



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

CONTRIBUCION AL ESTUDIO VIRAL Y  
BACTERIOLOGICO EN ABEJAS  
CON PARALISIS

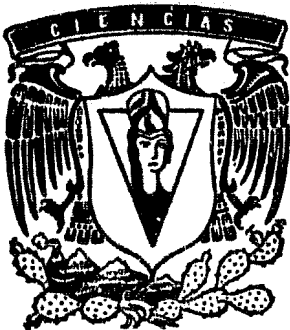
T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

MARIA EUGENIA MANJARREZ ZAVALA



México, D. F.

1984



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# C O N T E N I D O

## I. INTRODUCCION

## II. OBJETIVOS

## III. ANTECEDENTES

- a) RECONOCIMIENTO DE LA ENFERMEDAD
- b) SIGNOS DE LA ENFERMEDAD
- c) EPIDEMIOLOGIA
- d) CARACTERISTICAS DE LOS VIRUS
- e) INFECCIONES BACTERIANAS

## IV. METODOLOGIA

### CULTIVOS CELULARES

### INOCULACION DE EMBRIONES DE POLLO

### PRUEBAS BACTERIOLOGICAS

## V. RESULTADOS

## VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES

## VII BIBLIOGRAFIA

## I. INTRODUCCION

La producción de miel de abejas en el mundo en 1983 es de 600'000,000 Kg. México contribuye con el 9.9% del total, ocupando el cuarto lugar en la producción mundial. Exporta alrededor de 59'405,949 Kg. en lo que representa el 87% al alcanzando el primer lugar en exportación, ésto le reporta un ingreso de \$43'810,449.00 millones de pesos anuales. (Datos proporcionados por la Dirección General de Fomento Ganadero SAHR).

La producción de miel disminuye porque las abejas son afectadas por algunas enfermedades que ocasionan grandes pérdidas. Entre ellas, la parálisis viral en Apis mellifera fue reportada en México desde 1968 por Bailey (Morse, 1978). Esta infección se caracteriza por un temblor incontrolado y cambios en la coloración de las abejas, además pierden la capacidad de volar, presentan hinchazón del vientre y finalmente mueren.

Estas mismas alteraciones se presentan en abejas con otras infecciones bacterianas como las llamadas Loque Americana y Europea, estas son de las enfermedades más graves que atacan a las abejas y con frecuencia son confundidas con infección viral por los signos tan semejantes. Sin embargo, el control para la enfermedad viral es desconocido has-

ta el momento.

Considerando lo anterior es necesario ampliar la información biológica sobre las infecciones y encontrar una metodología que haga posible la identificación de virus o bacterias que causan parálisis en las abejas.

## II. OBJETIVOS

En virtud de que en México nunca se ha realizado un estudio para identificar los posibles virus causantes de la parálisis en abejas, los objetivos de éste estudio son:

- 1) Aislar el virus o microorganismos causantes de la parálisis en abejas que se puedan encontrar con signos de la enfermedad, utilizando cultivos celulares.
- 2) Comprobar la presencia de virus causantes de la parálisis de las abejas en México.

### III. ANTECEDENTES

#### a) Reconocimiento de la enfermedad.

De acuerdo con los datos proporcionados por Morison en 1936 (Morse, 1978) la partícula de abejas fué observada - desde 1914 por Huber, quien descubrió algunos signos presentes en abejas, que después se supo correspondían a la parálisis. Entre 1901 y 1905 se presentó en Italia una epizotia en abejas, posteriormente se descubrió que se - trataba de parálisis viral. En 1911 se observaron con ma - yor atención ciertos síntomas que impedían volar a las - abejas en el sur de Estados Unidos, Francia y Alemania. - En 1936 Morison realizó un estudio detallado sobre la pa - rálisis y concluyó que se trataba de un "Virus Filtrable" (Morse, 1978) este descubrimiento fué apoyado posterior - mente por Burside y Bitler (Taumonoff, 1951).

En 1963, Bailey, Gibbs y Wood al estudiar abejas con - parálisis encontraron partículas semejantes a las ya men - cionadas por Morison. Hicieron un estudio más detallado y encontraron tamaño y forma semejantes a las del virus - Sacbrood. Como las abejas morían al tercer día de haber contraído la infección, a esta enfermedad se le llamó "Vi - rus de la parálisis agudo de las abejas" (Morse, 1978).

En 1965, Lee y Furgala utilizando las técnicas de Bailey y asociados, para encontrar la forma y localización del virus, también observaron la presencia de otro virus productor de parálisis en las abejas, pero en períodos más largos, por lo que le llamaron "Virus de la parálisis crónico de las abejas", las partículas presentaron gran parecido a las encontradas por Bailey y asociados. La localización fue en el ganglio nervioso de las abejas adultas. Observaron, también partículas dispersas a través del citoplasma de las células localizadas en vesículas, pero no en tejido graso ni muscular.

En 1966, Lee y Furgala notaron que las abejas infectadas con el virus agudo morían a los cuatro días, con los síntomas del virus crónico, pero con la diferencia de que las partículas estaban ubicadas en el tejido graso y muscular. Infectaron larvas con virus Sacbrood, encontrando que se establecieron en pocos días en el tejido grado formando vesículas en abejas adultas pero no en larvas.

Entre 1968 y 1969, Bailey, Gibbs y Woods observaron signos de la enfermedad, encontrando semejanza con los causados por infección de ácaros (Morse, 1978). Aisla-



ron tres diferentes partículas, variantes en morfología, pero el desarrollo de la enfermedad fue similar. Posteriormente en 1972 Bailey y Fernando confirmaron lo expuesto por Lee y Furgala, observando que el virus Sacbrood se desarrolla en abejas jóvenes y puede persistir en adultas, pero no en larvas. En 1969, Bailey y Melne (Morse, 1978) realizaron la identificación serológica de la parálisis viral para poder diferenciar el tipo de virus presente en cada infección. En 1977, Smith en sus notas de virus de insectos hizo referencia al de las abejas y notó que las partículas del virus están cubiertas por una estructura granular y cristalina invisible al microscopio simple. También en 1977, Bailey describió otro virus encontrado en Australia, pero originario de otras regiones de Asia (Bailey, et. al., 1979).

En investigaciones posteriores Bailey y otros autores, 1981 aislaron varios tipos de virus presentes en abejas enfermas de parálisis, reconociendo catorce virus, algunos de éstos ya han sido aislados y se han realizado estudios sobre ellos, dando sus características y propiedades y hasta su forma de acción, de unos se sabe poco y de otros casi nada.

b) Signos de la enfermedad.

La parálisis ataca a todas las razas de abejas. - Aunque el ciclo de la infección no es del todo conocida en forma individual, se tiene una información general de los signos.

Las colonias atacadas disminuyen notablemente la población con gran variación de tiempo. Las abejas enfermas presentan cambios en su coloración pues se oscurecen, además mueven las antenas y su aguijón - con rapidez, pero no pueden volar, ni tomar una posición normal, ya que caen sobre el dorso. Sus miembros son atacados por un temblor característico, las mandíbulas son salientes, razón por la que no logran beber agua ni otros líquidos aunque manifiesten sed. Los movimientos respiratorios de su bajo vientre son variables y cesan con la detención de los movimientos de las alas y sus patas, su vientre se hincha en forma anormal. Morison en 1936, observó que la hinchazón va acompañada de un contenido descolorido del recto, y mencionó que tanto la parte de su bajo vientre como el tórax presentan un aspecto pulido, causado por la desaparición visible del vello porque las abejas tienden a morderse unas a otras (Toumanoff, 1951).

En la parte posterior del cuerpo se les forma una capa delgada de una sustancia viscosa, que según Mori son parece ser de origen fecal o bien podría originarse por una lesión de las articulaciones: Esta sustancia representa un excelente sustrato para el desarrollo de bacterias que contaminan la sangre de las abejas. Las abejas enfermas desprenden un olor especial y son expulsadas del colmenar por las abejas sanas, reduciendo así las colonias en un 50 a 100% de su población, dependiendo también de algunos factores como desórdenes de tipo hereditario, número de partículas infectantes, o algún portador de la infección como la reina. Al aislar a ésta, la infección desaparece, así como algún desorden nutricional, o de tipo genético. Se ha observado que no todas las abejas enfermas presentan o cursan por los mismos signos, y las hay asintomáticas. Queda mucho por aclarar sobre esto y también sobre la química y otros factores de la infección.

El virus puede ser aislado del alimento dejado por otras abejas enfermas, sobre todo si la reina está infectada. El contagio presenta una secuencia, comenzando con la contaminación adquirida por las larvas al salir de sus capullos y pasar al estado de --

prepupa, (uno de los estadios en que se registran mayor número de muertes). Antes de llegar a pupas, su cutícula se oscurece más de lo normal. Esto hizo creer que el virus trastorna el sistema hormonal en la larva a nivel de glándulas endócrinas principales. (Morse, 1978).

En 1936, Morison (Morse, 1978) hizo un estudio histológico de las abejas enfermas. Los cortes del intestino anterior mostraron la presencia de corpúsculos esféricos y helicoidales de 1 a 8  $\mu$ m de diámetro dentro del protoplasma de las células intestinales, en grupos entre el núcleo y la pared interior de las células, comenzando en la abertura de los tubos de Malpigio, desviándose hacia el pequeño intestino delgado y desapareciendo totalmente al final del primer cuarto de éste. Sugirió que los corpúsculos provienen de inclusiones semejantes a células que se encuentran en animales y plantas infectados por virus. Basado en estos datos, el autor concluyó que se trataba de una enfermedad viral, ya que los corpúsculos no se encontraban en abejas sanas. Los corpúsculos se encontraron en los productos del metabolismo en la cavidad del pequeño intestino, en el recto, y entre los excrementos y la sangre. También sugirió que no se trata-

ba de bacterias, ni de levaduras ni de hongos.

La opinión de Morison fue que la parálisis de las abejas se debía a un virus filtrable. Esta hipótesis fue confirmada por Butler en Inglaterra en 1943 (Morse, 1978) y por Burnside en los Estados Unidos, quien indicó que la presencia de los corpúsculos no representaba la prueba final y que el estudio histológico del epitelio intestinal realizado por Morison, no puede ser representativo para todos los casos de parálisis de abejas ya que difiere en la enfermedad. Posteriormente Bailey y Woods en 1974 reportaron varios tipos de virus causantes de la enfermedad de las abejas con características semejantes y diferentes.

c) Epidemiología.

Por regla general la enfermedad comienza en primavera y termina en otoño. Por lo que se cree esta temporada es propicia para la infección. Se ha observado que el virus es incapaz de sobrevivir más de tres semanas en los restos de las larvas y en la miel; además es difícil que persista para el siguiente año, por lo que se cree que existe una susceptibilidad a la enfermedad de tipo hereditario, y que la duración

de la enfermedad puede ser variable ya que puede exterminar una colonia en pocos días o en meses.

d) Características de los virus.

Recientemente se hizo un breve seminario de las propiedades de los diferentes virus y se consideraron algunas de éstas, para describir y clasificar lo ya hecho por Vaugh (Vago, Bergoin, 1968) basándose en la forma, tamaño y simetría de las partículas presentes en el núcleo o en el citoplasma de las células observadas al microscopio, la presencia o ausencia de cristales o granulaciones de la proteína en la que las partículas están envueltas.

La mayoría de los virus causantes de la parálisis en las abejas son del tipo RNA con cubierta icosaédrica y algunos de éstos se han clasificado dentro del grupo de los Picorna virus (Bailey, et. al., 1974).

Los mismos autores estudiaron las formas de las partículas que aislaron en 1968, encontrando que eran diferentes al hacer difusiones en gel, también realizaron pruebas serológicas basadas en la inmunodifusión en placa. Bailey y Melne en 1969 (Morse, 1978) obser

varon que el virus crónico y el agudo presentaban una rápida reacción. Se utilizaron técnicas de propagación, purificación y serológicas (Bailey, Woods, 1977).

Para la técnica de propagación se infectaron abejas en estado temprano de pupa, inoculando en su membrana intersegmental de la parte dorsal, una preparación de partículas infectantes. Se sometieron a incubaciones de 30° a 35°C observando que la mayoría de las pruebas con pupas fueron susceptibles a la propagación, a -- excepción de la infectada con virus "X" (Bailey, Woods, 1977). Para la purificación se utilizaron extractos de abejas en buffer de pH 7, cuatro volúmenes de fosfato de potasio (0.01 M) de dietilcarbonato de sodio más un volumen de éter etílico, se mezcló con tetracloruro de carbono (Bailey, Woods, 1977 y Rowlands, et. al., - 1971) y se clarificó por centrifugación a 8,000 rpm - por 10 minutos. La purificación se obtuvo por centrifugación diferencial, las técnicas han sido sometidas a modificaciones (Bailey, Woods, 1977). Luego se leyeron las absorciones para determinar los coeficientes - de purificación.

Para las pruebas de serología se realizaron las in

munodifusiones en placa, utilizando 0.05 M de buffer de fosfatos de potasio de pH 7. A esta prueba fueron sensibles todos los virus excepto el virus de Arkansas (Bailey y Woods, 1977). Además hicieron diluciones del purificado de Sacbrood para producir antisuero para el diagnóstico. También se determinó su densidad de flotación en CsCl a pH 7.

El primer virus aislado por Bailey, Gibbs y Woods, en 1963 (Bailey y Woods, 1977) a partir de abejas paralíticas fue el de la parálisis aguda. Se observó, que las abejas adultas presentan una muerte muy rápida en cuatro a seis días. El virus puede ser detectado en abejas aparentemente sanas en muchas partes del mundo. Este puede no causar signos de parálisis en forma natural por lo que se le llamó "Fenómeno de Laboratorio" - ocurre en igual forma en abejas aparentemente sanas como en paralíticas. Este virus se ha clasificado dentro del grupo de Picornavirus (Newman, et. al., 1973, - Bailey y Woods, 1974). Las partículas son isométricas y miden de 20 a 30 nm de diámetro y se asemejan a las partículas del virus Sacbrood, éstos tienen semejanzas en las pruebas serológicas pero al realizar pruebas -- cruzadas se notan que son diferentes, aunque también - presentan semejanzas físicas. Su ácido nucleico es -



RNA; su coeficiente de sedimentación es de 160 S; su densidad de flotación en CsCl es de 1.34 g/ml en pH 7, el peso molecular del RNA es de  $1 \times 10^6$ .

Bailey y Melne en 1969 clasificaron al virus Sacbrood dentro del grupo Picornavirus, el ácido nucleico que contiene es RNA (Newman, et. al., 1973), también observaron que al igual que el virus Agudo, infecta las vías digestivas del huésped y es neurotrópico en abejas adultas, su coeficiente de sedimentación es de 157 S; su densidad de flotación es de -- 1.33 g/ml a pH 7, y su diámetro es de 28 nm. (Rowlands, et. al., 1971).

El virus crónico de la parálisis de abeja (CVBP o CVP), fue aislado, de las enfermas, en 1968 en América del Norte y Europa por Bailey, Gibbs y Woods, -- (Bailey, et. al., 1979).

Las partículas fueron anisométricas y varían en su tamaño, por lo general es alrededor de los 17 nm. Este virus presenta RNA, su coeficiente de sedimentación es de 41 S; su densidad de flotación de 1.38 - g/ml. Más tarde lo encontraron en Inglaterra y en

Australia (Bailey, 1970). Partículas semejantes fueron reportadas en 1967 en la Unión Soviética por - Alekseenko y Kolimients, quienes observaron que la - parte principal donde el CVP se reproduce es en el - tejido nervioso. También se ha observado en el - campo en abejas con parálisis que presentan de hin-- chazón y se ha aislado de la miel, por lo que piensa que es excretado por la saliva y posiblemente por las glándulas hipofaríngeas (Morse, 1978). Cuando el CVP se inoculó en abejas sanas, las partículas isométricas del virus fueron observadas en partes grasas del cuerpo pero no en partes del intestino.

Estudios posteriores permitieron observar acumulaciones en glándulas hipofaríngeas (Morse, 1978). Las partículas fueron detectadas en granos de polen por lo que Bailey en 1971 sugirió que las abejas pu dieran secretar virus por sus glándulas.

Recientemente Morse, 1978, ha reportado que no afecta a las glándulas hipofaríngeas encontrando par tículas del virus en la musculatura torácica y en el abdomen.

Durante las investigaciones del virus Crónico en 1976 Bailey, et. al. (Morse, 1978) al tratar de aislarlo se encontraron otros dos tipos de partículas virales por lo que las asociaron al CVP (Bailey, et. al., 1980).

Estas partículas presentaban semejanzas entre sí como el tamaño de 17 nm, el contenido de RNA, su densidad de flotación en CsCl fue de cerca de 1.38 g/ml. Sin embargo, su coeficiente de sedimentación es diferente y además presenta notable diferencia en el peso molecular de sus proteínas y en el de su RNA. Al hacer la purificación de éstos, se observó que se trataba de un virus que estaba íntimamente asociado al CVP y otro que denominaron CWP (Virus de Partículas de Alas Oscuras).

Se ha visto que el CPVA que era asociado al CVP, requiere de la presencia de éste último y que su multiplicación es relativa. Además se dice que depende alguna información genética del virus (Bailey, - Brenda, Woods, Carpenter, 1980).

Se piensa que el CVP se multiplica en forma inde

Durante las investigaciones del virus Crónico en 1976 Bailey, et. al. (Morse, 1978) al tratar de aislarlo se encontraron otros dos tipos de partículas virales por lo que las asociaron al CVP (Bailey, et. al., 1980).

Estas partículas presentaban semejanzas entre sí como el tamaño de 17 nm, el contenido de RNA, su densidad de flotación en CsCl fue de cerca de 1.38 g/ml. Sin embargo, su coeficiente de sedimentación es diferente y además presenta notable diferencia en el peso molecular de sus proteínas y en el de su RNA. Al hacer la purificación de éstos, se observó que se trataba de un virus que estaba íntimamente asociado al CVP y otro que denominaron CWP (Virus de Partículas de Alas Oscuras).

Se ha visto que el CPVA que era asociado al CVP, requiere de la presencia de éste último y que su multiplicación es relativa. Además se dice que depende alguna información genética del virus (Bailey, Brenda, Woods, Carpenter, 1980).

Se piensa que el CVP se multiplica en forma inde

pendiente. Se ha localizado en la musculatura del tórax y en la pared del abdomen de abejas, pero no se ha encontrado la presencia de otros organismos patógenos, por lo que no se ha dado una explicación de las semejanzas entre éste y el CPVA.

En 1974-1975 Bailey y Woods describieron otros virus causantes de parálisis en abejas. Uno fue llamado "Virus de Abejas de Arkansas" por haberse aislado en Arkansas (Morse, 1978). Presenta un diámetro de 30 - nm, que es semejante al SBV y al APV, su coeficiente de sedimentación es de 128 S y su densidad de flota--ción es de 1.37 g/ml.

La muerte de las abejas infectadas por él es muy lenta ya que mueren a la tercera semana de la infec--ción. Se ha aislado polen que dejan las abejas muer--tas. Cuando se realizaron las pruebas serológicas, - el virus no respondió a la técnica clásica, por lo - que se utilizó agar y buffer de fosfatos (Bailey, et. al., 1979). (Ver cuadros 1-5, en donde se muestran sus características).

Otro virus que observó y que aparece en forma rara fue denominado "Virus S". Aunque no fué descrito se

observó que causa la muerte con gran rapidez. Kulincevic lo aisló en 1970-1974 (Morse, 1978) e indicó que es común encontrarlo en invierno.

Otro virus que causa la muerte en las abejas a los 12 días fue llamado "Slow" y se caracteriza por causar parálisis de las patas delanteras. Presenta un diámetro de 30 nm, y serológicamente es distinto a otros virus de abejas. Su coeficiente de sedimentación es entre 146 y 163 S sus partículas son isométricas (Morse, 1978).

Lasthy encontró otro virus iridiscente (Morse, 1978) de tamaño muy grande, de 160 nm. Fue aislado de algunas abejas en la India. Aunque se sabe poco de él, se encontró que su ácido nucleico es DNA a diferencia a los otros virus que son RNA. Bailey hizo un estudio de él en 1975 clasificándolo "Iridovirus", (Bailey, et. al., 1976). Este virus se había aislado anteriormente pero de otras órdenes como Diptera, Coleoptera, Lepidoptera y por último se encontró en Himenoptera en adultos de Apis cerana y en Apis mellifera. Cuando se vió el tipo de infección se trató de encontrar otro tipo de virus, al no encontrarlo se recurrió al procedimiento

para aislar virus Crónico y se observaron las partículas de 150 nm, con DNA. Su constante de sedimentación fue de 2216 S, su densidad de flotación de 1.30 a 1.33 g/ml. Se cultivó en abejas en estado de pupa y adultas, dando densidades de flotación de 1.30 y 1.32 g/ml, respectivamente (Bailey, et. al., 1976). Además se observó que el virus se multiplica en abejas adultas formando agregados citoplásmicos especialmente en las partes grasas del cuerpo y en las glándulas hipofaríngeas.

Otro virus aislado de abejas fue llamado "X" y se aisló de abejas adultas afectadas por parálisis, presentando partículas isométricas que contenían RNA, su diámetro fue de 35 nm, su coeficiente de sedimentación de 187 S y su densidad de flotación de 1.36 g/ml. Se ha visto que puede no causar signos de parálisis cuando se infectan abejas adultas, pero cuando se infectan abejas con virus "X" y partículas del SBV las abejas mueren a los cuatro días.

Otro virus conocido con el nombre de "Egipto" se aisló en ese país. Presenta partículas de 30 nm de diámetro y contiene RNA, su coeficiente de sedimentación es de 165 S y sus partículas contienen tres pro-

teínas, presenta una densidad de flotación de 1.37 g/ml. (Bailey, et. al., 1979).

En Australia fueron aislados otros tres virus, al tratar de aislar al virus Kashmir que se obtuvo de abejas adultas, larvas y prepupas, presentaron características semejantes como el tamaño de sus partículas de 30 nm y la presencia de RNA, su coeficiente de sedimentación de 171-173 S, densidad de flotación de 1.371 g/ml, pero al realizar las pruebas de inmunodifusión se vió que se trataba de diferentes virus y que pueden estar juntos en una infección (Bailey, et. al., 1979).

En las pruebas realizadas para la identificación se vió que la diferencia radicaba en la presencia de sus diferentes proteínas (ver cuadro No. 5).



CUADRO 1

COMPARACION DE LAS PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LOS VIRUS:

SACBROOD Y AGUDO DE LA PARALISIS DE ABEJAS

VIRUS	DENSIDAD DE FLOTACION EN CsCl g/ml			COEFICIENTE DE SEDIMEN- TACION EN UNID. S	DIAMETRO DE LAS PARTICULAS mm
	pH 7	8	9		
SACBROOD	1.33	1.33	1.33	157	160
AGUDO DE LA PARALISIS	1.34	1.36	1.42	28	28

PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LOS VIRUS AISLADOS DE ABEJAS CON PARALISIS

VIRUS	DIAMETRO EN NM	COEFICIENTE DE SEDIMENTACION S	DENSIDAD DE FLOTACION EN CsCl g/ml
SACBROOD	28	157	1.33
AGUDO DE LA P.	20 - 30	160	1.34
CRONICO DE LA P.	17	41	1.38
ARKANSAS	30	128	1.37
"S"	-	-	-
SLOW	30	146 - 163	1.35
IRIDOVIRUS	150	2216	1.33
"X"	35	187	1.36
EGIPTO	30	165	1.37
AUSTRALIA	30	171 - 173	1.37

CARACTERISTICAS DE 10 VIRUS AISLADOS DE ABEJAS CON PARALISIS

VIRUS	ABREVIACION	PARTICULAS			EDAD DE LAS ABEJAS INFECTADAS	
		FORMA	DIAMETRO nm	ACIDO N	PUPAS	ADULTAS
SACBROOD	SBV	ISOMETRICA	28	RNA	-	+
AGUDO DE LA P.	APV	ISOMETRICA	20 - 30	RNA	-	+
CRONICO DE LA P.	CPV	ISOMETRICA	17	RNA	+	-
DE ARKANSAS	-	ISOMETRICA	30	RNA	-	+
"S"	S	-	-	RNA	-	+
SLOW	SLOW	ISOMETRICA	30	RNA	-	+
IRIDOVIRUS	-	-	150	DNA	-	+
"X"	X	ISOMETRICA	35	RNA	-	+
DE EGIPTO	-	ISOMETRICA	30	RNA	-	+
DE AUSTRALIA	-	ISOMETRICA	30	RNA	-	+

CUADRO 4

COMPARACION DE ALGUNAS CARACTERISTICAS DE DOS VIRUS:EL CPVA Y EL CWP

VIRUS	COEFICIENTE DE SEDIMENTACION EN UNIDADES	DENSIDAD DE FLOTACION EN CsCl g/ml	P M DE LAS PROTEINAS	P M DEL A N RNA	DIAMETRO DE PARTICULAS (nm)
CPVA	41 $\pm$ 1.3	1.385 $\pm$ 0.003	15000	1.0 $\times$ 10 <sup>6</sup>	17
CWP	49 $\pm$ 0.6	1.385 $\pm$ 0.001	19000	.45 $\times$ 10 <sup>6</sup>	17

CUADRO 5

PESOS MOLECULARES DE LAS PROTEINAS DE LOS VIRUS AISLADOS DE  
ABEJAS CON PARALISIS EN AUSTRALIA Y EN EGIPTO

VIRUS	PESO MOLECULAR DE LAS PROTEINAS				
	A	B	C	D	E
EGIPTO	41150 ± 500	30000 ± 500	24950 ± 50	-	-
KASHMIR AISLADO	41100 ± 400	37300 ± 550	24500 ± 305	-	-
SOUTH AUSTRAL	44300 ± 350	39300 ± 250	-	33950 ± 200	25500 ± 150
QUEENS LAND 1	-	39800 ± 300	-	32950 ± 300	24800 ± 200
QUEENS LAND 2	-	40300 ± 450	36400 ± 900	-	25250 ± 350

### INFECCIONES BACTERIANAS.

Las enfermedades causadas por bacterias son de -  
las infecciones más importantes que atacan a las crías,  
éstas son la Loque Americana y la Loque Europea.

Este tipo de infecciones se caracteriza por dar -  
una forma de guiñapo a las larvas que mueren y causan -  
putrefacción de la cría.

Al igual que otras enfermedades de las abejas la  
Loque Americana se conocía desde la antigüedad sin saber  
de que tipo de enfermedad se trataba. Aristóteles en su  
"Historia de Animales libro IX cap. 40" (Langstroth, -  
1953) hizo mención de una enfermedad que ataca a las -  
abejas causando un repugnante olor, suponiendo que esta  
enfermedad era causada por polen que intoxicaba a las -  
larvas. Virgilio también hizo alusión a la enfermedad.  
En 1586 el alemán Nickel Jacob, escribió un libro "La  
Vida de las Abejas" en el que hizo una descripción de -  
la infección mencionando posibles métodos para combatir  
la. Opinaba que la enfermedad era causada por contagio  
al presentarse el pillaje trasmitiendo las abejas adul-  
tas a la cría la infección. En 1769, Schirach llamó -  
putrefacción de la cría y mencionó dos causas diciendo

que la primera causa se debe a la mala calidad del alimento, y la segunda es por la posición del huevo en la postura. Otro autor que ya hizo una descripción más completa fue Della Rocca, quién citó ciertas características como aspecto, color, olor, oponiéndose a las causas que Schirach atribuye, pues sospechó que se trataba de una infección. En 1860, Leuckart, atribuyó la infección a un hongo al que llama Parohis tophyton ovalum Leuck. En 1869, Preuss encontró corpúsculos en forma ovalada creyendo que se trataba de levaduras a las que llamó Criptococcus alveolaris que contaminaba el alimento provocando la diseminación de la infección. Schonfeld, Cohn y Eidam, al estudiar larvas infectadas encontraron formas de bacterias. En 1885 Cheshire y Cheyne, aislaron una bacteria utilizando larvas infectadas a esta bacteria le llamaron Bacillus alvi. En 1888 Dickel encontró dos grandes diferencias en las larvas infectadas observando que existían agentes infecciosos de las larvas operculadas y agentes infecciosos de las larvas no operculadas. En 1894 en Nueva York Howard observó una enfermedad que se presenta en las larvas de las abejas creyendo que nunca antes nadie la había observado la llama "Blackbrood". En 1902 Moore y White demostraron que la enfermedad que Howard refería era la misma que Cheshire y Cheyne ya había descrito. Después de realizar numerosos estudios en

Europa y América White en 1904 (Langstroth 1953) concluyó que se trataba de dos agentes infecciosos llamando European Foulbrood a la infección que se presentaba en Europa y que más tarde fue llamada Loque Europea, y a la infección presente en América la llamó American Foulbrood hoy conocida como Loque Americana. Más tarde se supo que Bacillus pluton causa la Loque Europea y que Bacillus larvae causa la Loque Americana.

#### SIGNOS DE LA ENFERMEDAD:

Es una de las enfermedades más graves y se caracteriza por atacar a las larvas cuando están a punto de opercular. Ocasiona cambios de color del opérculo que va cambiando de color amarillento a café obscuro y finalmente a negro. La textura de la larva se reblandece y se pega al fondo de la celda con aspecto informe y viscosa y su forma también cambia de convexa a cóncava. El panal presenta aspecto de estar parchado ya que las celdas sanas y enfermas se intercalan. Por lo general las abejas no tratan de limpiar las celdas y en algunas ocasiones hasta las llenan de miel dejando en el fondo esta materia putre



facta. Más tarde se empieza a notar que las abejas adultas tanto en el exterior como en el interior de la colmena se conducen con pereza y las nodrizas descuidan a la cría.

Se dice que la infección entra siempre por la vía oral pasando a intestino luego pasa a linfa generalizándose. En la linfa ocurre histólisis y la destrucción que se realiza desde la luz de los vasos de la hemolinfa (Bailey y Lee, 1962). La enfermedad se presenta con mayor frecuencia en primavera, el olor que desprenden es semejante a la cola que usan los carpinteros.

De aquí que se toman tres características para reconocer la infección y distinguirla de otras enfermedades de las abejas.

1. Color café oscuro.
2. Olor parecido a la cola de pegar.
3. Consistencia viscosa de las larvas podridas.

### LOQUE EUROPEA

A esta también se le ha llamado Loque Negra o -- Loque Hedionda aunque con frecuencia se ha confundido con la Loque Americana, difieren en varios aspectos.

Las abejas infectadas no son muy activas pero si se desembarazan de las larvas muertas. Por lo general ataca con mayor frecuencia a las larvas jóvenes por lo que hay menor proporción de pollo operculado, las que si alcanzan a opercular son deprimidas y agujeradas. Las larvas infectadas presentan manchas amarillas en el cuerpo cerca de la cabeza, se mueven con dificultad y cuando mueren cambian de color a café obscuro y luego a negro. Las ya muertas forman escamas irregulares que no se pegan a la pared de la celda. El olor que desprenden es escaso y cuando se percibe es a pollo agrio. La infección se presenta desde la primavera hasta el otoño.

En la Loque Europea se piensa que la reina puede ser transmisora por lo que conviene eliminarla. En la Loque Americana la reina parece no tener nada que

ver con la infección pero ésta es más drástica y requiere de más cuidados que la Loque Europea, ésta a su vez no se transmite por medio de la miel por lo que no es necesario destruir el panal.

Los dos tipos de infecciones se pueden propagar de una colonia a otra por diferentes vías. El pillaje es quizá una de las principales causas de la propagación. Las abejas obreras también pueden recoger esporas en las flores en las que otras abejas enfermas se han posado esto parece poco frecuente. Los transportes y envíos de miel de una localidad a otra también puede ser de otra causa de contaminación.

#### CARACTERISTICAS DE BACILLUS LARVAE:

Gérmenes generalmente aerobios, esporulados cilíndricos, casi siempre flagelados, crecen frecuentemente en cadena. Las colonias son blancas e irregulares, de forma de bastón, su tamaño es de 0.5 a 0.8 micras por 2.5 a 5. micras, pudiendo estar aislados o en cadenas. Su coloración con Gram es variable tiñéndose con otros colorantes como azul de metileno, fuscina, violeta de genciana.

#### IV. METODOLOGIA.

Para comprobar la posible presencia y determinar los tipos de virus que probablemente participan y producen la parálisis de abejas en México, se obtuvieron muestras al azar de colonias de abejas enfermas que mostraban la signomatología comparable con la causada por virus que provocan parálisis que de acuerdo a Morse (1978) son: coloración más oscura que el resto de la colonia, dificultad para desplazarse, pérdida de vello, entre otras que no se presentaban.

También se observaron muestras de larvas de acuerdo a Morse (1978) presentaban algunas características como son: hundimiento de las larvas en el panal con una consecuente resequedad y cambio de tonalidad en comparación con el resto de las larvas.

Con el fin de experimentar con los cultivos de abejas se obtuvo una parte de una colonia de abejas sanas en Xochimilco, D.F., que también sirvió para hacer el lote testigo para algunas.

Las muestras se obtuvieron de acuerdo con el siguiente cuadro (cuadro 6).

CUADRO 6

OBTENCION DE LAS MUESTRAS DE  
ABEJAS

<u>LOCALIDAD</u>	<u>CANTIDAD</u>	<u>ESTADO</u>	<u>INFECCION</u>
Xochimilco, D.F.	110	Adultas	-
Amecameca, Méx.	150	Adultas	100 +
Chalco, Méx.	100	Adultas	37 +
Tula, Hidalgo	100	Larvas	-
Huitzilac, Morelos	200	Adultas	10 +
Cuautla, Morelos	120	Adultas	13 +
San Miguel Allende, Gto.	60	Adultas	r
Col. Adolfo Materos, Tlax.	100	Larvas	30 +
Jalapa, Ver.	1000	Adultas	430 +
<b>T O T A L</b>	<b>1740</b>	<b>Adultas</b>	
<b>I N F E C T A D A S</b>	<b>620</b>		
<b>L A R V A S</b>	<b>200</b>		
<b>I N F E C T A D A S</b>	<b>30</b>		

Las muestras de abejas obtenidas se transportaron en vivo al laboratorio de virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la U.N.A.M., y se congelaron a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ .

De las abejas que presentaban apariencia sana se tomaron algunas muestras para usarlas como testigo, así como algunas de las larvas sanas que también fueron separadas.

Las larvas se transportaron en el panal. Se seleccionaron las que se consideraban sanas que eran las que no presentaron los síntomas considerados de la enfermedad para tratar de obtener un medio de crecimiento. Las que estaban infectadas y con sospecha de la infección se guardaron para posteriormente hacer un triturado (Glauffret, Poutiers, Vago, Rousseau, 1968) que se utilizarían para inocular a los medios de cultivo.

Todo el material, sustancias y soluciones se trabajaron en condiciones de absoluta esterilidad y con la ayuda de campana de flujo laminar, mechero y autoclave.

OBTENCION DEL TRITURADO.

Se extrajo el músculo torácico de cincuenta abejas enfermas y se puso en solución de PBS con 0.2 ml. de penicilina de 100 U y 0.2 ml. de micotin, dejándose reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Se pasaron a un mortero y se lavaron cuatro veces con PBS. Se maceraron y se centrifugaron a 1500 rpm y se metieron a refrigeración 30 minutos, para después inocular.

Las técnicas de virología que se emplearon para lograr el crecimiento de los virus "in vitro" se describen a continuación.

El primer medio de crecimiento que se intentó fue el propuesto por Stanley (Melissa, 1968) - con base en larvas de abejas (Apis mellifera) para lo que se seleccionó un medio nutritivo con vitaminas, utilizándose para este fin las larvas sanas que se colectaron en Tlaxcala y, posteriormente, las de Tula.

La técnica para lograr el medio de crecimiento

to a base de larvas se describe a continuación:

#### CULTIVO CELULAR DE LARVAS

Las larvas se cortaron y se lavaron tres veces con una solución de agua bidestilada y estéril. Posteriormente, se les agregó tripsina -- (28% en PBS). Se sometieron con un agitador magnético durante diez minutos. La solución obtenida se filtró utilizando un filtro millipore de 0,45 micras. Luego se les agregó el medio nutritivo y 0.4 de penicilina, y 0.4 ml. de Micostatin. El medio se repartió en tubos de Leighton aproximadamente 3 ml. en cada tubo. Se incubó a 37°C de 24-48 horas para después, observar el crecimiento celular y entonces se inocularía.

#### CULTIVO CELULAR DE EMBRIONES DE POLLO ENTEROS

Fue el segundo medio de cultivo que se empleó siguiendo la técnica de Cuninham, 1971.

Para ello se seleccionaron embriones de seis días, se observaron en el ovoscopio vivos,



se marcó la cámara de aire, para desinfectarla con alcohol. Con ayuda de unas pinzas se rompió la cáscara, luego la fáfara que cubre la membrana corioalantoidea y esta última también.

Se sujetó el embrión por el cuello y se sacó cortando el saco vitelino. Se colocó el embrión en una caja de Petri. Posteriormente se adicionó un poco de solución de PBS, para lavar se les quitó la cabeza, las alas, las patas y - las vísceras. Se pasó a otra caja de Petri para cortarlo, se colocaron tres embriones en cada caja. Se cortaron los embriones, luego se lavaron de tres a cuatro veces con PBS. Se decantó y - los fragmentos se separaron pasándolos a un trip sinizador con un poco de tripsina (28% y pH de 8 - 8.4) agitando por 20 minutos. Una vez que las células salieron de la agitación se les agregó - un poco de medio para inactivar la tripsina y se pasaron por un filtro millipore .45 en un matraz Kitasato. Se colocaron en tubos para centrifugar durante 10 minutos a 1500 r.p.m.

Después, se decantó el líquido sobrenadante

y se lavó nuevamente con solución PBS. Se volvió a centrifugar a la misma velocidad y tiempo, para decantar nuevamente. Finalmente, se agregó el medio de crecimiento Eagles (Hsiung, 1964) con solución de electrolitos. Se repartió en tubos de Leighton, 3 ml. en cada tubo y se incubaron de 3 a 5 días a 37°C.

#### CULTIVO CELULAR DE CELULAS DE RIÑON DE EMBRION DE POLLO.

El siguiente cultivo que se realizó fue el de células de riñón de pollo (Cuninhgam, 1971 y Kruse, Rojand, 1973).

Se seleccionaron embriones de pollo de 16-18 días de incubación utilizando 5 embriones en cada ocasión. Se les trató de la misma manera que a los anteriores. Se tomó al embrión sobre el cartilago xifoides y se cortó transversalmente, dividiendo el cuello del embrión en 2 partes por detrás de las costillas, eliminándose la región anterior. Se eliminaron las vísceras, se lavó la cavidad abdominal con PBS y los riñones se colocaron en una caja Petri con PBS de 20 a 15 ml. Se lavaron cuatro ve-

ces y se pasaron a un vaso de precipitado para triturarlos, se decantó y los restos de los riñones se pasaron a un triptinizador con tripsina (28% y pH de 8-8.4). Para cada riñón se empleó aproximadamente 10 ml. de la solución, se agitaron con un agitador magnético durante 30 minutos, para después pasarlos por un filtro millipore .45 micras. La suspensión celular se pasó a tubos para centrifugar a 1500 r.p.m. durante 15 minutos. Se decantó el líquido sobrenadante y se agregó PBS en la misma proporción, después de 2 a 3 lavados se volvió a centrifugar. Después se agregó un medio de crecimiento, se utilizaron el MEM y el Eagles (Hsiung, 1964). Se repartieron en los tubos de Leighton 3 ml. para cada tubo y se incubaron a 37°C entre 24 y 48 horas.

#### INOCULACION EN EMBRIONES DE POLLO.

Se eligieron 60 embriones de pollo de 6 días de incubación, para inocularse el macerado de abejas enfermas. La inoculación se realizó por 3 vías (Cuninhgam, 1971). Se inocularon 20 embriones por cada vía y 20 para lote testigo, las vías de inoculación fueron por cavidad alantoidea, cavidad amniotica y membrana corioalantoidea. Las inocula-

ciones se realizaron de acuerdo a la siguiente metodología.

1. VIA DE INOCULACION DE EMBRIONES DE POLLO POR -  
CAVIDAD ALANTOIDEA.

Se examinaron los huevos al ovoscopio para comprobar que los embriones estuvieran vivos.

Luego se eligió una zona de la membrana alantoidea distante del embrión y de la cavidad amniótica que esté libre de vasos sanguíneos, aproximadamente 3 mm abajo de la cámara de aire, se desinfectó con alcohol, para hacer un orificio con una aguja en la cámara de aire, se volvió a desinfectar con alcohol. Se utilizó una jeringa de insulina con una aguja del No. 271-2 que se introdujo en línea recta para inocular el macerado de abejas que fué de 0.2 ml. Luego se sellaron los orificios con resistol (una gotita). Se incubaron a 37°C después de 24 horas se ovoscopiaron para eliminar muertos por traumatismo o por contaminación hasta los 5 días (fig. 1, 2).

2. VIA DE INOCULACION EN EMBRIONES DE POLLO POR CAVIDAD AMNIOTICA.

El huevo se examinó de la misma manera que el anterior, pero se marcó la zona en que se localizó el embrión. Se marcó un círculo paralelo a la cámara de aire, se desinfectó y se hizo un orificio, para después quitar con unas pinzas la cáscara, quedando al descubierto la cámara. Se agregó un poco de suero fisiológico para aclararla y se le inoculó 0.2 ml. del marcado utilizando una jeringa de insulina. Se tapó la abertura con un pedazo de papel estéril. Se incubó a 37°C durante 24 horas para hacer las mismas observaciones que en el anterior - (fig. 1, 2).

3. VIA DE INOCULACION DE EMBRIONES DE POLLO POR MEMBRANA CORIOALANTOIDEA.

El examen del huevo se realiza de la misma manera que los anteriores, pero se marcó una zona cuadrada de aproximadamente 1 cm. y 3 ml. por arriba de la cámara, se desinfectó y se eliminó la cáscara sin lesionar la membrana. Con una jeringa de insulina se inocularon 0.2

ml del macerado de abejas, entre la membrana corioalantoidea y la fáfara, se tapó de la misma manera que el anterior. Se incubaron a 37°C desde 24 horas hasta que mueren (fig. 3 y 4).

Después de inoculados los huevos se incubaron 24 horas para observar cuáles morían y se abrían para observar el daño que presentaban y tratar de identificar la causa de la muerte, ya que los embriones presentan algunas características cuando se trata de una infección bacteriana o por virus o traumas. Al revisar los embriones muertos se hacen las siguientes observaciones para ver si las presentaron:

1. Muerte.
2. Hemorragias subcutáneas.
3. Congestión de la epidermis.
4. Retorcimiento y enanismo del embrión.
5. Engrosamiento y fibrosis de la membrana amniótica.
6. Disminución del volumen del líquido amniótico.
7. Engrosamiento y edema de la membrana corioalantoidea.
8. Lesiones postulares de la membrana corioalantoidea.

9. Desarrollo anormal de las plumas.
10. Depósitos de uratos en el estroma del riñón y mesonefros.
11. Cuerpos de inclusión.

En cada ocasión que se revisaba un embrión - muerto también se revisó un embrión del lote testigo.

De las tres vías de inoculación en los embriones de pollo que se realizaron, se optó por realizar sólo la inoculación por la vía de cavidad - alantoidea por resultar ser la más sencilla.

La inoculación de los embriones se realizó para abejas de todas localidades de las que se colectaron. En todos los casos, una vez muerto se extrajo el líquido para inocular en tubos de cultivo celular y se les practicó un estudio bacteriano - que se explica a continuación. También los líquidos obtenidos de los embriones se pasaron a otros sanos de 6 días de incubación para ver si el daño persistía, disminuía o desaparecía. En caso de que persistiera se observaría hasta el final la dura--

ción de esos nuevos embriones para determinar si se trataba de daño viral.

PRUEBAS BACTERIOLOGICAS REALIZADAS AL MACERADO DE ABEJAS Y AL LIQUIDO AMNIOTICO DE EMBRIONES INOCULADOS.

Se realizaron las pruebas bacteriológicas en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (I.N.E.R.), y con reactivos obsequiados por las Facultades de Medicina y Química de la U.N.A.M.

Los medios utilizados para el crecimiento y el aislamiento, de colonias son los que con mayor frecuencia se emplean para este fin; EMB, agar sal y manitol (éste se utilizó en lugar del 110 para el crecimiento de estafilococos) agar chocolate en atmósfera de  $CO_2$ , y gelosa sangre. Se realizaron las siembras junto al mechero y se incubaron a  $37^{\circ}C$  durante 24 horas.

A las colonias que crecieron se les practicaron las siguientes pruebas bioquímicas para la -



identificación de las bacterias que se desarrollan (Davidsohn, Henry, 1978).

SIM. Que es un medio semisólido utilizado para observar movilidad, producción de sulfuros, INDOL (para éste se le agregaron unas gotas de reactivo - de Earlich). La forma de sembrar fue por picadura alcanzando una profundidad de 3/4 del medio. Se in cuba a 37°C durante 24 horas.

AGAR DE HIERRO DE KIGLER.

Este medio se utilizó para observar fermentación de carbohidratos como son la glucosa y dextrosa, producción de sulfuros y de gas. La siembra se realizó en tubos inclinados y se sembró por picadura en el fondo y estria en la superficie, se incubó a 37°C durante 24 horas.

AGAR CITRATO DE SIMMONS.

Este medio de cultivo se utilizó para diferenciar las bacterias Gram negativas, basándose en la utilización de citrato. Se colocaron los tubos en -

forma inclinada y se sembró por picadura en el fondo y estria en la superficie, se incubó a 37°C por 24-96 horas.

#### AGAR UREA.

Este medio se emplea para la diferenciación mediante la descomposición de la urea o la fermentación del azúcar. La siembra se realizó en tubos inclinados, se distribuyó el inóculo en la superficie inclinada, se incubó a 37°C durante 24 horas.

#### AGAR DE HIERRO Y TRIPLE AZUCAR.

Este medio, como su nombre lo indica, contiene 3 azúcares, lactosa, sacarosa y dextrosa. La siembra se realizó en tubos inclinados y se sembró por estria en la superficie y picadura en el fondo. Se incubó a 37°C durante 24 horas.

#### LICUEFACCION DE LA GELATINA.

(Bredd, Murray, 1957; Davidsohn, Henry, 1978.)

Se utilizó gelatina bacteriológica para observar la licuefacción. Se sembraron las muestras de las diferentes colonias que crecieron. Se incubaron a 37°C durante 24 horas.

#### BASE DE CALDO ROJO FENOL CON GALACTOSA.

El medio de rojo fenol se utiliza para ver la fermentación de carbohidratos agregando el azúcar que se desea fermentar, en este caso fue la galactosa, ya que el rojo fenol actúa como indicador de pH.

#### INTERPRETACION DE LAS BIOQUIMICAS.

SIM. La movilidad se revela por una turbidez en el seno del medio. En el caso de inmovilidad se observa el desarrollo de crecimiento sólo a lo largo de la punción.

La producción de sulfato de hidrógenos lo indica un color negrecido.

La producción de Indol se observa al adicionar el reactivo, de Ehrlich que da una coloración

ción rojo púrpura en caso de ser positivo.

AGAR DE HIERRO DE KIGLER.

Los gérmenes fermentadores de la glucosa acidifican totalmente el medio cambiándolo de su color original de rojo cereza a color amarillo, los que no la fermentan acidifican sólo la parte del fondo.

La producción del gas se observa al formarse un espacio en el fondo del tubo.

La producción de sulfato de hidrógeno se observa por ennegrecimiento del medio.

AGAR CITRATO DE SIMMONS.

Para determinar la utilización de citrato se observa un crecimiento visible acompañado de un cambio alcalino que da un color que varía entre verde y azul.

AGAR UREA.

Los organismos capaces de atacar la urea al liberar amoníaco originan el cambio del rosa original al rojo azulado o violeta.

AGAR DE HIERRO Y TRIPLE AZUCAR.

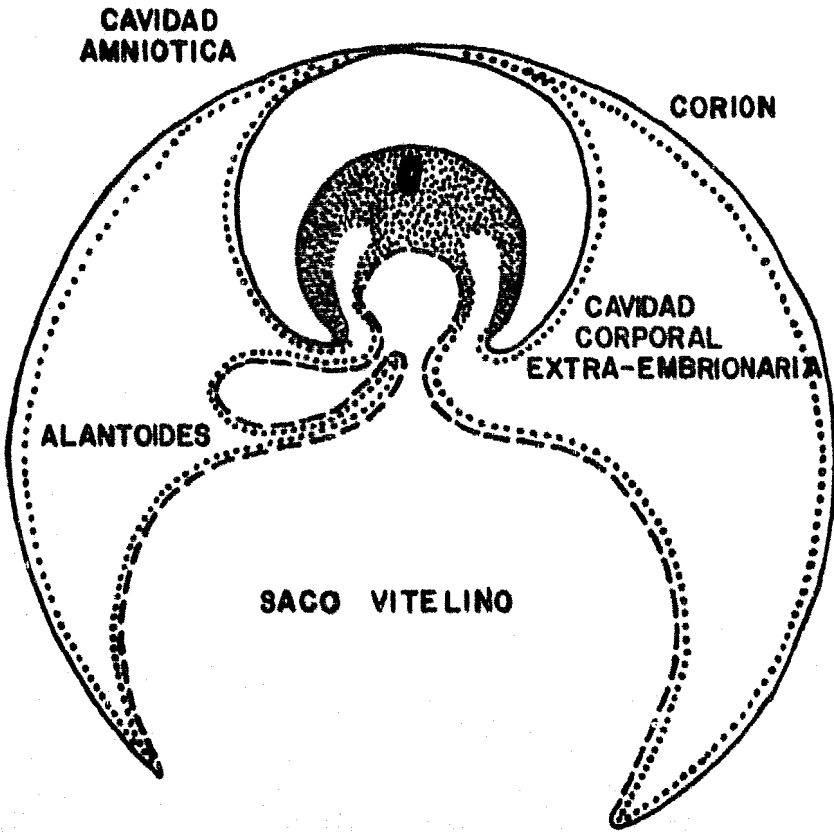
La interpretación de este medio es semejante - a la del medio de Kigler.

LICUEFACCION DE LA GELATINA.

Cuando la gelatina no se licua se observa un ligero color blanco opaco y cuando hay licuefacción se observan zonas claras.

BASE DE CALDO ROJO FENOL CON GALACTOSA.

El color original que da el rojo fenol es acidificado en caso de presentarse la fermentación -- del azúcar tomando un color amarillo.



— ECTODERMO  
- - - ENDODERMO  
..... MESODERMO

FIG. 1

DESARROLLO DE LAS MEMBRANAS EXTRAEMBRIONARIAS  
DEL EMBRION DE POLLO

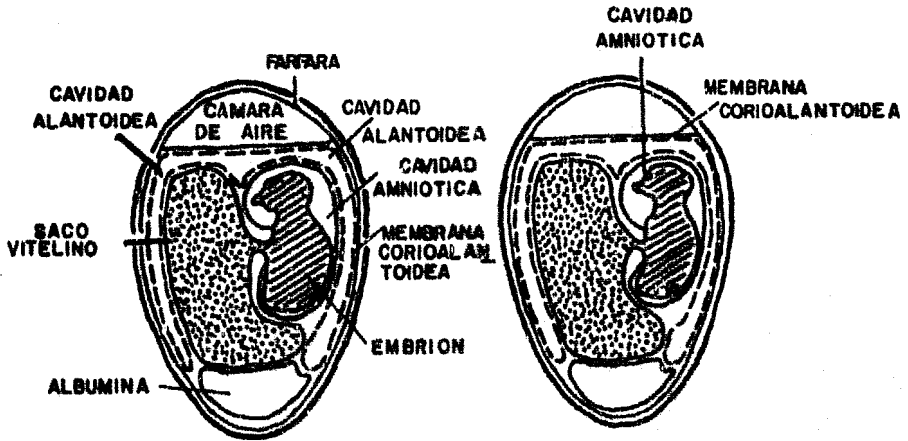


Fig. 2

Fig. 3

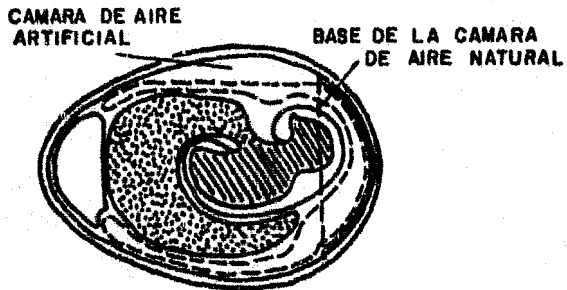


Fig. 4

FIG. 2. VIAS DE INOCULACION. VIA ALANTOIDEA.

FIG. 3. VIA AMNIOTICA Y CORIOALANTOIDEA.

FIG. 4. VIA POR MEMBRANA CORIOALANTOIDEA.

V. RESULTADOS.

Los resultados obtenidos en los cultivos celulares que se realizaron son los siguientes:

No se logró obtener un medio de cultivo de las larvas de abejas.

Entre los cultivos realizados con células de riñón de embrión de pollo y blastos, el que fue más manejable y que requería menos número de embriones resultó ser el de los blastos, por lo que se seleccionó para trabajarlo con todas las inoculaciones obtenidas de los macerados y tomas de líquido amniótico. Los resultados se anotaron en cuadros como el que se muestra (7) sólo se da uno como ejemplo ya que los resultados son semejantes.

Los resultados obtenidos en los embriones de pollo inoculados en los que iban muriendo se observó el líquido amniótico bastante purulento y al verlo al microscopio se observó gran cantidad de bacterias. Algunos presentaron hemorragias ligeras.



En cuanto a las pruebas bacteriológicas se observó que en los frotis directos hechos con la tinción de Gram, había cocos Gram positivos y negativos, bacilos negativos y positivos.

En los medios de Agar sangre el aspecto de las colonias era: medianas, blanquiscas, transparentes, lisas y brillantes. Lo mismo que para las colonias desarrolladas en el medio de EMB.

En el medio de Agar Sal y Manitol las colonias fueron muy escasas y el aspecto que presentaban era: medianas, claras, y brillantes, transparentes.

En el medio de Agar Chocolate no hubo crecimiento a excepción de las siembras realizadas con el macerado de abejas de Jalapa, Veracruz. Pero sólo crecieron unas cuantas colonias en una ocasión.

En las abejas que se ocuparon para hacer las siembras bacterianas de Chalco, Edo. de México, no hubo ningún crecimiento.

El resultado de las bioquímicas de abejas de las localidades en las que hubo crecimiento se presentan en los siguientes cuadros. (8 y 9).

Resultados obtenidos en el cultivo celular realizado con abejas de San Miguel Allende. Todas estaban enfermas por lo que se usó como testigo abejas sanas - de Xochimilco. Se realizaron nuevas inoculaciones.

CUADRO 7

OBSERVACIONES DIARIAS EN LAS 8 HILERAS DE TUBOS

HRS.	TEST	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
24	V	V	V	M	V	M	M	V	V
48	V	V	V	-	M	-	-	V	V
72	V	V	V	-	-	-	-	V	V
96	V	V	V	-	-	-	-	V	V

V = VIVAS

M - MUERTAS

CUADRO 8

LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS REALIZADAS EN  
MUESTRAS DE ABEJAS PROCEDENTES

REACCIONES QUIMICAS	AMECAMECA	HUITZILAC	CUAUTLA
GLUCOSA	+	+	+
SACAROSA	+	+	+
LACTOSA	+	+	+
GALACTOSA	+	+	+
INDOL	+	+	+
MOVILIDAD	+	+	+
LICUEFACCION DE LA GELATINA	-	-	-
PRODUCCION DE SULFURO	+	+	+
PRODUCCION DE GAS	+	+	+

CUADRO 9

LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS REALIZADAS EN  
MUESTRAS DE ABEJAS PROCEDENTES

REACCIONES QUIMICAS	SAN MIGUEL ALLENDE	TLAXCALA	JALAPA
GLUCOSA	+	+	+
SACAROSA	+	+	+
LACTOSA	+	+	+
GALACTOSA	+	-	+
INDOL	+	+	+
MOVILIDAD	+	+	+
LICUEFACCION DE LA GELATINA	-	-	-
PRODUCCION DE SULFUROS	+	+	+
PRODUCCION DE GAS	+	+	+

Estos resultados corresponden a la clasificación dada por Murray, 1973, o sea la de --  
Bacillus larvae.

CLASIFICACION

Clase:	I	Esquizomicetos
Orden:	I	Eubacteriales
Familia:	III	Bacillaceae
Género:	I	Bacillus
Especie:		Bacillus larvae

Todas las pruebas bioquímicas coincidieron a excepción de las de Tlaxcala que presentaba su galactosa negativa.

## VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos por las técnicas de cultivo celular y por las inoculaciones de embriones de pollo realizados en este estudio para lograr el crecimiento del virus de la parálisis de abejas, no se pudo comprobar su presencia en México. Ya que como se ve en los cuadros de los resultados de cultivos celulares, no se presentó ningún daño celular que indique una infección viral.

Y en los embriones no se encontró ninguna de las características citadas para la infección viral, por lo que se puede interpretar que no se trata de una infección viral. También se pudo ver que en los casos que se les aplicó a los embriones no se presentó ninguna característica, como tampoco en los inóculos hechos de líquidos a los cultivos celulares.

Aún cuando se extremaron las precauciones de esterilidad y del uso del antibiótico se observó la presencia de un gran número de bacterias

por lo que se cree que había alguna bacteria resistente al antibiótico utilizado, por lo que se propone el uso de antibogramas, que en este caso no se realizó.

Probablemente las técnicas utilizadas no fueron las adecuadas y no se vió favorecido el crecimiento del virus.

Puesto que la bibliografía no reporta una metodología más adecuada y accesible para lograr el crecimiento del virus de abejas, se procedió a hacer una adaptación.

En las últimas consultas bibliográficas se supo que existe una manera para la identificación de la infección en comparación con la infección bacteriana, que consiste en introducir un hisopo en las celdas de las larvas, cuando se trata de una infección bacteriana se extiende un hilo viscoso y en el caso de la infección viral no se presenta.

Por otro lado, al tomar la decisión de realizar pruebas bacteriológicas se pudo llegar a



determinar el tipo de bacterias en las abejas infectadas. Ya que en los estudios realizados no se llega a la especie. Y por otro lado las pruebas bioquímicas son más completas de las que se han presentado en otros trabajos.

Asimismo, podría servir para seguir buscando la presencia del virus y poder aclarar si se presenta o no esta enfermedad, ya que el uso de nuevas técnicas para el diagnóstico, tanto en cultivo celular como en otros tipos de pruebas, así como un muestreo más amplio en otras regiones de nuestro país podrían ser útiles para ver si esta enfermedad causa grandes pérdidas tanto en la populación como en la producción de la miel.

Por el momento, con lo que se conoce y con lo que se realizó en este trabajo, no se puede decir que esta enfermedad este ausente, sin embargo, se pudo observar que un gran número de infecciones son provocadas por bacterias que pertenecen a la clasificación encontrada para todo el grupo estudiado.

Aún falta mucho por conocer acerca de las infecciones en las abejas y con qué frecuencia se presentan en nuestro país, ya que muchas veces por temor a las autoridades sanitarias, los productores no reportan esta enfermedad.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Aguayo, R.C. 1964. Aislamiento e identificación del agente etiológico de la Loque A. en México y pruebas de sensibilidad a Sulfamidas y antibióticos. Tesis profesional. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M. 49 pp.
- Bailey, L. 1963. Virus Infections Diseases of Honey-Be. Land Books-Smiter. 176 pp. London.
- Bailey, L. 1970. A simple Way Purifing Several Insect Viruses. Journal of General Virology 6:175-177.
- Bailey, L., Brenda, V.B. et. al. 1981. The prevalence of viruses of Honey Bees Britain. Annales of applied Biology. 109-118.
- Bailey, L., et. al. 1979. Samll virus like particles in Honey-bee Associated with a previously undescribed diseases. Journal General Virology. 46:149-155.
- Bailey, L., Brenda, V.B., R.D. Woods. 1976. An iridovirus from Bees. Journal of General Virology. 31: 459-461.
- Bailey, L., J. M Carpenter., R.D. Woods., 1979. Egypt Bee Virus and Australian Isolates of Kashmir Bee Virus. Journal of General Virology. 43: 641-647.
- Bailey, L., A.A. Gibs., R.D. Woods. 1963. Two viruses from adult honey bee. Virology. 21:390-395.

Bailey, L., R.D. Woods. 1974. Sacbrood virus of the larval honey bee. Virology 23: 425-429.

Bailey, L., R.D. Woods. 1974. Three Previously Undescribed Virus from the Honey bee. Journal of General Virology. 25: 175-186.

Bailey, L., R.D. Woods, 1977. Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on Sacbrood and Acute bee-paralysis viruses. Journal of General Virology. 37:175-182.

Breed, R.E., P. Murray, B.A. Hitchery. 1973. Manual of determinative Bacteriology.

Cunningham, C.H. 1971. Virología Práctica. Ed. Acribia Zaragoza España. 6o. edición.

Davidsohn, I., Henry, J.B., 1978. Diagnóstico Clínico por el laboratorio. Barcelona España, 6a. edición.

Grace, T.D.C., 1969. Insect Tissue culture and its use in virus research. Advances virus Research. 27: 201-220.

Gusmán, N.E., 1981. Contribución al estudio de la Nosemiasis de las abejas. Tesis profesional. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 47 pp.

Glauffret, A., F. Poutiers., M. Rousseau. 1968.

Infections in vitro De cultures D. Apis Mellifera  
par Differentes Virus de cer Hymenoptere. Bullifini  
Apicolete de Documentation Scientifique et  
technique et d. 11-1: 13-19.

Hsiung, G.D. 1964. Diagnostic Virology. New Haven and  
London, Yale University Press, 124 pp.

Kruse, F.P., J.R., M.K. Patterson. 1973. Tissue  
Culture and Aplications. Academic press New York  
San Francisco, London. 150-155.

Langstroth, L.L., 1953. La abeja y la colmena. Editorial  
Barcelona.

Longworth, J.F., C.C. Payne, R. Macleod. 1973. A studies  
on a virus isolated from Gonomata podocarp. Journal  
of General Virology. 18: 119-125.

Ministry of agriculture Fisheries and Food. 1959. Diseases  
of Bees. Bolletin Num. 100, London.

Morse, A.R. 1978. Honey Bee Pest, Predators and Diseases.  
University Press Ithaca. London Chapte. 2:24-42.

Newman, J.F.E., et. al. 1973. Some Phisic Chemical  
Propertiers of two Honey bee Picornavirus. Journal  
of General Virology. 19:405-409.

Rowlands, D.J., D.V. Sangar., F., Brown. 1971.

Bouyant Density of Picornavirus in Caesium Salts.

Journal of General Virology. 113: 141-152.

Stanley, M. 1968. Initial Results of Honey Bee

Tissue Culture. Bulletin Apicole De Documentation

Scientifique et Technique et d. 11-1.

Toumanoff, C. 1951. Les Maladies Des Abeilles.

Moderne Chartres, b, place Mareeau. Institute

Pasteur de Paris. 364: 178-181.

Vago, C., M. Bergoin. 1968. Viruses of Vertebrates.

Advances Virus Research. 13: 247-303.