específicamente a *P. larvae*, mediante amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S. Utilizando esta técnica se realizó un estudio a nivel nacional para investigar la presencia de esporas de *P. larvae* en mieles uruguayas (Figura 3),

encontrándose que está ampliamente distribuido dentro del territorio nacional y el litoral oeste es el más afectado (Antúnez *et al.*, 2004). En 2007 se determinó la presencia de diferentes linajes de *P. larvae* en Uruguay, uno de ellos (ERIC I-BOX A) está distribuido mundialmente y el otro (ERIC I-BOX C) fue reportado sólo en Argentina. Estos resultados sugieren que *P. larvae* habría ingresado a nuestro país por el litoral oeste a través del río Uruguay y que estaría colonizando poco a poco el resto del país (Antúnez, 2006; Antúnez *et al.*, 2007).

La utilización de antibióticos para la prevención y el tratamiento de colmenas infectadas con *P. larvae* está contraindicado ya que acortan la vida media de las abejas, dejan residuos en la miel y aumentan el riesgo de seleccionar cepas resistentes ya que se deben aplicar cada vez que hay un brote. En la búsqueda de alguna herramienta de tratamiento de la colmenas, en 2008 Antúnez *et al.* evaluaron el uso del Extracto Etanólico de Propóleos (EEP) como agente para el control de la Loque Americana observando que el EEP inhibe las células vegetativas de *P. larvae in vitro* y que al aplicar este mismo producto en colmenas naturalmente infectadas, el número de esporas de *P. larvae* por gramo de miel disminuye significativamente (Antúnez *et al.*, 2008).

4.4 Factores de virulencia de *P. larvae*

La capacidad de los patógenos bacterianos para interactuar y manipular de manera eficiente a su huésped, los hace exitosos. Uno de los principales mecanismos por el cual logran esta meta es a través de proteínas especializadas que pueden ser externalizadas. Éstas son capaces de una variedad de funciones: estar involucradas con la nutrición, toxicidad (tanto para el hospedero como para otros microorganismos) o generar alteraciones de las funciones de las células hospederas en beneficio del patógeno. Las proteínas son sintetizadas en el citosol y son transportadas a través de una o más bicapas lipídicas y otras estructuras sobre la superficie de la célula y de ahí al medio externo para que puedan interactuar con el hospedero (Schmid-Hempel, 1998; Wooldridge, 2009).

En 1906, White descubrió que el organismo causal de la Loque Americana era *P. larvae*; un siglo después, se publicó el genoma de este

microorganismo. Sin embargo, hasta el momento continúa siendo escasa la información acerca de los factores de virulencia producidos por *P. larvae* (Qin *et al.*, 2006; White, 1906).

Durante el período en que las larvas de las abejas son alimentadas por las nodrizas, poseen en su intestino enzimas con actividad proteolítica. Estas proteasas en las larvas sanas desaparecen cuando la celda es operculada y comienza el estadio de prepupa, en cambio en las larvas infectadas con *P. larvae* se observa que estas enzimas no desaparecen. Se ha reportado que son proteínas secretadas por *P. larvae* durante el proceso de esporulación (Holst & Sturtevant, 1940). Asimismo, se ha observado que las células vegetativas de *P. larvae* durante su replicación también producen y secretan diferentes enzimas con actividad proteolítica (Antúnez *et al.*, 2009a; Hrabak & Martinek, 2007).

Las metaloproteasas han sido reconocidas como importantes factores de virulencia de una gran variedad de patógenos bacterianos (Bergmann & Hammerschmidt, 2006; Charlton *et al.*, 1999; Dalhammar & Steiner, 1984; Hase & Finkelstein, 1993; Held *et al.*, 2007; Ramarao & Lereclus, 2005; Rivero-Garcia *et al.*, 2005). Estas proteasas son capaces de digerir péptidos antibacterianos, las proteínas de la matriz extracelular y cortar componentes de los tejidos (fibronectina, laminina y algunos tipos de colágeno), lo que les permite a las bacterias evadir el sistema inmune e internalizarse en los tejidos profundos y la hemolinfa (Caldas *et al.*, 2002; Dancer & Chantawannakul, 1997; Guillemet *et al.*, 2010; Held *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010; Miyoshi *et al.*, 1998; Miyoshi & Shinoda, 2000; Mo *et al.*, 2010; Norqvist *et al.*, 1990; Secades *et al.*, 2003; Thangam & Rajkumar, 2002). En el caso de *P. larvae*, es uno de los factores de virulencia reconocidos y estudiados hasta el momento. Se ha descrito que las proteasas son secretadas al medio y se ha propuesto que estarían involucradas en la degradación de la larva que da lugar a la “escama”, así como en la evasión del sistema inmune por la degradación de apiadecinas (Antúnez *et al.*, 2009a; Casteels *et al.*, 1989; Dancer & Chantawannakul, 1997; Hansen & Brodsgaard, 1999; Hrabak & Martinek, 2007).

La enolasa es otra proteína que está siendo considerada como un potencial factor de virulencia de diferentes patógenos bacterianos. Se ha

descrito que la enolasa tiene un rol fundamental en el metabolismo celular de distintos seres vivos, ya que cataliza la reacción reversible de 2-fosfolicerato (2-PGE) a fosfoenolpiruvato (PEP) en la glucólisis y la reacción inversa, de PEP a 2-PGE en la gluconeogénesis (Nelson & Cox, 1995; Pancholi, 2001; Pancholi & Fischetti, 1998). Además de su rol en el metabolismo, otros autores reportaron la presencia de enolasa en la superficie de células vegetativas, de esporas e incluso siendo secretada por bacterias patógenas. Algunos de estos autores también reportaron que la enolasa resulta tóxica o inmunogénica para el hospedero (Bergmann *et al.*, 2001; Delvecchio *et al.*, 2006; Ge *et al.*, 2004; Sha *et al.*, 2009; Walz *et al.*, 2007; Yavlovich *et al.*, 2007). El primer reporte de esta proteína en *P. larvae* lo realizaron Antúñez *et al.* (2010), cuando la encontraron formando parte del secretoma de este microorganismo. La enolasa está involucrada en la unión del plasminógeno del hospedero y su posterior activación. La activación del sistema fibrinolítico en la superficie bacteriana permite la invasión de las barreras del hospedero (Agarwal *et al.*, 2008; Bergmann *et al.*, 2001; Esgleas *et al.*, 2008; Ge *et al.*, 2004; Lamonica *et al.*, 2005; Liu & Shih, 2007; Pancholi & Fischetti, 1998; Sha *et al.*, 2009; Yavlovich *et al.*, 2007). Aunque el plasminógeno ha sido detectado solo en mamíferos, en insectos se han identificado proteínas tipo plasmina (Hahn *et al.*, 2001), por lo que es posible que exista un sistema fibrinolítico similar al de mamíferos, en cuyo caso, la enolasa de los microorganismos patógenos de insectos también podría tener un efecto similar en la invasión y degradación de tejidos del hospedero.

5. Objetivos:

5.1 Objetivo general

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el mecanismo de interacción entre el hospedero (*A. mellifera*) y *P. larvae*, el agente causal de la Loque Americana.

5.2 Objetivos específicos

- Poner a punto una metodología para la obtención de esporas de *P. larvae*.
- Poner a punto la técnica de inmunofluorescencia sobre *P. larvae* empleando anticuerpos generados frente a proteínas de superficie.
- Poner a punto la técnica de *FISH* para el estudio de *P. larvae* empleando una sonda específica para este microorganismo y otra para las larvas.
- Poner a punto la metodología de cría e infección de larvas de abejas melíferas en el laboratorio.
- Evaluar diferentes metodologías para el procesamiento y obtención de cortes de larvas para posterior análisis mediante microscopía confocal.
- Puesta a punto de las técnicas de inmunofluorescencia y *FISH* sobre los cortes de larvas
- Visualizar la interacción entre *P. larvae* y la larva mediante microscopía confocal.

6. Materiales y métodos:

6.1 Obtención de esporas

6.1.1 Aislamientos bacterianos y condiciones de cultivo:

En este trabajo se utilizó el aislamiento bacteriano *P. larvae* 44 obtenido de una muestra de miel del departamento de Durazno del año 2002 y perteneciente a la colección del Departamento de Microbiología del IIBCE.

Este aislamiento se cultivó en medio semi selectivo J (0.5 g triptona, 1.5 g extracto de levadura, 0.1 g K₂HPO₄, 0.3 g glucosa, 1.8 g agar en 100 ml de agua destilada) y se incubó a 37° C durante 48 hs en condiciones de microaerofilia (Hornitzky & Nicholls, 1993).

6.1.2 Obtención de esporas:

Para la obtención de una suspensión de esporas se evaluaron las siguientes estrategias:

- Ensayo con agua destilada:

Se sembraron placas de medio J con *P. larvae* y se incubaron a 37° C durante 48 hs; posteriormente estas mismas placas se incubaron a temperatura ambiente durante 15 días. Luego se resuspendieron las células en 1 ml de agua destilada estéril (desde ahora ADE); se centrifugó a 12.247 x g durante 40 min y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se realizó tres veces consecutivas. La suspensión se incubó a 4° C durante 30 días.

- Ensayo con PBS:

Se realizó una modificación del procedimiento anterior sustituyendo el ADE por *buffer* salino fosfatado estéril (PBS).

- Protocolo de Genersch et al. (2005) modificado:

En 4 tubos estériles se colocaron 8 ml de agar J en forma de pico de flauta. A partir de un cultivo puro de *P. larvae* en agar J se preparó una suspensión bacteriana en 600 µl de Brain Heart Infusion (BHI) o 600 µl de

caldo J. Se colocaron en cada tubo de agar pico de flauta 300 µl de los caldos BHI o caldo J y se incubaron a 37° C durante 14 días. Luego se recuperaron los caldos y se centrifugaron a 12.247 x g durante 40 min, se descartaron los sobrenadantes y los sedimentos se resuspendieron en 1 ml de PBS, se centrifugaron nuevamente a 12.247 x g durante 40 min, y se resuspendió en 1 ml de PBS. Esta suspensión se incubó a 4° C durante 30 días.

6.2 Cuantificación de esporas de *P. larvae*

Para evaluar la presencia de esporas y células vegetativas en las distintas suspensiones y realizar su cuantificación, se colocaron 20 µl de cada suspensión sobre una superficie de 1 cm² en un portaobjetos, se dejaron secar y se fijaron por calor. Posteriormente sobre cada portaobjetos se colocó paraformaldehído (PFA) 3 % y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS y se incubaron con *buffer* de permeabilización (**P**; Saponina 0.1 % en *Buffer* de saturación [**NP**]: BSA 2 %, NH₄Cl 50 mM en PBS 1X;(Scavone, comunicación personal) a temperatura ambiente durante 20 min. Se enjuagaron con PBS y se les colocó DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole, Sigma) concentración final 1 µg/ml. Los preparados se incubaron 5 min en oscuridad, se enjuagaron con abundante agua destilada, se montaron con *Citifluor* y se observaron en microscopio de epifluorescencia.

Para estimar el número de esporas en la suspensión se utilizó un microscopio de epifluorescencia y se realizó un promedio de las esporas contadas en 40 campos (área del campo= 100 µm²).

6.3 Cría e infección de larvas en el laboratorio

Dado el carácter altamente infeccioso de la Loque Americana no es conveniente realizar ensayos de infección en campo; por este motivo se puso a punto un modelo de cría e infección de larvas dentro del laboratorio.

6.3.1 Cría de larvas:

Para la cría de larvas en el laboratorio se empleó el protocolo de Evans (2004) con modificaciones: se preparó la dieta artificial (66 % de jalea real

pura, 6 % de glucosa, 6 % de fructosa y 1 % de extracto de levadura) y se almacenó a 4° C. El primer día se colocaron 20 µl de alimento en cada uno de los 96 pocillos de una placa de microtitulación. La placa se incubó en la estufa a 34.5° C y alto porcentaje de humedad durante 30 min (para mantener las condiciones de temperatura y humedad necesarias para la supervivencia de las larvas). Se tomó un cuadro de cera perteneciente a una colmena localizada en el IIBCE y se llevó al laboratorio donde se sacaron las larvas más pequeñas del cuadro (menos de 24 hs de vida); éstas se colocaron sobre el alimento, y se incubaron en la estufa durante 48 hs. Posteriormente se colocaron 100 µl de alimento en cada uno de los 96 pocillos de una nueva placa de microtitulación; la placa se incubó en la estufa durante 30 min y luego las larvas vivas se trasladaron a esta placa. A las 72, 96 y 120 hs se repitió el procedimiento pero colocando en la placa de cultivo 200 µl de alimento.(2004)

6.3.2 Infección de larvas:

La infección de las larvas en el laboratorio se realizó según el protocolo antes descrito por Evans (2004). Con el fin de determinar el número de esporas necesario para la infección, el primer día se inocularon en el alimento diferentes concentraciones de esporas: 100, 500 y 1000 esp/µl de alimento. Como control se crió un grupo de larvas en alimento sin esporas.

El número de larvas vivas y muertas se registró diariamente y posteriormente se cuantificó el porcentaje de mortalidad para cada concentración de esporas.

6.3.3 PCR:

Las larvas muertas durante los ensayos de infección se sometieron a tratamiento de microondas por 7 min a máxima potencia para romper las células y poder extraer el ADN de la muestra. Luego los restos larvales se resuspendieron en 300 µl de ADE, se vortexearon durante 3 min y se centrifugaron a 825 x g durante 5 min. A continuación se realizó una dilución 1:10 en ADE de los sobrenadantes, de manera de evitar la inhibición de la amplificación debido a los compuestos larvales.

Se amplificó el gen que codifica para el ARNr 16S de *P. larvae* mediante PCR utilizando los cebadores PI5 y PI4 diseñados por Piccini *et al.* (2004). Los mismos amplifican específicamente un fragmento de 700 pb del gen del ARNr 16S de *P. larvae*. Las secuencias de los cebadores utilizados son: PI5: **5'-CGAGCGGACCTTGTGTTTCC-3'** (posiciones 8 a 27), y PI4: **5'-TCAGTTATAGGCCAGAAAGC-3'** (posiciones 707 a 688).

La PCR se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo 0.75 µl de MgCl₂ (50 mM), 2.5 µl de buffer de PCR (10 X), 0.5 µl del mix de deoxinucleótidos trifosfato (10mM), 1U de Taq ADN polimerasa (5 u/µl), 2 µl de cada cebador (5 µM) y 1 µl de la dilución 1:10 de los sobrenadantes obtenidos anteriormente. Todos los productos de PCR utilizados fueron de Invitrogen. El programa empleado consistió en 95° C durante 1 min; 25 ciclos de: 93° C durante 1 min, 55° C durante 30 seg, 72° C durante 1 min y un ciclo final de 72° C durante 5 min usando el *T1 Biometra Thermocycler* (Piccini *et al.*, 2002). Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa 0.8 % (w/v), se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron mediante luz UV en un transiluminador.

6.4 Obtención de cortes de larvas

Se evaluaron distintos métodos de procesamiento de las larvas con el fin de obtener cortes histológicos de las mismas. El ensayo de infección se repitió de acuerdo a lo descrito previamente y las larvas se sacrificaron a los tres y siete días post infección.

6.4.1 Preparación de portaobjetos y cubreobjetos:

Se preparó gelatina (0.5 g en 100 ml de agua ultra pura, 0.05 g de cromoalumbre), se filtró y se incubó a 4° C durante una semana.

Tanto los portaobjetos como los cubreobjetos se limpiaron por inmersión en una solución de alcohol 70 % más 1 % de HCl toda la noche. Se enjuagaron con agua destilada y a continuación se sumergieron en la gelatina durante unos segundos, se dejaron secar y se guardaron a 4° C.

6.4.2 Preparación de la muestra y corte con el Crióstato:

Con el fin de proteger los tejidos para su posterior corte en el crióstato se ensayaron distintas metodologías:

- a) Las larvas se fijaron con PFA 3 % a 4° C durante 1.30 hs; se realizaron tres lavados de 15 min en PBS para eliminar el PFA excedente y se incubaron en solución de sacarosa 20 % en PBS con el fin de críoprotegerlas.
- b) Se deshidrataron las larvas con un tratamiento seriado en alcohol (alcohol 70 % durante 1.30 hs, alcohol 90 % durante 1.30 hs y alcohol absoluto durante 1.30 hs). Posteriormente las larvas se fijaron con PFA 3 % a 4° C durante 1.30 hs; se realizaron tres lavados de 15 min en PBS para eliminar el PFA excedente y se colocaron en solución de sacarosa 20 %.
- c) Se extrajeron los intestinos de las larvas con pinzas y bajo lupa, se los fijó con PFA 3 % a 4° C durante toda la noche. Posteriormente se realizaron tres lavados de 15 min en PBS estéril para eliminar los excedentes de PFA y se colocaron en solución de sacarosa 20 %.

Se colocó sobre trocitos de plancha de corcho una capa de *tissue freezing medium*[®] (**Leica Cryocompound**) y se colocaron a -20° C para que la matriz tomara consistencia sólida. Paralelamente las larvas y los intestinos se secaron con papel absorbente, luego se colocaron sobre la plancha de corcho, se cubrieron con capas delgadas de *tissue freezing medium*[®] y se colocaron nuevamente a -20° C.

Las muestras se cortaron en el crióstato (*Leica CM1900*) y los cortes se colocaron sobre los portaobjetos gelatinizados.

6.4.3 Preparación del bloque de albúmina-gelatina y corte con el vibrátomo:

Se preparó medio salino estéril (9.0 g de NaCl, 0.2 g de NaN₃ en 1000 ml de agua destilada), albúmina (4.5 % de BSA en buffer salino) y gelatina (1.5 % de gelatina en buffer salino).

Las larvas se fijaron inyectándoles PFA 3 % en el intestino y se las incubó a 4° C sumergiéndolas en PFA 3 % durante toda la noche. Posteriormente se les realizaron lavados sucesivos en PBS 1X estéril (tres

lavados durante 5 min y cuatro lavados durante 15 min) con el fin de eliminar el excedente de PFA. Para la preparación de los bloques de albúmina - gelatina se mezclaron 1 ml de albúmina y 0.5 ml de gelatina, se le agregó 50 µl de glutaraldehído al 25 %; se mezcló rápidamente y se vertió sobre un molde. La larva se secó con papel absorbente y se colocó dentro del molde de manera que quedara cubierta por la mezcla. Se dejó polimerizar y se despegó del molde. Posteriormente se colocó una gota de cianoacrilato sobre la cubeta con platina de muertos del vibrátomo (*Leica VT100S*) y sobre ella el bloque con la muestra. La frecuencia, la velocidad, el espesor y la ventana de corte se ajustaron según cada larva.

6.5 Interacción hospedero-microorganismo

6.5.1 Inmunofluorescencia sobre cultivos puros de *P. larvae*:

El protocolo de inmunofluorescencia se realizó en base a modificaciones del protocolo propuesto por Gu *et al.* (2005).

Se utilizó inmunofluorescencia para analizar si la enolasa y la metaloproteasa se encuentran dentro de las células, forman parte de la superficie celular o son secretadas al medio. Para ello se utilizaron anticuerpos policlonales de ratón generados en el laboratorio contra la enolasa o la metaloproteasa recombinante. La especificidad del antisuero para estas proteínas se demostró mediante *western blot* en trabajos previos realizados en el laboratorio (Antúñez *et al.*, 2010).

Para realizar los ensayos de inmunofluorescencia se preparó una suspensión bacteriana equivalente a 1 de la escala Mc Farland en PBS a partir de un cultivo puro fresco de *P. larvae*. Una alícuota de 1 ml de la suspensión de células vegetativas se centrifugó a 12.247 x g durante 5 min; el sobrenadante se descartó y se resuspendió el sedimento en 1 ml de PBS. Se repitió la centrifugación y la resuspensión 2 veces más, para de esta forma evitar que los anticuerpos se peguen a las proteínas (enolasa y metaloproteasa) secretadas al medio por *P. larvae* lo que ocasionaría mucho “ruido de fondo” al observar los preparados en el microscopio confocal. Diez µl de esa suspensión se colocaron

sobre un portaobjetos y se dejaron secar al aire. Posteriormente las células se fijaron mediante incubación con PFA 3 % durante 20 min. A continuación se lavaron con PBS varias veces para eliminar el excedente de PFA. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 20 min con buffer NP; se lavaron varias veces con PBS y se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 1 hr con una dilución 1:100 del suero (anti-enolasa o anti-metaloproteasa) en buffer NP. Se lavaron nuevamente con PBS y se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente con buffer P durante 10 min; posteriormente los portaobjetos se lavaron varias veces con PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min con una dilución 1:100 de DAPI más el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (asociado a FITC; *Molecular Probes*, 488nm). Las muestras se lavaron con PBS varias veces y una vez con agua destilada, se montaron en *Citifluor* y se observaron mediante microscopía confocal.

Como control negativo se trataron las muestras solo con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón.

6.5.2 Inmunofluorescencia sobre esporas de *P. larvae*:

La suspensión de esporas en PBS se centrifugó a 12.247 x g durante 40 min para de esta forma evitar que los anticuerpos se peguen a las proteínas secretadas al medio por *P. larvae*. Se siguió el protocolo descrito anteriormente pero sobre los portaobjetos se colocaron 20 µl de la suspensión de esporas.

Como control negativo se trataron las muestras solo con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón.

6.5.3 Preparación de las sondas para FISH:

Para los ensayos de *FISH* se utilizó la sonda EUK516: **5'-ACCAGACTTGCCCTCC-3'** marcada con CY3 en el extremo 3'. Esta sonda es general para eucariotas y se une a un sitio del ARNr 18S (*Yue et al.*, 2008). También se utilizó la sonda PL16S: **5'-CTAACCTGGCGTCTCCCGAA-3'**, específica para *P. larvae*, marcada en el extremo 5' con CY5 (*Amann et al.*,

1990). La especificidad de la sonda PL16S para *P. larvae* se corroboró en la base de datos del *Ribosomal Database Project* (RDP; Cole *et al.*, 2009).

Las sondas son suministradas de forma liofilizada, por lo tanto para poder utilizarlas se resuspendieron en 100 µl de ADE. La concentración de las sondas se determinó mediante determinación de la absorbancia a 260 nm empleando un *nanodrop*, utilizando una dilución 1:100 de la solución *stock* de las sondas. Posteriormente se llevaron ambas sondas a una concentración final de 50 mM y esta solución se llamó: “solución de trabajo”.

Para los ensayos de *FISH* se utilizó una concentración final de 5 mM de cada sonda. Las diluciones se realizaron en *buffer* de hibridación (Formamida 20 %, NaCl 0.9 M, Tris-HCl 20 mM pH 7.9, SDS 0.01 %, agua destilada a 1ml;(Scavone, comunicación personal) antes de cada ensayo.

El análisis conjunto de inmunofluorescencia y *FISH* se realizó en base a modificaciones de los protocolos propuestos por Gu *et al.* (2005) y Yue *et al.* (2008), respectivamente.

6.5.4 Inmunofluorescencia y FISH sobre células vegetativas a partir de un cultivo puro:

Para realizar la inmunofluorescencia se siguió el protocolo establecido en el punto 6.5.1. Al completar dicho protocolo, las células se sometieron a *FISH*. Para ello, los preparados se incubaron en cámara húmeda a 46° C durante 4 hs con 5 mM de la sonda PL16S. Se precalentó buffer de lavado (NaCl 5 M, Tris-HCl 1 M pH7.9, EDTA 0.4 M, SDS 10 %) a 48° C. Los preparados se incubaron en el buffer de lavado a 48° C durante 25 min. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se incubaron con 10 µl de DAPI en la oscuridad durante 3 min; se lavaron con agua destilada, se montaron en *Citifluor* y se observaron mediante microscopía confocal.

Como control negativo se utilizó un cultivo puro fresco de *P. larvae* pero no se le agregó ni anticuerpo primario ni sonda.

6.5.5 Inmunofluorescencia y FISH sobre esporas de *P. larvae*:

Para realizar la inmunofluorescencia se siguió el protocolo establecido en el punto 6.5.2. Al completar dicho protocolo, las esporas se sometieron a *FISH*. Para ello, los preparados se incubaron en cámara húmeda a 46° C durante 4 hs con 5 mM de la sonda PL16S. Se precalentó buffer de lavado a 48° C y los preparados se incubaron en el buffer de lavado a 48° C durante 25 min. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se incubaron con 10 µl de DAPI en la oscuridad durante 5 min; se lavaron con agua destilada, se montaron en *Citifluor* y se observaron mediante microscopía confocal.

Como control negativo se utilizaron 20 µl de la suspensión de esporas de *P. larvae* pero no se le agregó ni anticuerpo primario ni sonda.

6.5.6 Protocolo de FISH e inmunofluorescencia sobre cortes de larvas:

Se lavaron portaobjetos por inmersión en alcohol 95 % + HCl 1 % durante 24 hs. Se enjuagaron con agua destilada, se dejaron secar y posteriormente se sumergieron en agarosa 0.2 %. Los cortes de larvas se colocaron sobre los portaobjetos y se volvieron a sumergir en agarosa 0.2 %. Se incubaron las muestras a 46° C durante 4 hs con 5 mM de la sonda EUK516. Se precalentó el buffer de lavado a 48° C y los preparados se incubaron en *buffer* de lavado a 48° C durante 25 min. Luego de completado el protocolo de *FISH* se realizó el bloqueo en PBS-BSA 1 hr a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron los portaobjetos a 4° C durante toda la noche con una dilución 1:100 del anticuerpo primario en PBS-BSA y se lavaron con PBS. Luego las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 2 hs con una dilución 1:100 del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a FITC en PBS-BSA. Posteriormente se realizaron lavados sucesivos con PBS (tres lavados durante 5 min, cuatro lavados durante 15 min y tres lavados durante 5 min). Luego se incubó en glicerol 50 % en PBS durante 5 min y en glicerol 80 % en PBS durante 5 min; se montaron en *Citifluor* y se observaron mediante microscopía confocal.

Como control de este protocolo se realizaron la inmunofluorescencia y el *FISH* por separado para verificar que no existiera interferencia entre ellos.

6.5.7 Obtención de imágenes y visualización de la interacción hospedero- microorganismo:

Para realizar los estudios de la interacción entre el hospedero y *P. larvae* se utilizó un microscopio confocal con los láseres: Argón (488 nm), Helio – Neón (543 nm) y Helio – Neón (633 nm). La utilización de este microscopio permitió visualizar en simultáneo: la expresión de enolasa o metaloproteasa, las células de la abeja y a *P. larvae* respectivamente. El programa *Fluoview* nos permitió superponer las imágenes tomadas con los distintos láseres y así evaluar la localización de cada componente estudiado.

7. Resultados:

7.1 Obtención de esporas

Para evaluar la presencia de células vegetativas o de esporas en las distintas suspensiones realizadas se tomaron alícuotas de las mismas, se tiñeron con DAPI y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia.

Al analizar los preparados realizados se pudo observar en el ensayo realizado con ADE muchas células muy largas y un bajo número de esporas (Figura 4A); en el ensayo realizado con PBS (desde ahora suspensión de esporas B) se observaron pocas células vegetativas y un gran número de esporas (Figura 4B). En los ensayos realizados a partir del protocolo de Genersch (2005) modificado, se observó que el cultivo J/BHI contenía muchas células vegetativas y pocas esporas (Figura 4C); y en el preparado realizado a partir del cultivo en J/J se observó que contenía un bajo número de esporas (Figura 4D).

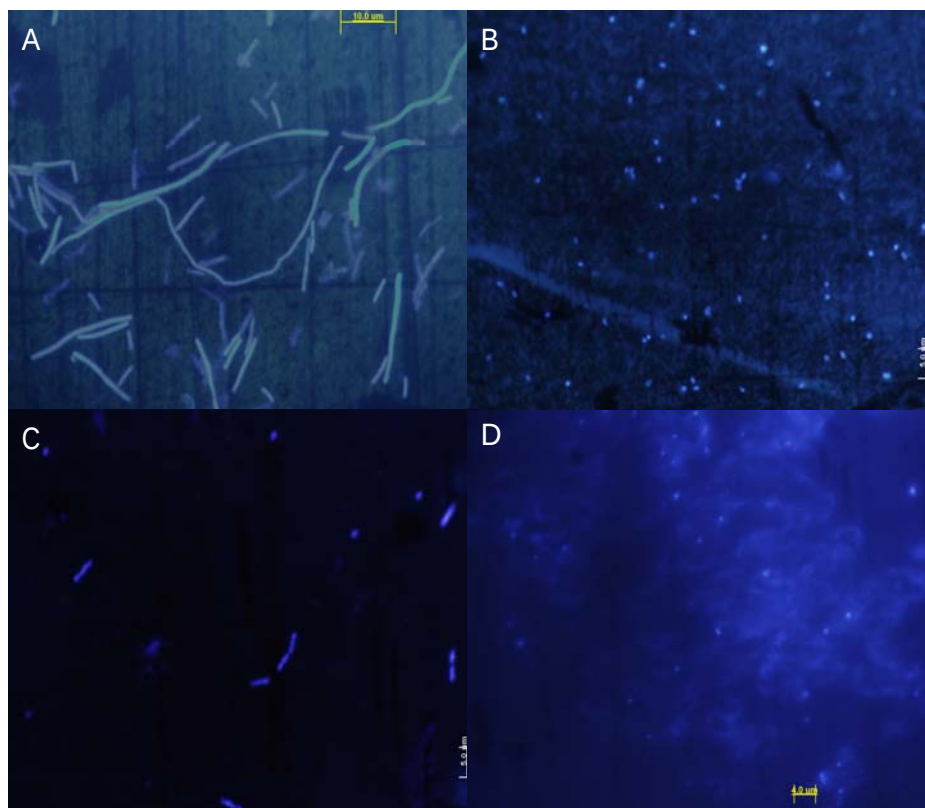


Figura 4.-Tinción con DAPI de las suspensiones de esporas de *P. larvae* realizadas. Imágenes tomadas a 100x. A.- Ensayo con ADE, B.- Ensayo con PBS, C.- Protocolo de Genersch *et al.* (2005) modificado J-BHI, D.- Protocolo de Genersch *et al.* (2005) modificado J-J.

7.2 Cuantificación de esporas de *P. larvae*

La suspensión de esporas B fue la que mostró mayor cantidad de esporas, por ello fue la elegida para realizar los ensayos posteriores. El número de esporas estimado en dicha suspensión fue de 9.66×10^4 esp/ μ l.

7.3 Cría e infección de larvas en el laboratorio

7.3.1 Cría de larvas:

Se seleccionaron larvas en el primer estadio de desarrollo (Día 1) y la cría de las mismas se realizó en el laboratorio. El ensayo se realizó exitosamente obteniendo larvas sanas del quinto estadio (Día 6). El tamaño y el aspecto de las larvas coincidieron con lo descrito para esta etapa del desarrollo larval (Figura 5).

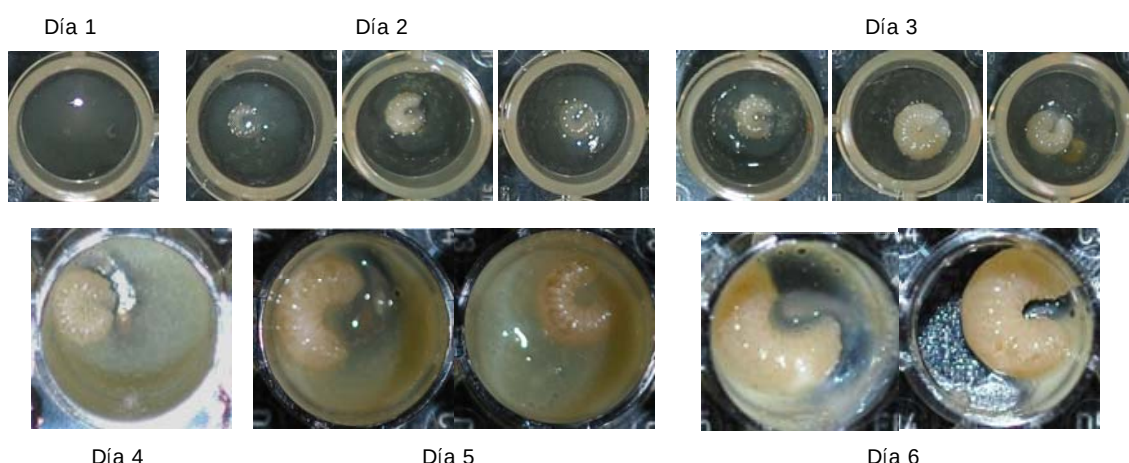


Figura 5.- Desarrollo larval de *A. mellifera* en condiciones controladas de laboratorio dentro de placas de microtitulación.

7.3.2 Infección de larvas:

Para determinar la concentración óptima de esporas a utilizar en los ensayos de infección, se prepararon diluciones de la suspensión de esporas B en el alimento larval (100, 500 y 1000 esp/ μ l de alimento) y dicho alimento se suministró a las larvas en el primer estadio de desarrollo. El proceso de infección se realizó de forma exitosa y cada día se separaron las larvas muertas de las larvas con aspecto normal (Figura 6).

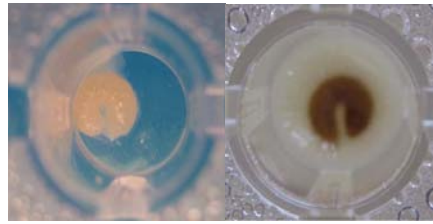


Figura 6.- Larvas de *A. mellifera* criadas *in vitro*. Izquierda larva sana; derecha larva muerta.

Utilizando dicho protocolo se observa a los 6 días de desarrollo una mortalidad acumulada de 6% para las larvas control, 12 % para las larvas que recibieron 100 esp/ul, 24 % para las que recibieron 500 esp/ul y 44 % para las larvas que recibieron 1000 esp/ul (Figura 7).

Con estos resultados se decidió utilizar para los ensayos de infección de larvas una concentración de esporas de 1000 esp/ul de alimento.

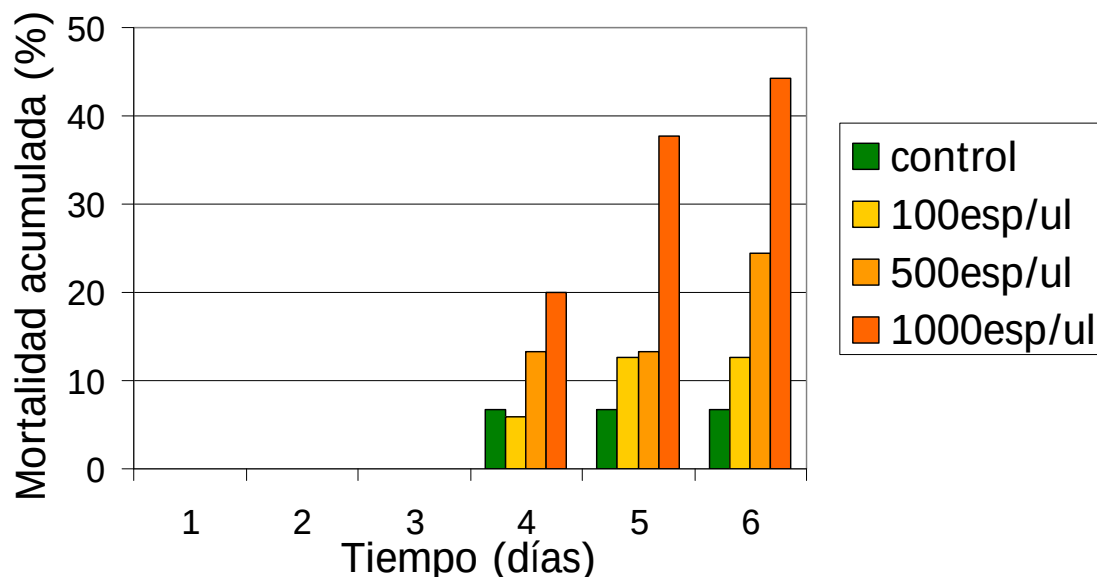


Figura 7.- Mortalidad acumulada de las larvas de *A. mellifera* infectadas en forma oral con esporas de *P. larvae* 44. Las dosis utilizadas para la infección fueron de 100, 500 y 1000 esp/ul de alimento larval.

7.3.3 PCR:

Con el fin de adquirir práctica en la técnica de PCR y confirmar la presencia de *P. larvae* en las larvas que habían muerto durante la infección *in vitro*, se realizó la extracción de ADN y se amplificó un fragmento específico del gen de ARNr 16S de *P. larvae* utilizando los cebadores PI4 y PI5. En las larvas infectadas se logró obtener el fragmento de 700 pb esperado, confirmando la presencia de *P. larvae* mientras que en las larvas no infectadas (control negativo) no se obtuvo banda (Figura 8).

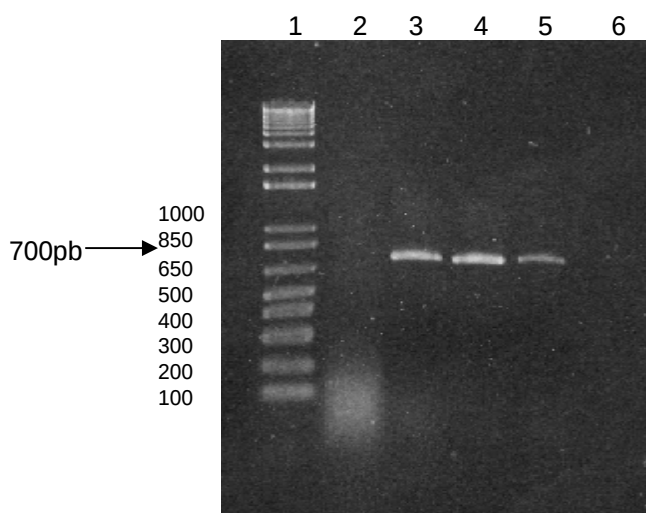


Figura 8.- Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos al amplificar un fragmento del gen ARN 16S de *P. larvae* a partir de larvas infectadas *in vitro*. El fragmento amplificado se estimó en 700 pb. Carril 1, MPM (1 Kb Plus); 2, larva control (sin infectar); 3, control positivo (larva muerta por Loque Americana); 4 y 5, larva infectada *in vitro*; 6, control negativo.

7.4 Obtención de cortes de larvas

7.4.1 Preparación de la muestra y corte con el crióstato:

Con el fin de proteger los tejidos larvales para su posterior corte en el crióstato se ensayaron distintas metodologías: fijación de las larvas enteras con PFA, deshidratación de las larvas enteras con un tratamiento seriado en alcohol y posterior fijación con PFA o extracción de los intestinos de las larvas y fijación con PFA. Posteriormente todas las muestras se incubaron en solución de sacarosa 20 % en PBS con el fin de crioprotegerlas.

Ninguno de los tratamientos que se utilizaron para crioproteger las larvas funcionó ya que al cortarlas en el crióstato o al intentar montarlas en los portaobjetos se perdía la integridad de los tejidos.

7.4.2 Preparación del bloque de albúmina-gelatina y corte con el vibrátomo:

Las larvas se sacrificaron, se fijaron con PFA, se embebieron en una matriz de albúmina-gelatina y posteriormente se seccionaron. Tanto la fijación como la matriz permitieron mantener la integridad de los tejidos larvales mientras los bloques se cortaban en el vibrátomo y se consiguió obtener cortes de las larvas para su posterior utilización.

7.5 Interacción hospedero-microorganismo

7.5.1 Inmunofluorescencia sobre células vegetativas y esporas de *P. larvae*:

Se realizó inmunofluorescencia sobre muestras de células vegetativas y esporas de *P. larvae* para analizar si la enolasa y la metaloproteasa se encuentran dentro de las células, forman parte de la superficie celular o son secretadas al medio. Para esto se utilizaron anticuerpos policlonales de ratón generados contra estas proteínas y anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados a FITC.

En los primeros ensayos de inmunofluorescencia que se realizaron sobre la suspensión de células vegetativas o esporas no se consiguió distinguir células individuales (no se muestra resultado), porque el *background* resultó muy fuerte, probablemente debido a la presencia de enolasa o metaloproteasa secretada al medio extracelular. Por este motivo, se decidió lavar varias veces las suspensiones antes de realizar la fijación. De esta forma sí se pudo observar que en las células vegetativas la enolasa y la metaloproteasa se encuentran dentro de las células así como en la superficie (Figura 9). En cambio en las esporas tanto la enolasa como la metaloproteasa se encuentran únicamente en la superficie celular (Figura 10). Cuando no se le agregó anticuerpo secundario a las muestras (control negativo) no se obtuvo señal (no se muestra resultado).

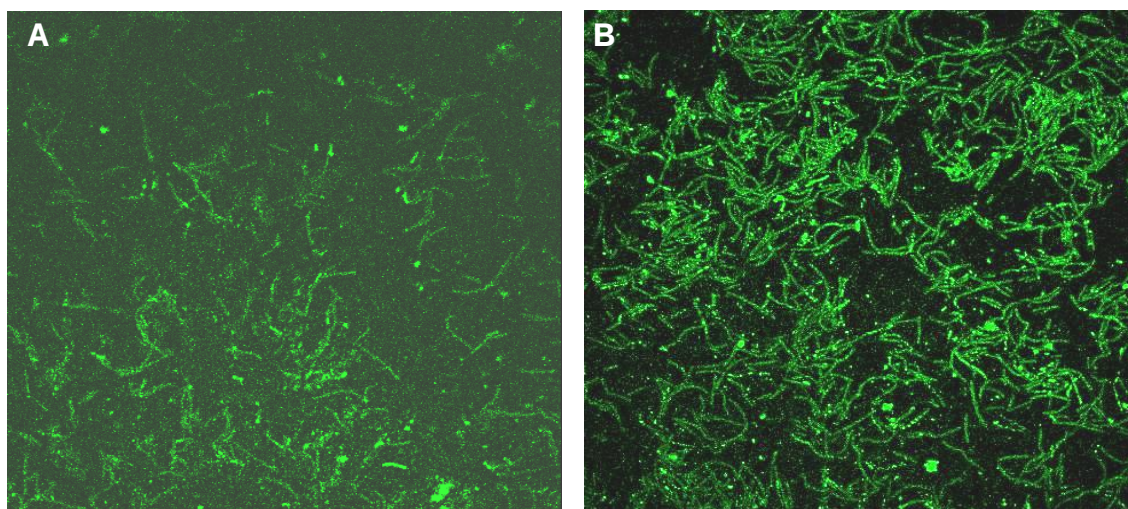


Figura 9.- Inmunofluorescencia sobre células vegetativas de *P. larvae* 100X.

A.- Expresión de la enolasa por células vegetativas, empleando suero policlonal anti-enolasa y un anticuerpo secundario conjugado con FITC.

B.- Expresión de la metaloproteasa por células vegetativas, empleando suero policlonal anti-metaloproteasa y un anticuerpo secundario conjugado con FITC.

Imágenes tomadas empleando el láser 488 nm.

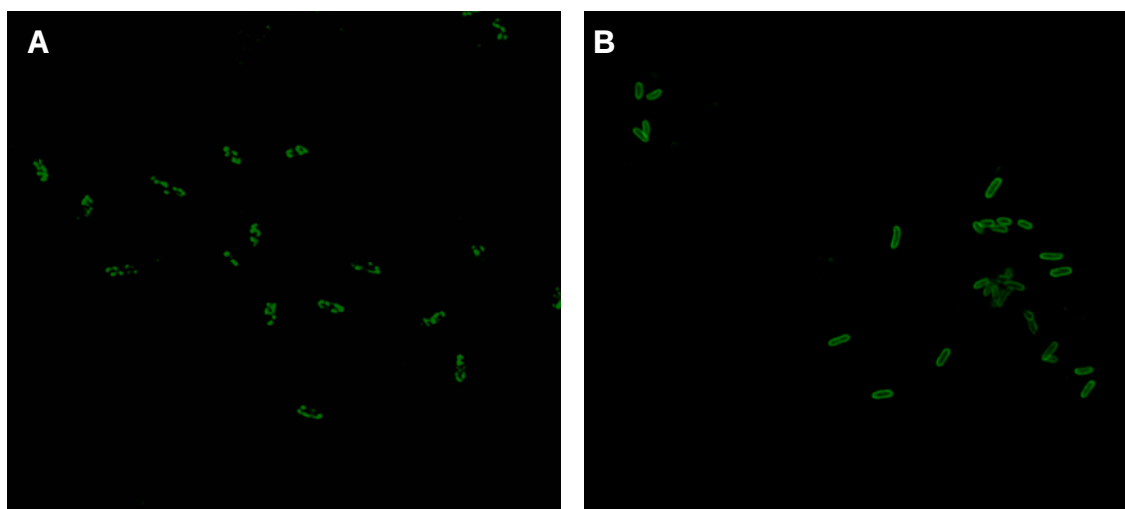


Figura 10.- Inmunofluorescencia sobre esporas de *P. larvae* 100 x (zoom 2x).

A.- Expresión de la enolasa por esporas, empleando suero policlonal anti-enolasa y un anticuerpo secundario conjugado con FITC.

B.- Expresión de la metaloproteasa por esporas, empleando suero policlonal anti-metaloproteasa y un anticuerpo secundario conjugado con FITC.

Imágenes tomadas empleando el láser 488 nm.

7.5.2 Inmunofluorescencia y FISH sobre células vegetativas y esporas de *P. larvae*:

Al análisis de inmunofluorescencia presentado en el punto anterior se le sumó el de *FISH* para co-localizar las células y de esa forma confirmar la presencia de *P. larvae*.

Este análisis conjunto de inmunofluorescencia y *FISH* se realizó empleando anticuerpos policlonales de ratón generados contra la enolasa y la metaloproteasa, anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados a FITC y la sonda PL16S.

En las muestras de esporas, se observó la enolasa y la metaloproteasa en la superficie celular (empleando el láser de Argón; 488nm), pero no se pudieron observar ribosomas activos (empleando el láser de Helio – Neón; 633 nm; no se muestra resultado). Esto se debe a que las esporas son estructuras de resistencia en las que la actividad metabólica es nula o muy reducida.

En las Figuras 11 y 12 se pueden observar la presencia de enolasa y metaloproteasa en las células vegetativas de *P. larvae* (empleando el láser de Argón; 488 nm), y los ribosomas activos (empleando el láser de Helio – Neón; 633 nm).

En los controles negativos de este ensayo no se observó señal (no se muestra resultado).

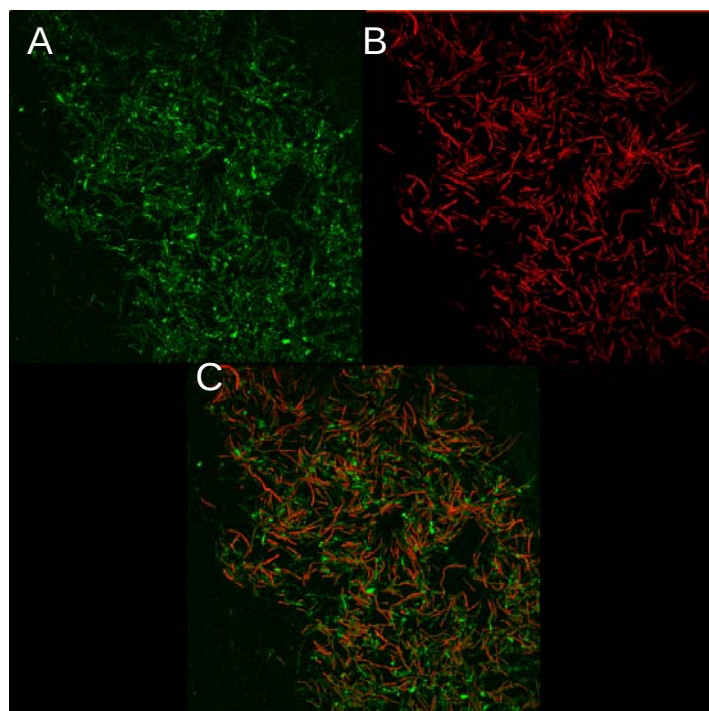


Figura 11.- Expresión de la enolasa por células vegetativas de *P. larvae*.

A.- Inmunofluorescencia sobre células vegetativas, empleando suero policlonal anti-enolasa y un anticuerpo secundario conjugado con FITC. Imagen tomada empleando el láser 488 nm.

B.- FISH sobre células vegetativas, empleando una sonda específica para *P. larvae* conjugada con CY5. Imagen tomada empleando el láser 633 nm.

C.- Superposición de ambas imágenes.

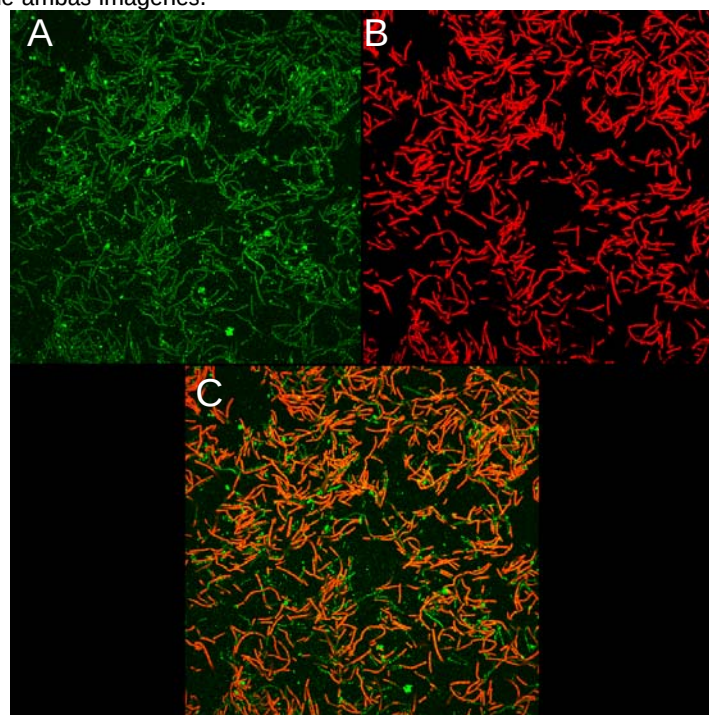


Figura 12.- Expresión de la metaloproteasa por células vegetativas de *P. larvae*.

A.- Inmunofluorescencia sobre células vegetativas, empleando suero policlonal anti-metaloproteasa y un anticuerpo secundario conjugado con FITC. Imagen tomada empleando el láser 488 nm.

B.- FISH sobre células vegetativas, empleando una sonda específica para *P. larvae* conjugada con CY5. Imagen tomada empleando el láser 633 nm.

C.- Superposición de ambas imágenes.

7.5.3 Protocolo de FISH e inmunofluorescencia sobre cortes de larvas:

Se realizó inmunofluorescencia empleando suero anti-enolasa o anti-metaloproteasa y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (conjugado a FITC) sobre los cortes de las larvas obtenidos, posteriormente se realizó *FISH* sobre los mismos preparados, empleando una sonda específica para el ARNr de eucariotas conjugada con CY3 (EUK516), para observar los tejidos larvales.

La tinción de las células de la larva con la sonda EUK516 nos permitió identificar claramente las células del intestino larval. En las Figuras 13A y 14A se observa la expresión de la enolasa y la metaloproteasa de *P. larvae* respectivamente, mientras que no se detectó señal en las larvas no infectadas (Figura 13B y 14B).

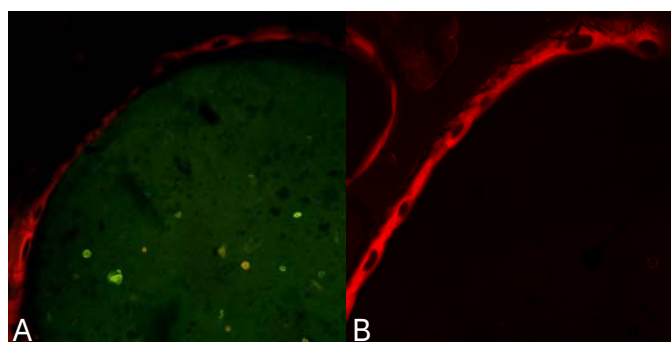


Figura 13.- Expresión de la enolasa de *P. larvae in vivo* durante la infección de larvas. Se aplicaron las técnicas de Inmunofluorescencia (empleando suero policlonal anti-enolasa y un anticuerpo secundario conjugado con FITC) y FISH (empleando una sonda específica para eucariotas conjugada con CY3) sobre cortes transversales de larvas. En ambos casos se muestra la superposición de imágenes tomadas con los láseres 488 nm y 543 nm.

Imágenes tomadas con aumento 20 x.

A.- Larva infectada con *P. larvae*.

B.- Larva no infectada (control).

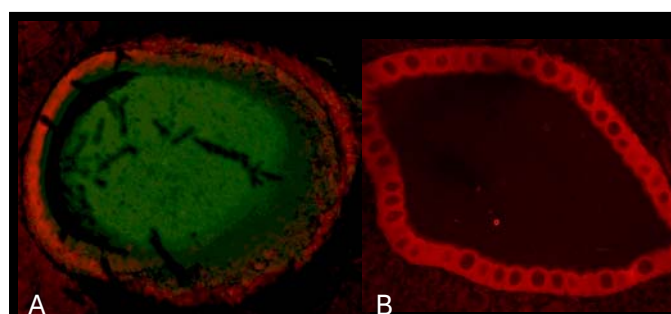


Figura 14.- Expresión de la metaloproteasa de *P. larvae in vivo* durante la infección de larvas. Se aplicaron las técnicas de Inmunofluorescencia (empleando suero policlonal anti-metaloproteasa y un anticuerpo secundario conjugado con FITC) y FISH (empleando una sonda específica para eucariotas conjugada con CY3) sobre cortes transversales de larvas. En ambos casos se muestra la superposición de imágenes tomadas con los láseres 488 nm y 543 nm. Imágenes tomadas con aumento 20 x.

A.- Larva infectada con *P. larvae*.

B.- Larva no infectada (control).

8. Discusión:

Las abejas melíferas (*A. mellifera*) son valiosas porque se pueden comercializar los diversos productos derivados de las colmenas y porque cumplen un rol muy importante en la polinización tanto de cultivos agrícolas como de especies silvestres (Mendoza *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2009b; Simó, 2002). Como se describió anteriormente la enfermedad de origen bacteriano más severa y destructiva que afecta a la cría de las abejas melíferas es la Loque Americana, producida por el bacilo gram positivo *P. larvae* (Genersch *et al.*, 2006; Hansen & Brodsgaard, 1999).

En el presente trabajo se estudió el mecanismo de interacción hospedero-patógeno entre las larvas de *A. mellifera* y *P. larvae* evaluando especialmente la producción de dos potenciales factores de virulencia por parte de *P. larvae*, la enolasa y la metaloproteasa.

En primer lugar se utilizaron diferentes metodologías para obtener suspensiones de esporas de *P. larvae*, utilizando el aislamiento 44, un aislamiento que ha sido ampliamente estudiado y caracterizado en nuestro laboratorio. Mediante microscopía de epifluorescencia se analizaron las diferentes suspensiones obtenidas y se observó que la suspensión que presentó un mayor número de esporas fue la realizada mediante la suspensión de colonias de *P. larvae* en PBS y la posterior incubación a 4° C durante 30 días, presentando una alternativa para la obtención de esporas propuesta por Genersh *et al.* (2005).

Debido al carácter altamente infeccioso de la Loque Americana no fue posible realizar infecciones experimentales en el campo. Por este motivo se puso a punto un modelo de cría de larvas de abejas melíferas en el laboratorio. Los resultados de este ensayo fueron exitosos y coincidieron con lo reportado previamente por Evans (2004), ya que las larvas alcanzaron un desarrollo normal hasta los 6 días de vida. Posteriormente este protocolo fue utilizado para reproducir *in vitro* la infección: para ello se utilizó la suspensión de esporas mencionada anteriormente en una concentración de 1000 esp/μl de alimento, dado que esta concentración resultó cercana a la dosis letal 50.

Con el fin de analizar que es lo que sucede *in vivo* cuando se infectan larvas de *A. mellifera*, se tomaron un grupo de larvas infectadas, un grupo control y ambos se sometieron a distintos tratamientos de preparación para la obtención de cortes histológicos. En este trabajo se demostró que de las distintas metodologías de procesamiento ensayadas, la más efectiva es la fijación de las larvas inyectando PFA en el intestino, la incubación en PFA durante toda la noche y la posterior inclusión de las larvas en bloques de albúmina – gelatina.

La enolasa forma parte tanto del catabolismo (glucólisis) como del anabolismo (gluconeogénesis) celular (Nelson & Cox, 1995; Pancholi, 2001; Pancholi & Fischetti, 1998). Su rol en el metabolismo es esencial, pero también se ha detectado en la superficie celular de varios microorganismos patógenos, incluyendo *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutants* y *Mycoplasma fermentans*. En todos ellos, esta proteína cumple la función de unir el plasminógeno del hospedero permitiéndole a la bacteria adquirir actividad proteolítica asociada a la superficie celular, lo que facilita la invasión de los tejidos y la diseminación en el hospedero (Bergmann *et al.*, 2001; Ge *et al.*, 2004; Walz *et al.*, 2007; Yavlovich *et al.*, 2007). En el ensayo conjunto de inmunofluorescencia y *FISH* sobre las diferentes muestras se pudo observar que la enolasa está distribuida de manera uniforme en las células vegetativas y es un componente de la pared en las esporas de *P. larvae*. La presencia de esta proteína en la superficie de células vegetativas, esporas e incluso siendo secretada por *P. larvae*, sumado a que se ha descrito la existencia de proteínas similares a la plasmina en insectos (Hahn *et al.*, 2001), permite suponer que la enolasa podría tener el mismo rol que en otras bacterias patógenas (Delvecchio *et al.*, 2006; Lamonica *et al.*, 2005; Liu & Shih, 2007; Sha *et al.*, 2009) , esto quiere decir, que además de participar en el metabolismo, podría ser capaz de unir plasminógeno en la superficie celular para activar el sistema fibrinolítico de las larvas y de esta manera invadir los tejidos profundos y llegar a la hemolinfa.

Otro de los factores de los potenciales factores de virulencia estudiados fue una metaloproteasa. Se ha observado la presencia de este tipo de proteínas

en el exoesporium de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* (Charlton *et al.*, 1999) y en la pared celular de *Streptococcus pneumoniae*, en estos patógenos, la metaloproteasa les permite adherirse al hospedero, evadir el sistema inmune e incluso hidrolizar proteínas antibacterianas de insectos (Dalhammar & Steiner, 1984; Ramarao & Lereclus, 2005) o humanos (Bergmann & Hammerschmidt, 2006). Mediante los ensayos de inmunofluorescencia y *FISH*, se observó que en *P. larvae* la metaloproteasa se encuentra de manera uniforme y es muy abundante en las células vegetativas, así como en la superficie de las esporas. Los resultados obtenidos por microscopía confocal también coinciden con los estudios de inhibición realizados por Dancer & Chantawannakul (1997), Hrabák & Martínek (2007) y Antúnez *et al.* (2009a), en los que se demostró que la metaloproteasa es secretada por *P. larvae*. Esta propiedad de secretar metaloproteasa ha sido descrita en otros microorganismos patógenos como *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *Haemophilus paragallinarum*, *Photorhabdus luminescens* y *Vibrio vulnificus*, donde participa en la degradación de componentes extracelulares (Hase & Finkelstein, 1993; Held *et al.*, 2007; Miyoshi *et al.*, 1998; Rivero-Garcia *et al.*, 2005). La presencia de esta enzima en la superficie de células vegetativas y esporas de *P. larvae*, refuerza la idea propuesta por Dancer & Chantawannakul, (1997) de que la metaloproteasa es un factor de virulencia en *P. larvae* y que facilita la invasión de los tejidos por parte de esta bacteria.

Las imágenes tomadas por microscopía confocal de los cortes de larvas infectadas muestran que existe expresión por parte de *P. larvae* de enolasa y metaloproteasa en el intestino de las larvas infectadas, mientras que en las larvas no infectadas no se observó. Estos resultados confirman la expresión *in vivo* de la enolasa y de la metaloproteasa durante la infección de *P. larvae* en el intestino de larvas de *A. mellifera*.

9. Conclusiones y perspectivas:

En resumen, en este trabajo se pudo demostrar utilizando el ensayo conjunto de inmunofluorescencia (Gu *et al.*, 2005) y *FISH* (Yue *et al.*, 2008) que tanto *in vivo* como *in vitro*, la enolasa y la metaloproteasa son expresadas de forma abundante, están distribuidas en toda la célula, son secretadas al medio extracelular y forman parte de la superficie de las esporas de *P. larvae*. Esto les permitiría degradar o modificar las uniones intercelulares de las paredes del intestino, para de esta forma penetrar hasta la hemolinfa.

Por otro lado, el contar con un modelo de cría de larvas de *A. mellifera* en el laboratorio permitirá continuar con el estudio de los mecanismos de patogenicidad de *P. larvae* o de otros patógenos que atacan a las abejas. También se podrán ensayar diversas estrategias de tratamiento y control en condiciones controladas de laboratorio, que eventualmente podrán ser ensayadas en campo.

10. Bibliografía:

- Agarwal, S., Kulshreshtha, P., Bambah Mukku, D., Bhatnagar, R., 2008, Alpha-Enolase binds to human plasminogen on the surface of *Bacillus anthracis*. *Biochim Biophys Acta* 1784, 986-994.
- Alippi, A.M., 1992, Characterization of *Bacillus larvae* White, the causative agent of American foulbrood of honey-bees. First record of its occurrence in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 24, 67-72.
- Alippi, A.M., 1996, Characterization of isolates of *Paenibacillus larvae* with biochemical type and oxytetracycline resistance. *Revista Argentina de Microbiología* 28, 197-203.
- Alippi, A.M., Aguilar, O.M., 1998, Unique DNA fingerprint patterns of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* strains. *Journal of Apicultural Research* 37, 273-280.
- Amann, R.L., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A., 1990, Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 56, 1919-1925.
- Antúnez, K., 2006. Loque Americana en Uruguay: Caracterización, distribución y prevalencia de aislamientos de *Paenibacillus larvae*. Tesis de Maestría.
- Antúnez, K., Anido, M., Evans, J.D., Zunino, P., 2010, Secreted and immunogenic proteins produced by the honeybee bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Vet Microbiol* 141, 385-389.
- Antúnez, K., Anido, M., Schlapp, G., Evans, J.D., Zunino, P., 2009a, Characterization of secreted proteases of *Paenibacillus larvae*, potential virulence factors involved in honeybee larval infection. *J Invertebr Pathol* 102, 129-132.
- Antúnez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E., Ramallo, G., Zunino, P., 2006, Honeybee viruses in Uruguay. *J Invertebr Pathol* 93, 67-70.
- Antúnez, K., D'Alessandro, B., Piccini, C., Corbella, E., Zunino, P., 2004, *Paenibacillus larvae larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey. *Journal of Invertebrate Pathology* 86, 56-58.
- Antúnez, K., Harriet, J., Gende, L., Maggi, M., Eguaras, M., Zunino, P., 2008, Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood. *Vet Microbiol* 131, 324-331.
- Antúnez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Zunino, P., Meana, A., Higes, M., 2009b, Immune-suppressive effect of infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia) in the honeybee (*Apis mellifera*) host. *Environmental Microbiology* 11, 2284 - 2290.
- 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.
- Bailey, L., Lee, D.C., 1962, *Bacillus larvae*: its Cultivation in vitro and its Growth in vivo. *Journal of general Microbiology* 29, 711-717.
- Beekeeping.cl, <http://www.beekeeping.cl/news.php?newsid=83>.

- Bergmann, S., Hammerschmidt, S., 2006, Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology* 152, 295-303.
- Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G.S., Hammerschmidt, S., 2001, Alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Molecular Microbiology* 40, 1273-1287.
- Brodsgaard, C., Ritter, W., Hansen, H., 1998, Response of in vitro reared honey bee larvae to various doses of *Paenibacillus larvae larvae* spores. *Apidologie* 29, 569-578
- Caldas, C., Cherqui, A., Pereira, A., Simoes, N., 2002, Purification and characterization of an extracellular protease from *Xenorhabdus nematophila* involved in insect immunosuppression. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1297-1304. .
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., Tempst, P., 1989, Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J* 8, 2387-2391.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2009, The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 37.
- Crailsheim, K., Riessberger-Gallé, U., 2001, Honey bee age - dependent resistance against American Foulbrood. *Apidologie* 32.
- Charlton, S., Moir, A.J., Baillie, L., Moir, A., 1999, Characterization of the exosporium of *Bacillus cereus*. *J Appl Microbiol* 87, 241-245.
- Dalhammar, G., Steiner, H., 1984, Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects. *Eur J Biochem* 139, 247-252.
- Dancer, B.N., Chantawannakul, P., 1997, The Proteases of American Foulbrood Scales. *Journal of Invertebrate Pathology* 70, 79-87.
- Davidson, E.W., 1973, Ultrastructure of American foulbrood disease pathogenesis in larvae of the worker honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* 21, 53-61.
- De Graaf, D.C., Vandekerchove, D., Dobbelaere, W., Peeters, J.E., Jacobs, F.J., 2001, Influence of the proximity of American foulbrood cases and apicultural management on the prevalence of *Paenibacillus larvae* spores in Belgian honey. *Apidologie* 32, 587-599.
- Delvecchio, V.G., Connolly, J.P., Alefantis, T.G., Walz, A., Quan, M.A., Patra, G., Ashton, J.M., Whittington, J.T., Chafin, R.D., Liang, X., Grewal, P., Khan, A.S., Mujer, C.V., 2006, Proteomic profiling and identification of immunodominant spore antigens of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 6355-6363.
- Díaz, R., 2010, Rastreabilidad en la cadena agroalimentaria de la miel: la experiencia de Uruguay. Congreso Nacional de Apicultura. Sarandí Grande, Uruguay.
- Dobbelaere, W., De Graaf, D.C., Reybroeck, W., Desmedt, E., Peeters, J.E., Jacobs, F.J., 2001, Disinfection of wooden structures contaminated

- with *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores. Journal of Applied Microbiology 91, 212-216.
- Errea, E., Licandro, H., 2009, Apicultura: situación y perspectivas. Anuario OPYPA, 113-118.
- Esgleas, M., Li, Y., Hancock, M.A., Harel, J., Dubreuil, J.D., Gottschalk, M., 2008, Isolation and characterization of alpha-enolase, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus suis*. Microbiology 154, 2668-2679.
- 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 responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. Journal of Invertebrate Pathology 85, 105-111.
- Evans, J.D., Weaver, D.B., 2003, Beenome soon: Honey bees as a model 'non-model' system for comparative genomics. Comparative and Functional Genomics 4, 351-352.
- Ge, J., Catt, D.M., Gregory, R.L., 2004, *Streptococcus mutans* surface Alpha-enolase binds salivary mucin MG2 and human plasminogen. Infect Immun 72, 6748-6752.
- Genersch, E., Ashiralieva, A., Fries, I., 2005, Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees. Applied and Environmental Microbiology 71, 7551-7555.
- Genersch, E., Forsgren, E., Pentikainen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J., Fries, I., 2006, Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. Int J Syst Evol Microbiol 56, 501-511.
- Goodwin, R.M., Perry, J.H., Ten Houten, A., 1994, The effect of drifting honey bees on the spread of American foulbrood infections. Journal of Apicultural Research 33, 209-212.
- 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.
- Gu, F., Lux, R., Du-Thumm, L., Stokes, I., Kreth, J., Anderson, M.H., Wong, D.T., Wolinsky, L., Sullivan, R., Shi, W., 2005, In situ and non-invasive detection of specific bacterial species in oral biofilms using fluorescently labeled monoclonal antibodies. Journal of Microbiological Methods 62, 145 - 160.
- Guillemet, E., Cadot, C., Tran, S.L., Guinebretiere, M.H., Lereclus, D., Ramarao, N., 2010, The InhA metalloproteases of *Bacillus cereus* contribute concomitantly to virulence. Journal of Bacteriology 192, 286-294.
- Hahn, B.S., Cho, S.Y., Ahn, M.Y., Kim, Y.S., 2001, Purification and characterization of a plasmin-like protease from *Tenodera sinensis*

- (Chinese mantis). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 573-581.
- Hansen, H., Brodsgaard, C.J., 1999, American foulbrood: A review of its biology, diagnosis and control. *Bee World* 80, 5-23.
- Hase, C.C., Finkelstein, R.A., 1993, Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. *Microbiol Rev* 57, 823-837.
- Held, K.G., LaRock, C.N., D'Argenio, D.A., Berg, C.A., Collins, C.M., 2007, A metalloprotease secreted by the insect pathogen *Photobacterium luminescens* induces melanization. *Appl Environ Microbiol* 73, 7622-7628.
- 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. *Journal of Bacteriology* 40, 723-731.
- Hornitzky, M.A.Z., 1998, The pathogenicity of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores and vegetative cells to honey bee (*Apis mellifera*) colonies and their susceptibility to royal jelly. *Journal of Apicultural Research* 37, 267-271.
- Hornitzky, M.A.Z., Karlovskis, S., 1989, A culture technique for the detection of *Bacillus larvae* in honey bees. *Journal of Apicultural Research* 28, 118-120.
- Hornitzky, M.A.Z., Nicholls, P.J., 1993, J medium is superior to Sheep Blood Agar and Brain Heart Infusion for the isolation of *Bacillus larvae* from honey samples. *Journal of Apicultural Research* 32, 51-52.
- Hrabak, J., Martinek, K., 2007, Screening of secreted proteases of *Paenibacillus larvae* by using substrate-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Apicultural Research* 46, 160-164.
- JUNAGRA, 2009a, Sistema nacional de trazabilidad de la miel mejora producción apícola
<http://www.mgap.gub.uy/DirecciondeLaGranja/Novedades/NotasdePrensa/Sistema%20Nacional%20de%20Trazabilidad%20de%20la%20Miel%20mejora%20producci%C3%B3n%20ap%C3%ADcola.pdf>.
- JUNAGRA, 2009b, Descripción general de la apicultura.
http://www.mgap.gub.uy/DirecciondeLaGranja/Boletines/AnimalesdeGranja/BGranja16_2009.pdf.
- Lamonica, J.M., Wagner, M., Eschenbrenner, M., Williams, L.E., Miller, T.L., Patra, G., DelVecchio, V.G., 2005, Comparative secretome analyses of three *Bacillus anthracis* strains with variant plasmid contents. *Infection and Immunity* 73, 3646-3658.
- Lindström, A., Korpela, S., Fries, I., 2008, Horizontal transmission of *Paenibacillus larvae* spores between honey bee (*Apis mellifera*) colonies through robbing. *Apidologie* 39, 515-522.
- Liu, K.-J., Shih, N.-Y., 2007, The Role of Enolase in Tissue Invasion and Metastasis of Pathogens and Tumor Cells. *Journal of Cancer Molecules* 3, 45-48.
- Liu, L., Ma, M., Cai, Z., Yang, X., W., W., 2010, Purification and Properties of a Collagenolytic Protease Produced by *Bacillus cereus* MBL13 Strain. *Food Technology and Biotechnology* 48, 151-160.

- Mendoza, Y., Santos, E., Rodríguez, V., 2010, ¿Es factible realizar apicultura en cultivos de soja? Congreso Nacional de Apicultura. Sarandí Grande, Uruguay.
- 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.
- Miyoshi, S., Nakazawa, H., Kawata, K., Tomochika, K., Tobe, K., Shinoda, S., 1998, Characterization of the hemorrhagic reaction caused by *Vibrio vulnificus* metalloprotease, a member of the thermolysin family. *Infect Immun* 66, 4851-4855.
- Miyoshi, S., Shinoda, S., 2000, Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect* 2, 91-98.
- Mo, Z., Guo, D., Mao, Y., Ye, X., Zou, Y., Xiao, P., Hao, B., 2010, Identification and characterization of the *Vibrio anguillarum* prtV gene encoding a new metalloprotease *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 28, 55-61.
- Morse, R.A., Flottum, K. 1997. Honey Bee Pests Predators and Diseases (Medina, Ohio, A.I. Root Co.), 718.
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 1995, Lehninger : Principios de bioquímica, cuarta Edition. Omega.
- Norqvist, A., Norrman, B., Wolf-Watz, H., 1990, Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect Immun* 58, 3731-3736.
- OIE, 2004, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/A_00121.htm.
- Pancholi, V., 2001, Multifunctional Alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci* 58, 902-920.
- Pancholi, V., Fischetti, V.A., 1998, Alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *Journal of Biological Chemistry* 273, 14503-14515.
- Piccini, C., D'Alessandro, B., Antunez, K., Zunino, P., 2002, Detection of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae* spores in naturally infected bee larvae and artificially contaminated honey by PCR. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18, 761-765.
- Piccini, C., Zunino, P., 2001, American foulbrood in Uruguay: isolation of *Paenibacillus larvae larvae* from larvae with clinical symptoms and adult honeybees and susceptibility to oxytetracycline. *J Invertebr Pathol* 78, 176-177.
- Qin, X., Evans, J.D., Aronstein, K.A., Murray, K.D., Weinstock, G.M., 2006, Genome sequences of the honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. *Insect Molecular Biology* 15, 715-718.
- Ramarao, N., Lereclus, D., 2005, The InhA1 metalloprotease allows spores of the *B. cereus* group to escape macrophages. *Cell Microbiol* 7, 1357-1364.
- Rivero-Garcia, P.C., Cruz, C.V., Alonso, P.S., Vaca, S., Negrete-Abascal, E., 2005, *Haemophilus paragallinarum* secretes metalloproteases. *Can J Microbiol* 51, 893-896.

- Santos, E., Invernizzi, C., García, E., Cabrera, C., Di Landro, R., Saadoun, A., Daners, G., 2009a, Contenido de proteína cruda del polen de las principales especies botánicas utilizadas por las abejas melíferas en Uruguay. *Agrociencia* **13**, 9-13.
- Santos, E., Martínez, A., 2010, Presencia de alcaloides pirrolizidínicos en mieles uruguayas. Congreso Nacional de Apicultura. Sarandí Grande, Uruguay.
- Santos, E., Mendoza, Y., Díaz, R., Harriet, J., Campá, J., 2009b, Valor económico de la polinización realizada por las abejas *Apis mellífera* en Uruguay, una aproximación. Serie de Actividades de Difusión, INIA 568, 25-28.
- Scavone, P., comunicación personal.
- Schmid-Hempel, P., 1998, Parasites in social insects. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Secades, P., Alvarez, B., Guijarro, J.A., 2003, Purification and properties of a new psychrophilic metalloprotease (Fpp2) in the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *FEMS Microbiology Letters* 226, 273-279.
- Sha, J., Erova, T.E., Alyea, R.A., Wang, S., Olano, J.P., Pancholi, V., Chopra, A.K., 2009, Surface-expressed enolase contributes to the pathogenesis of clinical isolate SSU of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of bacteriology* 191, 3095-3107.
- Simó, E., 2002, Las abejas de miel y la polinización. Método, 33.
- Stahly, D., 2002, Endospore Formation in *Paenibacillus larvae*. <http://www.microbelibrary.org/Bacteria/details.asp?id=359&Lang=%320>.
- Sturtevant, A.P., 1932, Relation of commercial honey to the spread of American Foulbrood. *Journal of Agricultural Research* 45.
- Thangam, E.B., Rajkumar, G.S., 2002, Purification and characterization of alkaline protease from *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnol Appl Biochem* 35, 149-154.
- Walz, A., Mujer, C.V., Connolly, J.P., Alefantis, T., Chafin, R., Dake, C., Whittington, J., Kumar, S.P., Khan, A.S., DelVecchio, V.G., 2007, *Bacillus anthracis* secretome time course under host-simulated conditions and identification of immunogenic proteins. *Proteome Sci* 5, 11.
- Wedenig, M., Riessberger-Galle, U., Crailsheim, K., 2003, A substance in honey bee larvae inhibits the growth of *Paenibacillus larvae larvae*. *Apidologie* 34, 43-51.
- White, G.F., 1906, The bacteria of the apiary, with special reference to bee diseases, Vol 14. U.S. Department of Agriculture, Washington D.C.
- Woodrow, A.W., 1942, Susceptibility of honeybee larvae to individual inoculations with spores of *Bacillus larvae*. *Journal of Economic Entomology* 35.
- Woodrow, A.W., Holst, E.C., 1942, The mechanism of colony resistance to American foulbrood. *Journal of Economic Entomology* 35, 327-330.
- Wooldridge, K., 2009, Bacterial secreted proteins: secretory mechanisms and role in pathogenesis. Caister Academic Press.

- Yavlovich, A., Rechnitzer, H., Rottem, S., 2007, Alpha-enolase resides on the cell surface of *Mycoplasma fermentans* and binds plasminogen. *Infect Immun* 75, 5716-5719.
- 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.