



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTANDARIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA PARA LA DETERMINACIÓN DE VIRUS COMUNES EN  
ABEJAS DE MIEL EN LA SIERRA ECUATORIANA

AUTOR

Jorge Vinicio Ávalos Valenzuela

AÑO  
2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTANDARIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA  
PARA LA DETERMINACIÓN DE VIRUS COMUNES EN ABEJAS DE MIEL EN  
LA SIERRA ECUATORIANA

“Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología”

Profesor Guía  
MSc. María Gabriela Granja Bastidas

Autor  
Jorge Vinicio Ávalos Valenzuela

Año  
2018

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

"Declaro haber dirigido el trabajo, Estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa para la determinación de virus comunes en abejas de miel en la sierra ecuatoriana, a través de reuniones periódicas con el estudiante Jorge Vinicio Ávalos Valenzuela, en el semestre 2018-1, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación"

---

María Gabriela Granja Bastidas  
Máster en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina  
Especialidad: Patología Molecular  
CI. 171299514-9

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR**

"Declaro haber revisado este trabajo, Estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa para la determinación de virus comunes en abejas de miel en la sierra ecuatoriana, del estudiante Jorge Vinicio Ávalos Valenzuela, en el semestre 2018-1, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

María Alejandra Cruz Salazar

Master en Ingeniería en Bioprocesos y Biotecnología

171992857-2

## **DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO**

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”

---

Ana Dolores Garrido Haro  
Máster en Biología Molecular  
CI: 171849692-8

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

---

Jorge Vinicio Ávalos Valenzuela

CI. 172178218-1

## **AGRADECIMIENTOS**

Mis más sinceros agradecimientos a quienes a continuación menciono, mi familia por el apoyo que durante esta etapa de mi vida fueron el pilar fundamental para cumplir mis metas.

Mvz. Hugo Rosero y PhD. Francisco Reynaldi, por su colaboración y el conocimiento brindado. Agrocalidad, por abrirme las puertas y a quienes conforman el laboratorio de biología molecular por el conocimiento brindado.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo dedico a mis padres, hermanos y sobrinos, que con mucho cariño y esfuerzo siempre estuvieron guiándome para ser una mejor persona. En los momentos de dificultad siempre pudieron brindarme apoyo y un grato consejo con mucho cariño. Siempre animándome a luchar por mis objetivos, gracias por su amor, consejos y apoyo.



## RESUMEN

El crecimiento paulatino en la mortalidad de *Apis mellifera*, ha levantado grandes preocupaciones entre los investigadores a nivel mundial, llevando a buscar un método eficaz y eficiente para la determinación de virus en colmenas de abejas como es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El objetivo de esta investigación fue establecer las condiciones de la técnica de reacción en cadena polimerasa para la detección de los virus en abejas Virus de la Paralisis Aguda (ABPV) y Virus de las Alas Deformadas (DWV). Se realizó diferentes ensayos para establecer las condiciones necesarias como la especificidad y sensibilidad de la técnica. Se obtuvo una temperatura de hibridación de 53,4 °C, la concentración de MgCl<sub>2</sub> fue de 1 mM, mientras que la concentración de cebadores fue de 0,2 μM. El límite de detección para el virus DWV es de 10<sup>-2</sup> ng/μl y para ABPV es de 10<sup>-3</sup> ng/μl. Este método probó ser una herramienta rápida, confiable y específica que permitirá el inicio para la realización de investigaciones con el fin de determinar la prevalencia de los virus en las colmenas de la sierra ecuatoriana, así como posibles factores asociados con estos patógenos.

**Palabras Claves:** *Apis mellifera*, PCR, DWV, ABPV, Ácido ribonucleico ARN.

## ABSTRACT

Many concerns has raised worldwide among researchers due to the gradual growth in mortality of *Apis mellifera*, which has lead to look for an effective and efficient determination method of viruses in bee hives such as Polymerase Chain Reaction (PCR). The objective of this investigation was to establish the conditions for the detection of acute bee paralysis virus (ABPV) and Deformed Wing Virus (DWV) viruses in bees with the polymerase chain reaction technique. Different tests were carried out to establish the specificity and sensitivity of the technique. The temperature obtained for the hybridization was 53.4°C, the concentration of MgCl<sub>2</sub> was 1 mM, while the concentration of primers was 0.2 μM. . The limit of detection for the DWV virus was 10<sup>-2</sup> ng / μl and for ABPV it is 10<sup>-3</sup> ng / μl. The PCR technique proved being a fast, specific and reliable tool, which will allow to start new investigations in viruses' prevalence in beehives all over the country.

**Keywords:** *Apis mellifera*, PCR, DWV, ABPV, Ribonucleic Acid (RNA).

# ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema.....	3
1.3. Objetivos.....	5
1.3.1. Objetivo general.....	5
1.3.2. Objetivo específico.....	5
1.4. Justificación.....	5
2. Marco Teórico.....	6
2.1. <i>Apis mellifera</i> .....	6
2.1.1. Morfología de <i>A. mellifera</i> .....	7
2.1.2. Organización social dentro de la colmena.....	8
2.2. Apicultura.....	10
2.2.1. Historia de la Apicultura.....	10
2.2.2. Importancia de la apicultura a nivel mundial.....	11
2.2.2.1. Importancia de la apicultura en el Ecuador.....	11
2.3. Declive y mortalidad de <i>A. mellifera</i> .....	12
2.4. Patologías virales más comunes de <i>A. mellifera</i> .....	13
2.4.1. Virus de las alas deformadas (DWV).....	14
2.4.2. Virus de la parálisis aguda (ABPV).....	15
2.5. Métodos de diagnóstico de patologías virales en <i>A. mellifera</i> .....	16
3. Diseño del plan experimental.....	18
4. Procedimientos.....	19
4.1. Población y muestra.....	19
4.2. Materiales y métodos para la obtención de los datos.....	20
4.2.1. Diseño de cebadores.....	20
4.2.2. Extracción y cuantificación de ARN de controles y muestras.....	21

4.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa retro transcriptasa (RT).....	21
4.2.4.1. Introducción de la optimización de la reacción en cadena de la polimerasa. ....	21
4.2.4.2. Gradiente de temperatura de hibridación de los cebadores .....	22
4.2.4.3. Gradiente de cloruro de magnesio .....	23
4.2.4.4. Gradiente de cebadores .....	26
4.2.4.5. Ensayo de sensibilidad analítica de la prueba de PCR .....	27
4.2.4.6. Optimización PCR múltiple .....	29
4.2.4.6.1. Introducción de la optimización de PCR múltiple .....	29
4.2.4.6.2. Sensibilidad de la prueba PCR múltiple .....	29
4.2.4.6.3. Especificidad de la prueba .....	29
4.2.4.6.4. Validación de la PCR múltiple optimización .....	30
4.2.4.7. Electroforesis de los productos de PCR .....	30
<b>5. Resultados y Discusión .....</b>	<b>31</b>
5.1. Extracción de ARN .....	31
5.2. Estandarización de la reacción en cadena polimerasa.....	32
5.2.1. Gradiente de temperatura de alineamiento .....	32
5.2.2. Gradiente de cloruro de magnesio .....	34
5.2.3. Gradiente de cebadores .....	35
5.2.4. Sensibilidad analítica por dilución seriada de ARN .....	36
5.2.5. Optimización PCR múltiple .....	39
5.2.5.1. Sensibilidad de la PCR múltiple .....	39
5.2.5.3. Validación de la reacción en cadena de la polimerasa con muestras de campo .....	43
<b>6. Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>47</b>
6. 1. Conclusiones .....	47
6.2. Recomendaciones .....	47
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>49</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>54</b>

## 1. Introducción

### 1.1. Antecedentes

La disminución de la población de abejas en los últimos años ha generado preocupación y significantes daños alrededor de todo el mundo, lo cual ha conllevado a una disminución de la polinización en plantas, producción de miel y sus derivados. Dentro de la industria agrícola las abejas cumplen la función de polinizadores naturales, transportando el polen entre las distintas especies vegetales para que pueda ocurrir la fecundación en diferentes cultivos alrededor del mundo, generando así beneficios económicos en el sector de la agricultura (Morse y Calderone, 2000, p. 2; Wu-Smart y Spivak, 2016, pp. 1–3).

Actualmente existen diferentes técnicas usadas alrededor del mundo para la identificación de varios patógenos en *A. mellifera*, como las que se encuentran descritas por Allen y Ball en 1996, que incluye el uso de la microscopía electrónica para poder observar partículas de virus de kashimir o el virus de las alas deformadas y la técnica ELISA (de sus siglas en inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assa*) para la identificación de virus de parálisis en abejas.

Existen distintas técnicas a nivel internacional que permiten identificar virus en estos organismos de una manera más rápida, dentro de estas se puede encontrar técnicas de biología molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa con retrotranscripción (de sus siglas en inglés *RT-PCR*), que permite realizar estudios sobre los virus y las afectaciones en que estos pueden ocasionar en abejas. En un trabajo descrito en el año 2002 por Benjeddou y colaboradores, se pudo determinar la presencia de dos virus, el virus de las celdas reales negras (de sus siglas en el inglés *BQCV*) y el virus de las parálisis aguada (de sus siglas en el inglés *ABPV*), usando la técnica de RT-PCR. Un estudio realizado posteriormente con RT-PCR, logró detectar el virus de la cría ensacada (de sus siglas en inglés *SBV*), BQCV y ABPCV (Grabensteiner, Bakonyi, Ritter, Pechhacker y Nowotny, 2007, pp. 222–225).

En una investigación realizada para la identificación de virus de abejas en 36 colmenares aparentemente sanos en Francia, se observó la presencia de estos en todas las colmenas analizadas. El 97% de los colmenares presentaban el virus de las alas deformadas (de sus siglas en inglés DWV), el 86% el BQCV, el 58% ABPV, el 28% el *Chronic Bee Paralysis virus* (de sus sigla del inglés CBPV) y el 17% el virus *Kashmir* (de sus siglas del inglés KBV), llegando a la conclusión de que es posible encontrar estos virus sin importar la región geográfica. (Tentcheva et al., n.d., pp. 7185–7187).

En un estudio realizado en Estados Unidos se demostró que una abeja podría albergar hasta 4 virus simultáneamente, identificándose la presencia de ABPV, KBV, SBV y BQCV por medio de PCR. Cabe recalcar, que en esta investigación se logró la estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa múltiple (de sus siglas en inglés *mPCR*) para la detección de estos agentes patógenos simultáneamente, gracias a lo cual la vigilancia de estas enfermedades virales ha podido ser controlada parcialmente en ese país (Yanping Chen et al., 2004, pp. 84–93).

El interés sobre los virus que afectan a las abejas se ha ido expandiendo, se busca identificar de una manera rápida y sensible dichas patologías. Un estudio realizado en el año 2005 medio de la técnica de la reacción en Cadena de la Polimerasa Retrotranscriptasa Inversa múltiple (mRT-PCR), demostrar la posibilidad de detectar de manera simultánea la presencia de ABPV, BQCV y KBV, en dicho estudio se realizó un análisis de 40 abejas, 5 abejas dieron positivas para KBV, 1 abeja presentó BQCV y ABPV simultáneamente y 34 fueron negativas para la presencia de virus (Topley, Davison, Leat, y Benjeddou, 2005, pp. 763–767).

A su vez, en Argentina (Sguazza, Reynaldi, Galosi, & Pecoraro, 2013, pp. 102–115) se realizó un análisis de 170 abejas, y se demostró la presencia de los virus DWV, CBPV SBV, ABPV, BQCV y KBV de un total de siete investigados,

en donde se incluía además el virus israelí de parálisis aguda (de sus siglas en inglés IAPV), por medio de mPCR, el cual no pudo ser detectado.

Dentro del Ecuador la entidad encargada del control y calidad de productos agropecuarios del país es la institución del estado Agrocalidad la cual se encarga de la sanidad apícola y control de plagas de las mismas. El desarrollo del control de patógenos en la parte apícola se encuentra establecido para bacterias y parásitos, sin embargo para la determinación de virus no existe una técnica implementada dentro de dicha institución, que permita identificar y controlar enfermedades producidas por virus ocasionando pérdidas al sector apícola (Agencia ecuatoriana de aseguramiento de la calidad del agro, 2016a, pp. 3–12) .

## **1.2. Planteamiento del problema**

En las últimas décadas, la apicultura a nivel nacional e internacional se encuentra amenazada por el aumento de la mortalidad en las abejas, generando una preocupación a escala mundial, lo que ha generado una dramática disminución en *A. mellifera* alrededor del mundo y en la mayoría de los casos se desconoce con certeza sus causas (Neumann y Carreck, 2010).

Es importante recalcar que las abejas melíferas cumplen un papel vital en la producción agrícola y en la economía mundial. Durante el desarrollo de la apicultura se evidencia una notable disminución de la población melífera, sin conocer las causas. Las primeras muertes de colmenas fueron reportadas en el año de 1965 en USA, lo cual generó una gran preocupación para la comunidad científica y apícola; en el 2007 se registraron pérdidas del 49 % de colmenas en países de América del norte y Europa. Para el año 2009 se reportó una pérdida de colonias del 53 % en toda Europa y en países del medio Oriente hasta un 85% de colmenas fueron reportadas como perdidas, así como también un 25% de pérdida se registró en Japón. Los datos más recientes indican que en el invierno de 2016 Canadá perdió el 25.1% de colmenas a nivel nacional y en Ecuador se estimó que la pérdida fue hasta de un 60 % anual al

concluir la época de invierno (Agencia ecuatoriana de aseguramiento de la calidad del agro [AGROCALIDAD], 2016b, pp. 2–7; Neumann & Carreck, 2010, pp. 1–4).

De acuerdo a los datos presentados en los párrafos anteriores, se pone en evidencia que la práctica apícola se encuentra amenazada por el aumento de la mortalidad de las abejas, lo que ocasiona pérdidas representativas de colmenas por el síndrome denominado colapso de colmenas, lo que genera una amenaza a la seguridad alimentaria y al ecosistema (Yanping Chen et al., 2004, pp. 85–88; Wu-Smart y Spivak, 2016, pp. 1–4)

El declive de las abejas de miel a escala global es provocado por varios factores como la contaminación ambiental, cambio climático, agrotóxicos en cultivos, (Vásquez et al, 2006) y la susceptibilidad a los distintos patógenos como virus, parásitos, bacterias y hongos (Reynaldi, Sguazza, Pecoraro, Tizzano, y Galosi, 2010, pp. 749–751; Agencia ecuatoriana de aseguramiento de la calidad del agro [AGROCALIDAD], 2016b, pp. 1–4). Se considera que, la carga patógena juega un papel crucial, y los virus son los principales causantes del declive de las colmenas de las abejas de miel (Morse y Calderone, 2000, p. 2). El papel que presentan los virus en la generación de diferentes patologías en las abejas es una fuente creciente de preocupación (Meeus, Smagghe, Siede, Jans, y de Graaf, 2010, pp. 200–202). Las evidencias recientes demuestran que las enfermedades producidas por virus pueden ser más graves que las causadas por parásitos (Wu-Smart y Spivak, 2016, p. 2).

Si bien el Ecuador posee una normativa pre establecida y con métodos para la detección de patógenos como bacterias, hongos y parásitos, en abejas hasta la actualidad no existen metodologías para la detección de patologías virales. Los métodos que han sido utilizados hasta el momento han sido de manera empírica, por el conocimiento del apicultor en el manejo de colmenas (Agencia ecuatoriana de aseguramiento de la calidad del agro, 2016b, pp. 1–8; VanEngelsdorp et al., 2017, pp. 1–4). El control y diagnóstico de las



enfermedades en abejas dentro de una colonia presenta un gran nivel de dificultad, ya que para poder aplicar un correcto método de diagnóstico se debe tomar en cuenta varios factores como la estación ambiental, estrés, escases de alimento pillaje entre colmenas, deriva de abejas y la sobreexposición a enfermedades (Agencia ecuatoriana de aseguramiento de la calidad del agro [AGROCALIDAD], 2016b, pp. 1–4).

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Estandarizar la reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de virus comunes en abejas de miel en la sierra ecuatoriana.

#### **1.3.2 Objetivo específico**

- Determinar las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de virus comunes en abejas de miel en la sierra ecuatoriana.
- Comprobar la especificidad y sensibilidad analítica de la técnica estandarizada.

### **1.4. Justificación**

Por lo antes expuesto, se evidencia la necesidad de desarrollar nuevas formas que permitan la identificación de virus en abejas de miel de manera eficaz y eficiente para poder aplicarlos en el territorio nacional. El diagnóstico de enfermedades virales, en la mayoría de los casos se realiza de una manera visual, más no con métodos que sean eficaces y con metodología pre probada, obteniendo diagnósticos erróneos y por tanto empleando tratamientos inadecuados dentro de las colmenas generando diagnósticos poco confiables.

La poca experiencia al momento del diagnóstico puede llegar a la confusión de enfermedad y ser diagnosticada con una enfermedad errónea lo que afectaría directamente y en un gran porcentaje a la polinización y a la producción de miel, conllevando a que los apicultores tengan un aumento de costos en sus procesos de producción (Sandoval y Calispa, 2015, pp. 29–33; Sandoval y Calispa, 2015, pp. 28–33).

Cabe mencionar que la polinización permite que exista un equilibrio dentro del mundo vegetal y animal, por lo tanto, la gran cantidad de mortalidad que existe en las abejas de miel, debe ser un factor que llame la atención para implementar nuevos métodos de detección de enfermedades y desarrollar métodos de tratamiento adecuados para ellas.

El proceso de estandarización permite optimizar y acoplar variantes a una técnica ya establecida. El uso de PCR permitirá identificar los virus presentes en los apiarios. La aplicación de esta técnica generará reducción en los costos y en el tiempo para la identificación de los virus. En Ecuador actualmente, no se emplea esta metodología para la identificación de los virus en abejas de miel (Agencia ecuatoriana de aseguramiento de la calidad del agro [AGROCALIDAD], 2014), como se aplica en otros países, en los cuales se utiliza PCR múltiple con cebadores específicos, el cual permite detectar los distintos virus en núcleos de abeja, evitando así la distribución o comercialización de las mismas, si se encuentran infectadas (Meeus, Smagghe, Siede, Jans, y de Graaf, 2010, pp. 203–205).

## **2. Marco Teórico**

### **2.1. *Apis mellifera***

La abeja de miel o abeja melífera es un animal que pertenece a la clase insecta, al orden Hymenoptera, de la familia *Apidae* y del género *Apis*. Dentro del género *Apis* se puede encontrar nueve especies de abejas y estas se

clasifican en dos dependiendo del tamaño y de tipo de nido (Padilla, F y López, A, 2003, pp. 201-203). Los nidos de *A. mellifera* se encuentran en espacios naturales cerrados como grietas en árboles o rocas, lo que ha permitido que el hombre pueda aprovecharlas y obtenerlas en colmenas cerradas. De las nueve especies de *Apis* la que presenta mayor distribución es *A. mellifera* que se puede encontrar en varios lugares del mundo gracias a la exportación de colmenas, podemos encontrarla en África, Asia, América y Europa, Oriente medio y Oceanía (Reyes y Cano, 2000, pp. 25–43; Jean y Le Conte, 2007, pp. 18–33).

### **2.1.1. Morfología de *A. mellifera***

El cuerpo de la abeja de miel se divide en tres: cabeza, tórax y abdomen (Figura 1). La cabeza tiene forma triangular invertida, en esta se encuentra el órgano de la visión, el aparato bucal y las antenas. El órgano de la visión está constituido por ocelos y ojos compuestos. Los ocelos u ojos simples se encuentran en la parte superior de la cabeza, entre los ojos compuestos. Los ojos compuestos tienen una estructura muy sencilla recubierta por pelos táctiles. (Padilla, F y López, A, 2003, p. 201; Jean y Le Conte, 2007, pp. 59–70)

El aparato bucal de la abeja es del tipo lamedor. Este se encuentra constituido por un labio superior, mandíbulas y epifaringe. Las mandíbulas varían dependiendo de la abeja, en el caso de ser una obrera las mandíbulas son anchas, en forma de cuchara y estrechas en el medio. Las mandíbulas de la reina y el zángano son más velludas y dentadas. Las mandíbulas se encuentran suspendidas en la parte inferior de la cabeza a ambos lados de la boca. La epifaringe se encuentra unida a la parte interior del labro como si fuera de la parte superior de la boca. El labio superior o labro es un esclerito impar variable con movimientos de arriba abajo. La epifaringe es una pieza esclerosada que cumple la función de papilas gustativas (Padilla, F y López, A, 2003, pp. 202-204; Jean y Le Conte, 2007, pp. 62–64; Argüello, 2010, pp. 9–13; Llorente, 2017).



*Figura 1.* Cuerpo de *A. mellifera* dividido en cabeza, tórax y abdomen. Tomado de Llorente, 2017.

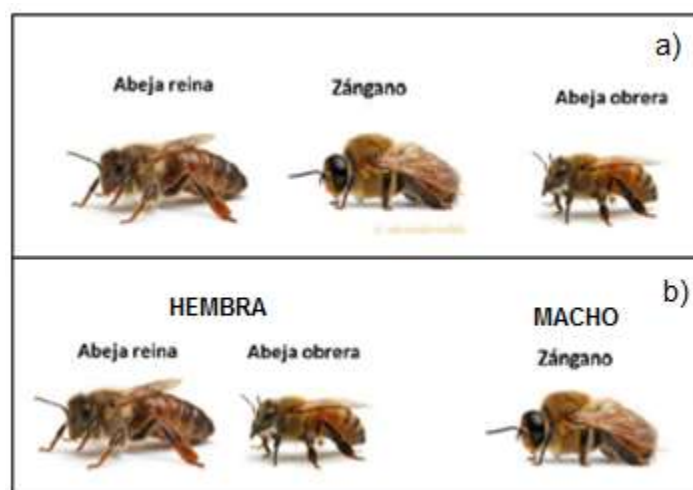
Las abejas presentan dos antenas que van desde la parte central de la cara, y están formadas por una parte rígida y otra flexible que se divide en segmentos denominados artejos. Las antenas presenta numerosos órgano sensoriales en forma pilosa y en poros que son los responsables del olfato, oído y tacto, estos varían dependiendo de si es reina, obrera o zángano (Padilla, F y López, A, 2003, pp. 202-203; Jean y Le Conte, 2007, p. 62; Argüello, 2010, pp. 9–13)

El tórax está dividido en segmentos conocidos como protórax, mesotórax y metatórax. En cada uno de estos lleva un par de patas y en el segundo y tercero llevan un par de alas cada uno. Las abejas presentan tres pares de patas, estas tiene la función de almacenar polen y propóleos. Las abejas presentan dos pares de alas, un par grande en el metatórax y otro más pequeño en el mesotórax, están formadas por redes de nervaduras quitinosas. El abdomen de las abejas está constituido por 9 segmentos. El abdomen se encuentra cubierto de pelos y podemos encontrar en el mismo las glándulas cereras, glándulas nosanoff y el aguijón (Padilla, F y López, A, 2003, pp. 202-205; Jean y Le Conte, 2007, pp. 63–68; Argüello, 2010, pp. 10–13).

### **2.1.2. Organización social dentro de la colmena**

A las abejas de miel se las puede clasificar de dos formas dentro de la colmena, por su jerarquía o por el sexo (Figura 2). Por la jerarquía, refiriéndose al papel que desempeña dentro de la colmena, y por el sexo en hembras y

machos. Mediante la clasificación por el sexo las hembras se clasifican a su vez por abejas obreras y reina (Argüello, 2010, pp. 7–9), la diferencia entre estas, radica en que las abejas obreras no tienen capacidad reproductora y la reina es la única hembra fértil de toda la colmena. Los machos o zánganos cumplen la única función de reproducirse con la abeja reina. Esto significa que por la jerarquía existen tres tipos de abejas: la reina, abejas obreras y zánganos (Padilla, F y López, A, 2003, pp. 201).



*Figura 2.* Clasificación de las abejas dentro de la colonia por jerarquía y sexo. Adaptado de Llorente, 2017.

- a) Clasificación por su jerarquía.
- b) Clasificación por su sexo.

La reina es la única hembra que puede producir huevos fértiles y mediante la emisión de feromonas maneja la colmena, evitando así la formación de nuevas reinas (Argüello, 2010, pp. 7–9). Las abejas reinas nacen en celdillas llamadas realeras que son más grandes que una celdilla de una obrera. Además son alimentadas por jalea real toda su vida por las abejas nodrizas, lo cual ayuda al desarrollo del aparato reproductivo. El zángano cumple la función de fecundar a la abeja reina mediante el vuelo nupcial, solo los zánganos más fuertes y con mayor vigorosidad pueden ejercer esta función (Jean y Le Conte, 2007, pp. 72–80).

Las abejas obreras pueden dividir su trabajo dentro del colmenar dependiendo de la edad, de hecho, dentro de este pueden existir entre 20 a 80 mil. Existe una subclasificación para las abejas que incluye: la abeja limpiadora, la abeja nodriza, la abeja guardiana, la abeja constructora, la abeja reguladora de temperatura, abejas exploradoras (Padilla, F y López, A, 2003, pá 207).

## **2.2. Apicultura**

La apicultura es una técnica que se encarga de criar abejas para la obtención de un beneficio para el ser humano (Argüello, 2010, pp. 1–4). La abeja de miel *A. mellífera* es considerada como el insecto más útil para el ser humano, debido a su papel en la polinización de plantas con flores de importancia agrícola y también en la apicultura (Bradbear, 2005, pp. 1–7).

### **2.2.1. Historia de la Apicultura**

La palabra apicultura proviene de dos términos *apis*: abeja y cultura: cultivo. Es una ciencia descrita como la crianza de abejas para obtener productos como la miel, cera, propóleo, jalea real, polen y apitoxinas (Cabrera, 2012, pp. 3–4; Llorente, 2017).

Existen varias evidencias sobre la crianza de las abejas y el aprovechamiento del hombre que datan del mesolítico, donde el ser humano inicio la apicultura con la recolección de miel de panales silvestres entre fisuras de rocas y grietas en árboles. También se han encontrado restos arqueológicos que datan de 2500 A.C. en China, jeroglíficos en Egipto y representaciones en cuevas en Sudáfrica (Bellez, 1997, pp. 321–324). La apicultura fue evolucionando en el transcurso del tiempo, para después tecnificarse y desarrollarse hasta convertirse en lo que hoy en día se conoce como tal.

Antes de la introducción de las abejas europeas, en el Ecuador existía la presencia de abejas Meliponas o abejas sin aguijón. La apicultura dentro del Ecuador inicia en el año de 1870 por los Hermanos Cristianos, con la traída de

colmenas europeas en barco desde Francia a Cuenca y después su colonización en el regiones rurales del país aprovechando los recursos naturales (Cabrera, 2012, pp. 1–3).

### **2.2.2. Importancia de la apicultura a nivel mundial**

Dentro de la actividad apícola, la crianza de la abeja *A. mellifera* presenta dos beneficios en aspectos diferentes, pero que se complementan. En primer lugar, la obtención de productos por el manejo de colonias de abejas y la venta de los mismos para la obtención de beneficios económicos. Siendo dentro de estos productos la miel el producto primario y como subproductos el propóleo, cera, polen y apitoxinas. El segundo beneficio abarca la polinización que realizan las abejas, produciendo una ganancia indirecta que aumentan el rendimiento de cultivos agrícolas (Tantillo et al., 2015, p. 157).

#### **2.2.2.1. Importancia de la apicultura en el Ecuador**

La demanda nacional en el Ecuador de miel tiene un estimado anual de 600 toneladas métricas, en el ámbito industrial se diversifica de la siguiente manera: la miel envasada 65%, jarabes 20%, venta directa de miel 10%, laboratorios 4% y apiterapistas 1%. El consumo de miel dentro de la población ecuatoriana es elevada, presenta un consumo de personas frecuentes del 13%, rurales 13%, consumidores de bajo ingreso el 31% y consumidores esporádicos el 43%. Por lo cual, la producción nacional de miel no satisface la demanda, existiendo la necesidad de importar miel y sus derivados de otros países para cubrir la misma, los cuales presentan modificaciones, siendo esto productos de mala calidad. (Agencia ecuatoriana de aseguramiento de la calidad del agro[AGROCALIDAD], 2016a, pp. 2–4).

En el Ecuador existe un total de 12.185 colmenas y 730 apicultores registrados (Tabla 1). La sierra ecuatoriana presenta el 68% de colmenas a nivel nacional seguido por la costa que tiene un 28% y un 4% de la Amazonía. La provincia de Pichincha situada al norte de la sierra ecuatoriana tiene el mayor número de

colmenas en la sierra Ecuatoriana con un total de 2775 colmenas registradas (Agencia ecuatoriana de aseguramiento de la calidad del agro, 2016a, pp. 2–3).

Tabla 1.

*Número de colmenas en la sierra, amazonia y costa ecuatoriana.*

<b>Distribución de colmenas a nivel nacional.</b>					
<b>Sierra ecuatoriana</b>		<b>Amazonia ecuatoriana</b>		<b>Costa ecuatoriana</b>	
<b>Provincia</b>	<b>Número de colmenas</b>	<b>deProvincia</b>	<b>Número de colmenas</b>	<b>deProvincia</b>	<b>Número de colmenas</b>
Azuay	494	Napo	18	El Oro	220
Bolívar	119	Orellana	2	Esmeraldas	87
Cañar	115	Pastaza	74	Guayas	957
Carchi	974	Sucumbíos	16	Los Ríos	449
Chimborazo	267	Zamora Chinchipe	214	Manabí	1418
Cotopaxi	224	Morona Santiago	141	Santa Elena	184
Imbabura	1025			Santo Domingo	86
Loja	2146				
Pichincha	2775				
Tungurahua	180				
<b>TOTAL</b>	<b>8319</b>	<b>TOTAL</b>	<b>465</b>	<b>TOTAL</b>	<b>3401</b>

Adaptado de Agrocalidad, 2017.

### **2.3. Declive y mortalidad de *A. mellifera***

Las abejas son consideradas como los insectos de mayor importancia para el hombre, por lo que es relevante entender las distintas patologías que pueden afectar y llegar a causar grandes daños a estos insectos (Reyes & Cano, 2000, pp. 3–5). Las abejas, como todo organismo vivo son susceptibles a patógenos como bacterias, hongos, parásitos y virus, estos contribuyen a la actual disminución de las poblaciones de estos (Runckel et al., 2011, pp. 2–5; Reynaldi, Sguazza, Pecoraro, Tizzano, y Galosi, 2010, pp. 103–104)

Del 2012 al 2013 el Reino Unido perdió el 29% de población de abejas, en Bélgica una pérdida de 34%, Italia el 5%, en Francia fue del 14%. En Estados Unidos en los años 2014 y 2015 los apicultores perdieron 40,6% de sus



colmenas y para el período de 2015 a 2016 perdieron 44,1% de sus colmenas (BeelInformed, 2017). En Ecuador la pérdida de colmenas llega hasta el 60% anual (Agencia ecuatoriana de aseguramiento de la calidad del agro [AGROCALIDAD], 2016b, pp. 4–7).

En los últimos años se ha evidenciado un incremento en la mortalidad de colonias en países europeos y norte américa, lo que ha alarmado a la comunidad de apicultores, así como a la comunidad científica. Este suceso se ha distinguido por no presentar ninguna causa conocida, y ha sido denominado como el Síndrome de Despoblamiento de Colmenas (de sus siglas en inglés CCD), el mismo que fue identificado por primera vez en 2006. CCD se caracteriza por la rápida muerte de las abejas adultas dentro y fuera de la colmena (Cox-Foster et al., 2007, p. 283; de Smet et al., 2012, p. 1).

Numerosos factores han sido implicados al intentar explicar el CCD, incluyéndose entre estos: la mala nutrición de la colmena, presencia de parásitos y hongos, interacción con pesticidas de abejas adultas, así como cargas virales y bacterianas. Las abejas a menudo presentan cargas de patógeno relativamente elevadas, lo que sugiere una debilidad de la respuesta inmune (VanEngelsdorp et al., 2017, pp. 1–7).

#### **2.4. Patologías virales más comunes de *A. mellifera***

La abeja melífera puede albergar varios tipos de virus que en la mayoría de los casos no provocan síntomas visibles (Yang Chen y Siede, 2007, pp. 34–36). Sin embargo, estados asintomáticos de estos, comúnmente terminan presentando efectos perjudiciales para la colmena. Observar síntomas en abejas individuales resulta imposible para el investigador, mientras que la acumulación de estos trastornos puede inducir a la muerte de toda la colonia. Esto debido a que después de varios meses sin presencia de síntomas evidentes se genera una epidemia en todo el colmenar (Allen & Ball, 1996; Benjeddou, Leat, Allsopp, y Davison, 2002; Chen et al., 2004; Topley et al., 2005).

Los virus que afectan a nivel mundial a las abejas son alrededor de 24, la mayoría de estos ya se encuentran clasificados oficialmente y algunos de estos virus pueden presentar relación con el acaro *V. destructora*, ya que este acaro actúa como el huésped y vector de transmisión de los mismos. (de Smet et al., 2012, pp. 1–5; Runckel et al., 2011, pp. 2–5)

Los virus más comunes que afectan a las abejas de miel en el continente Americano son: Virus Israelí de la parálisis IAPV, DWV, SBV, ABPV, BQCV, CBPV y virus de kashemira (de sus siglas en inglés KBV) (Yang Chen y Siede, 2007, p. 34; Sguazza, Reynaldi, Galosi, y Pecoraro, 2013, p. 104). Diversos estudios se han demostrado que varios virus pueden infectar al mismo tiempo la misma colmena, o en ocasiones se puede encontrar en solo individuo varios virus (Tentcheva et al., n.d., pp. 7185–7187).

#### **2.4.1. Virus de las alas deformadas (DWV)**

El virus DWV fue aislado por primera vez en abejas adultas en Japón a principios de 1980. Inicialmente se relacionó con el virus egipcio (de sus siglas en inglés *EV*) nombrándola como variante japonesa EV. Posteriormente, se descubrió que eran distintos serológicamente y se relacionó su nombre con los síntomas que las abejas presentaban al momento de la infección en las colmenas. Actualmente, DWV se encuentra distribuido a nivel mundial, menos en Oceanía (Yang Chen y Siede, 2007, pp. 34–35).

El nombre del virus de alas deformadas, viene de los síntomas característicos de la mal formación de abejas recién nacidas o el mal desarrollo de las alas con el acortamiento de cuerpo de las mismas (Figura 3). Además, se puede dar la reducción de tiempo de vida de las abejas entre un 50 a 75%. La presencia de DWV, en países que presentan las cuatro estaciones, va en aumento paulatino en las estaciones de verano y otoño. *V. destructora* presenta una relación con la distribución de DWV, ya que el acaro actúa como el vector de trasmisión y también lo replica dentro de su interior. DWV es uno de los pocos

virus que causan sintomatología a la abeja de miel (Aubert et al., 2007, pp. 46–53; Yang Chen y Siede, 2007, pp. 34–36).



*Figura 3. Apis mellifera con sintomatología DWV*  
Tomado de Allen y Ball, 1996, p. 147.

#### **2.4.2. Virus de la parálisis aguda (ABPV)**

El virus ABPV fue descrito en 1963, cuando se buscaba el agente causal de la parálisis en *A. mellifera*. ABPV ha sido reportado en Norte América, Centro América, América del Sur, África, Asia, Europa y Medio Oriente (Yang Chen y Siede, 2007, pp. 40–41). El hospedero principal es *A. mellifera*, aunque se pueden encontrar en al menos cinco especies distintas de abejorros. Es considerado entre los virus más virulentos, debido a que menos de 100 partículas virales son suficientes para infectar a varios hospederos y causar la muerte pocos días después. Se encuentra distribuido a nivel mundial, pero con una mayor presencia en Europa y Norte América que en otros sitios del mundo. En países con la presencia de las cuatro estaciones, la prevalencia y carga viral de ABPV aumenta al final del verano.

Las formas de transmisión son de manera fecal-oral, es decir, por medio de las glándulas salivales de las abejas adultas y el alimento. Otra forma de transmisión es de manera vertical ya que se ha podido detectar en semen y ovarios. Se ha encontrado la presencia de ABPV en todos los estados de la abeja, sin embargo, los síntomas sólo se pueden apreciar en abejas adultas. Los síntomas de ABPV en *A. mellifera* puede durar entre 3 a 4 días, incluyendo

temblores en cuerpo y alas, así como parálisis progresiva con la incapacidad de volar, oscurecimiento del pelo, pérdida de pelo y la muerte en el segundo día de la infección (Aubert et al., 2007, pp. 26–29).

## **2.5. Métodos de diagnóstico de patologías virales en *A. mellifera***

Existen diferentes técnicas, que son utilizadas para conocer los virus en abejas, las cuales debe ser lo suficientemente sensibles y específicas para confirmar el real motivo del deceso en abejas. Algunas de las técnicas más empleadas actualmente son: microscopia electrónica, ELISA y técnicas de biología molecular (Allen y Ball, 1996, pp. 142–157).

La identificación por medio del microscopio electrónico se basa en la morfología y en la propiedad física del virus (Figura 4). La mayoría de los virus tienen una densidad que les ayuda a flotar, por lo que por medio del cloruro de cesio estos tienen a sedimentarse, lo que permite su aislamiento y separación en gradientes de sacarosa, para después poder ser observados en el microscopio electrónico. Sin embargo, los virus DWV, KBV y el virus X que afectan a la abeja melífera, presentan mismo tamaño y forma cuando son analizadas dentro de un microscopio electrónico confundiendo al investigador al momento de diagnosticar los mismos (Allen y Ball, 1996, pp. 142–155; Chen, Pettis, Collins, y Feldlaufer, 2006, p. 107).

Otro método más específico y sensible que se ha desarrollado en la detección de virus en abejas de miel es la serología convencional, la cual se usa para la detección o diferenciación de los virus. Este método es práctico para determinar la causa de la mortalidad en brotes de enfermedades naturales, cuando se dispone de antisueros virales específicos. Por otra parte, el ELISA ha demostrado ser útil para diferenciar los virus. Sin embargo, existen algunos como KBV y ABPV que pueden mostrar similitudes en sus reacciones serológicas, lo cual genera falsos positivos o ambigüedades en el diagnóstico con esta técnica. Además, este tipo de técnicas requieren el uso de anticuerpos específicos, que es uno de los principales limitantes, ya que la obtención y

producción de los mismos se limitada tanto por sus costos y su elaboración (Allen y Ball, 1996, pp. 142–148).

Finalmente, en biología molecular, se emplean dos técnicas: Hibridación fluorescente *in situ* y PCR. La técnica Hibridación fluorescente *in situ* o FISH permite la detección y localización de secuencias específicas de ADN sobre células, cromosomas o tejidos. Para la identificación de virus por FISH como en virus como IAPV se usan tejidos celulares como huevos, espermatecas, ovarios y tripa, los cuales ayudan a detectar la presencia del patógeno con un tratamiento previo al tejido y la ayuda de anticuerpos como el “anti-DIG” que se une directamente al ARN viral. Después de un tiempo de incubación de hasta seis horas, se releva el resultado identificándose dos colores: azul o púrpura oscuro, los cuales determinan una prueba positiva (Allen y Ball, 1996; Lanzi et al., 2006) .

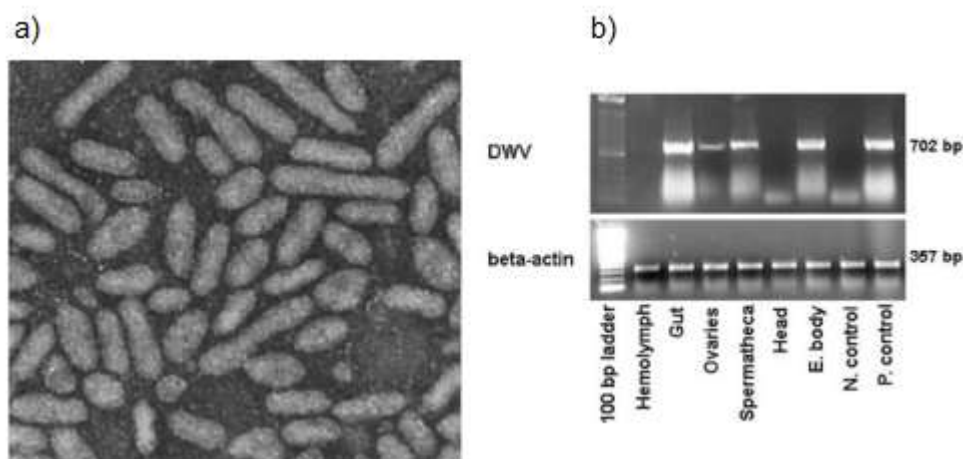
## **2.6. Reacción en cadena de la polimerasa como diagnóstico de patologías virales en *A. mellifera***

La reacción en cadena polimerasa (PCR) es una técnica muy usada en la biología molecular alrededor del mundo para varios fines, ya que posee alta sensibilidad y especificidad (Figura 4), con dicha técnica se puede obtener gran cantidad de copias de un gen partiendo de un único fragmento específico de ADN con la ayuda de cebadores específicos (Karp Gerald, 2015).

Con la técnica de PCR se puede identificar varios virus en abejas con la ayuda de cebadores específicos para las secuencias que se desea amplificar (Sguazza, Reynaldi, Galosi, y Pecoraro, 2013; Topley, Davison, Leat, y Benjeddou, 2005).

Como se ha mencionado anteriormente ya existe la aplicación de la técnica PCR y sus derivados en varios países a nivel mundial, por ejemplo, en Francia es utilizada la prueba PCR para identificar CBPV, ABPV, BQCV, SBV y DWV

en colmenas aparentemente sanas, otros países como Estados Unidos y Costa Rica se utiliza la PCR en tiempo real para poder identificar SBV, BQCV, ABPV y DWV en colmenas de *A. mellifera* (Guevara et al., 2016 y Runckel et al., 2011).



**Figura 4.** Métodos de diagnóstico de patologías virales en *A. mellifera*.

Adaptado de Allen y Ball, 1996, p. 146 y Chen et al., 2004, p. 608.

a) micrografías electrónicas de CABPV.

b) electroforesis de amplificación de productos PCR del virus DWV en: óvulos de abeja reina, tripa, ovario y espermateca.

### 3. Diseño del plan experimental

En este trabajo se buscó la estandarización de la PCR para la determinación de virus comunes en abejas de miel de la sierra ecuatoriana, se realizó la obtención de controles positivos y la recolección de muestras, prosiguiendo con la extracción ARN con TRI reagent (MCR, USA) y cuantificación de las mismas con el equipo NanoDrop 8000 (Thermofisher, USA). Con ayuda de la RT-PCR (Promega, USA) se obtuvo el ADN complementario o ADNc partiendo del ARN viral obtenido anteriormente, tanto de las muestras como de los controles positivos. Se prosiguió realizando una serie de pruebas con la enzima *GoTaq Flexi DNA polymerase* (Promega, USA) denominadas gradientes partiendo por lo descrito por Sguazza y colaboradores (2013), para la obtención adecuada de temperatura de alineamiento de cebadores y la concentración apropiada de cloruro de magnesio y cebadores en la prueba de la reacción de la polimerasa. Una vez obtenida las concentraciones adecuadas de los reactivos de la PCR

se prosiguió con la parte de sensibilidad y especificidad analítica de la PCR. Finalmente se llevó el análisis cualitativo de las muestras para la determinación de los virus de las alas deformadas y de la parálisis aguda en abejas de miel de la sierra ecuatoriana (Figura 5).

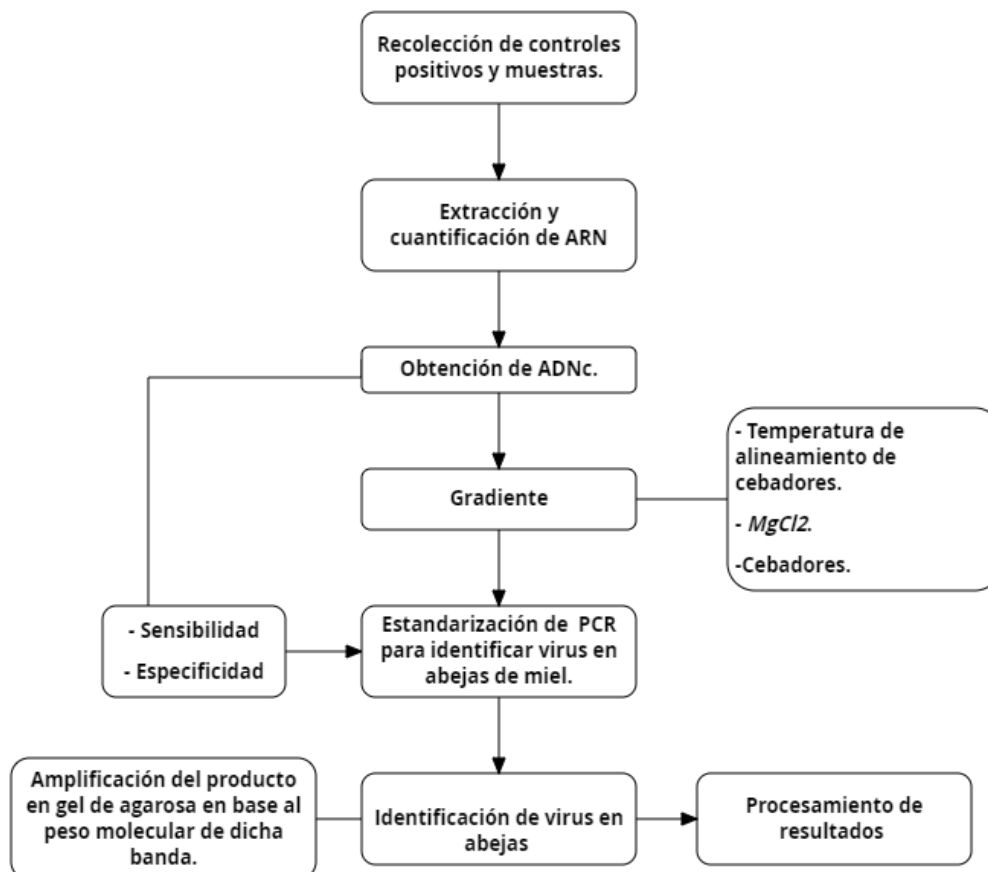


Figura 5. Diseño del plan experimental de la estandarización de PCR para la identificación de virus en abejas de miel.

## 4. Procedimientos

### 4.1. Población y muestra

El desarrollo del proyecto se realizó en la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de calidad del Agro (AGROCALIDAD), en el laboratorio de Biología Molecular, que se encuentra en el sector de Tumbaco ubicado en la Avenida Interoceánica km. 141/2 y Gonzales Suárez, bajo la dirección científica de Ana Garrido responsable técnico del laboratorio de Biología Molecular.

Para la obtención de controles positivos usados en la estandarización de la PCR, se seleccionaron muestras de colmenas con sintomatología sospechosa con ayuda del coordinador general de Apicultura Mvz. Hugo Rosero. La selección de los ejemplares se desarrolló en el laboratorio de parasitología de Agrocalidad, los cuales fueron almacenados a  $-40^{\circ}\text{C}$ .

En la recolección de muestras, se seleccionaron 15 ejemplares de apiarios provenientes de la sierra ecuatoriana como parte del Programa Nacional Sanitario Apícola. Estas muestras fueron recolectadas en tubos falcón de 50 mL y transportadas a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . Al ingreso del laboratorio se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

El desarrollo del proyecto cuenta con el permiso ambiental otorgado por el ministerio del ambiente con el código MAE-RA-2017-332655 (Anexo 1).

## 4.2. Materiales y métodos para la obtención de los datos

### 4.2.1. Diseño de cebadores

Los cebadores usados se describen en la Tabla 2, los cuales fueron tomados de la publicación de Sguazza y colaboradores (2013). Para verificar la especificidad *in silico* de los cebadores se realizó un análisis utilizando el programa Primer-blast (NCBI, USA).

Tabla 2.

*Característica de los cebadores seleccionados para la amplificación de los virus DWV y ABPV.*

CEBADORES	SECUENCIA 5' - 3'	Tm°C	Ta°C	CG%	TAMAÑO
DWVf	TGG TCAATTACAAGCTACTTGG	53.3	48.3	40.9	22
DWVr	TAGTTG GACCAGTAGCACTCAT	58.6	53.6	45.5	22
AIVf	GGTGCCCTATTTAGG GTGAGGA	60.8	55.8	54.5	22
ABPVr	ACTACAGAAGGCAATGTCCAAGA	62.6	59.1	43.5	23

Tomado de Sguazza et al. 2013, p. 103.



#### **4.2.2. Extracción y cuantificación de ARN de controles y muestras**

El proceso de extracción de ARN total se realizó en un ambiente controlado y libre de RNAsas tanto para controles, como para muestras. Para lo cual, se utilizó el reactivo TRI-reagent RT 118 (MCR, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido se prosiguió a resuspender en 50  $\mu$ L de agua DEPC. Una vez obtenido el ARN total se determinó la concentración y pureza del mismo por medio del equipo NanoDrop 8000 (ThermoScientific, USA) midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm con valores de 1,6 a 1,9 y para el radio de 260 y 230 nm en valores de 1,8 a 2,2 (Thermo Scientific, 2013).

#### **4.2.3. Reacción en cadena de la polimerasa retro transcriptasa (RT)**

Para la síntesis de ADNc (ADN complementario) se partió del ARN total de las muestras usando un volumen de 5  $\mu$ L y empleando la enzima M-MLV RT de Promega (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, USA) y rándom hexámeros (Promega, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **4.2.4. Estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

##### **4.2.4.1. Introducción de la optimización de la reacción en cadena de la polimerasa.**

Para el proceso de la PCR se usó el kit *GoTaq Flexi DNA polymerase* implementado lo sugerido por el fabricante (Promega, USA). Para estandarizar el proceso se realizaran distintos ensayos, utilizando el perfil térmico descrito por Sguazza y colaboradores (2013). Para la programación del termociclador, cada uno de los ensayos que se menciona a continuación (Tabla 3) se realizó los ensayos una sola vez debido a la limitación de reactivos para el desarrollo del proyecto, usando cada uno de los ensayos anteriores para corroborar el avance del proyecto.

Tabla 3.

*Perfil térmico utilizado para el gradiente de temperatura para la obtención de productos de la PCR*

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo	Fase
1	95 °C	300 segundos	Denaturación Inicial
35	95 °C	30 segundos	Denaturación
	*Ta1 – Ta5	60 segundos	Hibridación
	72°C	90 segundos	Extensión
1	72 °C	330 segundos	Extensión final
1	12 °C	∞	Espera

Adaptado de Sguazza et al., 2013.

Nota: \*Ta1 - Ta5 = Temperatura de hibridación de los cebadores (Tabla 4).

#### 4.2.4.2. Gradiente de temperatura de hibridación de los cebadores

Se realizaron dos gradientes de temperatura, el primer gradiente de Ta (de sus siglas de inglés *temperature annealing*) fue desde 51.5 °C hasta 59.5 °C y el segundo gradiente de Ta fue de 51.5 °C a 54.5 °C (Tabla 4), utilizando el perfil térmico de la Tabla 4.2 para la programación del termociclador.

Tabla 4.

*Rangos de temperaturas seleccionadas en el termociclador para el ensayo de gradiente de temperatura de hibridación de los cebadores.*

Primer Rango de Ta	
N° Ta	Ta °C
Ta 1	59.5 °C
Ta 2	57.9 °C
Ta 3	53.6 °C
Ta 4	53 °C
Ta 5	51.5 °C
Segundo Rango de Ta	
N° Ta	Ta °C
Ta 1	54.5 °C
Ta 2	53.9 °C
Ta 3	53.4 °C
Ta 4	52.1 °C
Ta 5	51.5 °C

Se utilizó, el master mix de la Tabla 5 para la amplificación del gen de la poliproteína de DWV y la solución madre de la Tabla 6 para la amplificación de los genes de la proteína de la cápsida de ABPV.

Tabla 5.

*Reactivos y concentraciones del gradiente de Ta para la amplificación del gen de la poliproteína de DWV*

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen Rx 1 (µL)
Agua PCR	-	-	11.37
Buffer	5 X	1 X	5
MgCl <sub>2</sub>	25 Mm	1.5 Mm	1
DNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5
DWVf	10 µM	0.4 µM	1
DWVr	10 µM	0.4 µM	1
Go Taq Flexi	5 U/µL	1.5 U/50 µL	0.13
<b>Volumen Total</b>			20

Tabla 6.

*Reactivos y concentraciones del gradiente de Ta para la amplificación del gen de la proteína de la cápsida de ABPV*

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen Rx 1 (µL)
Agua PCR	-	-	11.37
Buffer	5 X	1 X	5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM	1
DNTPs	10 mM	0.2 Mm	0.5
AIVf	10 µM	0.4 µM	1
ABPVr	10 µM	0.4 µM	1
Go Taq Flexi	5 U/µL	1.5 U/50 µL	0.13
<b>Volumen total</b>			20

#### 4.2.4.3. Gradiente de cloruro de magnesio

Otro de los gradientes realizados después de la obtención de Ta fue la concentración final de MgCl<sub>2</sub> de 1 a 4 mM con incrementos de 1 mM para la amplificación de los genes de la poliproteína DWV y el gen de la poliproteína de la cápsida ABPV. Se utilizando el master mix de la Tabla 7 para la amplificación

del gen de la poliproteína de DWV y con el perfil térmico para la programación del termociclador descrito en la Tabla 11.

Tabla 7.

*Reactivos y concentraciones de la reacción en cadena de la polimerasa para la determinación el gradiente de Cloruro de Magnesio del gen de la poliproteína de DWV.*

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen Rx 1 (μL)
Agua PCR	-	-	M*
Buffer	5 X	1 X	5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1-4 mM	M**
DNTPs	10 mM	0.2 mM	0.5
DWVf	10 μM	0.4 μM	1
DWVr	10 μM	0.4 μM	1
Go Taq Flexi	5 U/μL	1.5 U/50 μL	0.13
<b>Volumen Final</b>			20

Nota: M\* variación del volumen de agua PCR con respecto a la concentración de MgCl<sub>2</sub> (Tabla 8). M\*\* Variación del volumen de MgCl<sub>2</sub> con respecto a la con respecto de MgCl<sub>2</sub> (Tabla 8).

Tabla 8.

*Variaciones del volumen y de la concentración de MgCl<sub>2</sub> para la determinación el gradiente de Cloruro de Magnesio del gen de la poliproteína de DWV.*

	Reactivo	1 mM	2 mM	3 mM	4 Mm
<b>M*</b>	Agua PCR(μL)	11.37	10.37	9.37	8.37
<b>M**</b>	MgCl <sub>2</sub> (μL)	1	2	3	4

Para el desarrollo del gradiente de MgCl<sub>2</sub> para la amplificación de la poliproteína de ABPV se utilizó la solución madre de la Tabla 9 para la amplificación de los genes de la proteína de la cápside de ABPV y se utilizó el perfil térmico para la programación del termociclador descrito en la Tabla 11.

Tabla 9.

*Reactivos y concentraciones de la reacción en cadena de la polimerasa para la determinación el gradiente de Cloruro de Magnesio del gen de la proteína de la cápside de ABPV*

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen Rx 1 (µL)
Agua PCR	-	-	M*
Buffer	5 X	1 X	5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1-4 mM	M**
DNTPs	10 Mm	0.2 mM	0.5
AIVf	10 µM	0.4 µM	1
ABPVr	10 µM	0.4 µM	1
Go Taq Flexi	5 U/µL	1.5 U/50 µL	0.13
<b>Volumen Final</b>			20

Nota: M\* variación del volumen de agua PCR con respecto a la concentración y volumen de MgCl<sub>2</sub> (Tabla 10). M\*\* Variación de la concentración y volumen de MgCl<sub>2</sub> (Tabla 10).

Tabla 10.

*Variaciones de la concentración y volumen de MgCl<sub>2</sub> para la determinación del gradiente de Cloruro de Magnesio del gen de la poliproteína de la cápside ABPV.*

	Reactivo	1 mM	2 mM	3 mM	4 Mm
M*	Agua PCR(µL)	11.37	10.37	9.37	8.37
M**	MgCl <sub>2</sub> (µL)	1	2	3	4

Tabla 11.

*Perfil térmico utilizado para la obtención de productos de la PCR.*

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo	Fase
1	95 °C	300 segundos	Denaturación Inicial
35	95 °C	30 segundos	Denaturación
	53.4 °C	60 segundos	Hibridación
	72°C	90 segundos	Extensión
1	72 °C	330 segundos	Extensión final
1	12 °C	∞	Espera

Adaptado de Sguazza et al., 2013.

#### 4.2.4.4. Gradiente de cebadores

Con el objetivo de disminuir la cantidad de reactivos empleada en la detección de los genes de la proteína de la cápside de ABPV (Tabla 12) y del gen de la poliproteína de DWV (Tabla 4.10), se realizó un gradiente de cebadores, usando un rango de 0.1  $\mu\text{M}$  a 0.4  $\mu\text{M}$  con un incremento secuencial de 0.1  $\mu\text{M}$  en cada uno de los cebadores y se utilizó el perfil térmico descrito en Tabla 11.

Tabla 12.

*Reactivos y concentraciones de PCR para la determinación del gradiente de cebadores del gen de la proteína de la cápside de ABPV.*

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen Rx 1 ( $\mu\text{L}$ )
Agua PCR	-	-	N
Buffer	5 X	1 X	5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1 mM	1
DNTPs	10 mM	0.2 Mm	0.5
AIVf	10 $\mu\text{M}$	0.1 $\mu\text{M}$ - 0.4 $\mu\text{M}$	T
ABPVr	10 $\mu\text{M}$	0.1 $\mu\text{M}$ - 0.4 $\mu\text{M}$	T*
Go Taq Flexi	5 U/ $\mu\text{L}$	U/50 $\mu\text{L}$	0.13
<b>Volumen total</b>			20

Nota: N. variación del volumen de agua PCR con respecto a la concentración de MgCl<sub>2</sub> (Tabla 12). T. Variación del volumen de AIVf con respecto a la concentración de los cebadores (Tabla 12). T\*. Variación del volumen de ABPVr con respecto a la concentración de los cebadores (Tabla 13).

Tabla 13.

*Variaciones en las concentraciones de AIVf y ABPV para la determinación del gradiente de cebadores del gen de la poliproteína de la cápside ABPV*

	Reactivo	0.1 $\mu\text{M}$	0.2 $\mu\text{M}$	0.3 $\mu\text{M}$	0.4 $\mu\text{M}$
<b>N</b>	Agua PCR( $\mu\text{L}$ )	12.43	12.87	11.87	11.87
<b>T</b>	AIVf	0.25	0.5	0.75	1
<b>T*</b>	ABPVr	0.25	0.5	0.75	1

Tabla 14.

*Reactivos y concentraciones de PCR para la determinación del gradiente de cebadores del gen de la poliproteína de DWV*

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen Rx 1 (µL)
Agua PCR	-	-	N
Buffer	5 X	1 X	5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1 mM	1
DNTPs	10 Mm	0.2 Mm	0.5
DWVf	10 µM	0.1 µM - 0.4 µM	M
DWVr	10 µM	0.1 µM - 0.4 µM	M*
Go Taq Flexi	5 U/µL	U/50 µL	0.13
<b>Volumen total</b>			<b>20</b>

Nota: a) N. variación del volumen de agua PCR con respecto a la concentración de MgCl<sub>2</sub> (Tabla 15).

b) M. Variación del volumen de DWVf con respecto a la concentración de los cebadores (Tabla 15).

c) M\*. Variación del volumen de DWVr con respecto a la concentración de los cebadores (Tabla 15).

Tabla 15.

*Variaciones en las concentraciones de DWVf y DWVr para la determinación del gradiente de cebadores del gen de la poliproteína de DWV.*

	Reactivo	0.1 µM	0.2 µM	0.3 µM	0.4 µM
<b>N</b>	Agua PCR(µL)	12.87	12.87	11.87	11.87
<b>M</b>	DWVf	0.25	0.5	0.75	1
<b>M*</b>	DWVr	0.25	0.5	0.75	1

#### 4.2.4.5. Ensayo de sensibilidad analítica de la prueba de PCR

Para determinar el límite de detección de la prueba, se realizó un ensayo de diluciones seriadas de ARN (Figura 6) partiendo de una concentración de 10 ng/µL para cada uno de los virus. Posteriormente se realizó la RT-PCR para la obtención de ADNc y se prosiguió con la PCR usando el master mix descrito en la Tabla 16 y Tabla 17, para la programación del termociclador se utilizó la descripción de la Tabla 11.

Tabla 16.

Reactivos y concentraciones de PCR para la amplificación del gen de la proteína de la cápside de ABPV.

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen Rx 1
Agua PCR	-	-	11.87
Buffer	5 X	1 X	5
MgCl <sub>2</sub>	25 Mm	1 Mm	1
DNTPs	10 Mm	0.2 mM	0,5
AIVf	10 μM	0.2 μM	0,5
ABPV	10 μM	0.2 μM	0,5
Go Taq Flexi	5 U/μL	U/50 μL	0,13
<b>Volumen total</b>			20

Tabla 17.

Reactivos y concentraciones de PCR para la amplificación del gen de la poliproteína de DWV.

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen Rx 1
Agua PCR	-	-	12,37
Buffer	5 X	1 X	5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1 mM	1
DNTPs	10 mM	0.2 mM	0,5
DWVf	10 μM	0.2 μM	0,5
DWVr	10 μM	0.2 μM	0,5
Go Taq Flexi	5 U/μL	U/50 μL	0,13
<b>Volumen total</b>			20

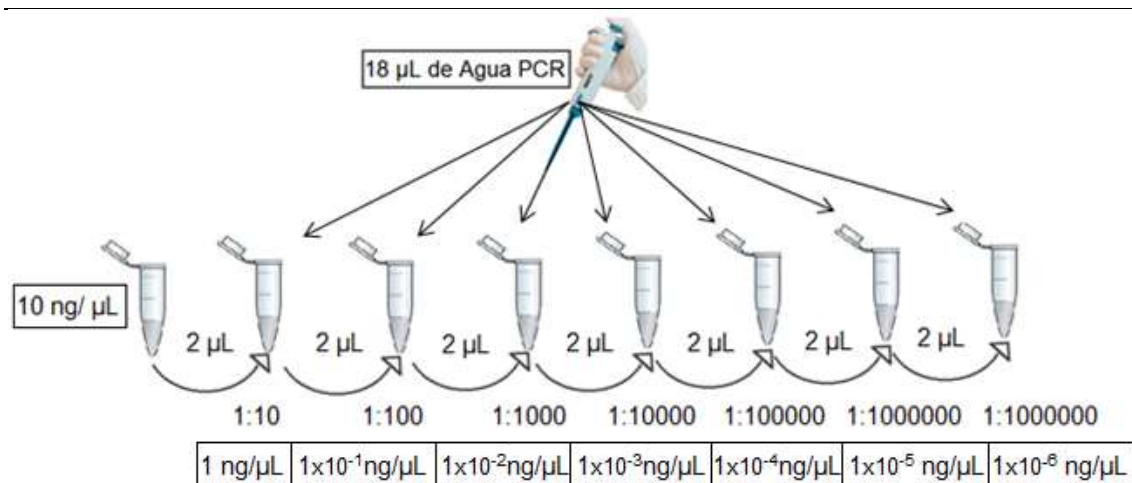


Figura 6. Esquema de la elaboración de diluciones seriadas para el ensayo de la determinación del límite mínimo de detección de la prueba de PCR.



#### 4.2.4.6. Optimización PCR múltiple

##### 4.2.4.6.1. Introducción de la optimización de PCR múltiple

Para determinar el límite de detección de la prueba PCR múltiple, se realizó un ensayo de diluciones seriadas de ARN (Figura 6) partiendo de una concentración de 10 ng/ $\mu$ L para cada uno de los virus. Posteriormente se realizó la RT-PCR para la obtención de ADNc y se prosiguió con la PCR usando el master mix descrito en la Tabla 18 y el perfil térmico de la Tabla 11.

Tabla 18.

*Reactivos y concentraciones de PCR para la amplificación del gen de la poliproteína de DWV y del gen de la proteína de la cápside de ABPV.*

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen x 1
Agua PCR	-	-	11,37
Buffer	5 X	1 X	5
MgCl <sub>2</sub>	25 Mm	1 Mm	1
DNTPs	10 Mm	0.2 mM	0,5
DWVf	10 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	0,5
DWVr	10 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	0,5
AIVf	10 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	0,5
ABPV	10 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	0,5
Go Taq Flexi	5 U/ $\mu$ L	U/50 $\mu$ L	0,13
<b>Volumen total</b>			20

##### 4.2.4.6.2. Sensibilidad de la prueba PCR múltiple

Para determinar el límite de la detección de la prueba de PCR múltiple, se realizó un ensayo de diluciones seriadas de ARN (Figura 7). Posteriormente se realizó la RT-PCR para la obtención de ADNc y se prosiguió con la PCR usando el master mix descrito en la Tabla 12.

##### 4.2.4.6.3. Especificidad de la prueba

Para la determinación de la especificad analítica de la prueba se realizó una PCR *in silico* y una PCR múltiple. Para el desarrollo de la prueba *in silico* se utilizó el programa Serial Cloner 2.6.1 (Serial Cloner, USA) donde se analizaron

cada uno de los cebadores que se encuentran descritos en el apartado 4.2.1 y la secuencia de Fiebre Aftosa de serotipo A (de sus siglas en inglés VFA). Posteriormente se prosiguió con el desarrollo de la prueba de PCR múltiple utilizando una muestra de ADNc de Fiebre Aftosa de serotipo A de la cual es perteneciente a la familia *Picornaviridae* la misma de lo virus estudiados, agua DEPC como control negativo y control positivo de DWV y ABPV. Se utilizó el perfil térmico descrito en la Tabla 11 y el master mix descrito en la Tabla 12 para la amplificación de los genes de la proteína de la cápside de ABPV y del gen de la poliproteína de DWV, de forma específica a los virus.

#### **4.2.4.6.4. Validación de la PCR múltiple optimización**

En el ensayo de la validación de la prueba, se usaron 15 muestras, Agua DEPC como control negativo, como control positivo la solución madre descrita en el apartado 4.1 para los genes DWV y ABPV. Los resultados cualitativos fueron ausencia o presencia de las bandas, con sus respectivos tamaños, al momento de la visualización de los resultados.

#### **4.2.4.7. Electroforesis de los productos de PCR**

Se usaron geles de agarosa a una concentración de 2 % (p/V) con 1 uL de SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA) por cada 10 mL del buffer TBE 0.5X. Se utilizó un voltaje de 100 voltios por 30 minutos para cada corrida del gel. Las imágenes fueron reveladas en el transiluminador con luz LED (BIORAD, USA) y capturadas con una cámara profesional Nikon (Nikon, USA).

## 5. Resultados y Discusión

### 5.1. Extracción de ARN

Se obtuvo el ARN de las muestras y controles las cuales en su mayoría reflejaron un ratio adecuado entre A260/A280 (Tabla 19). Sin embargo, dos muestras presentaron valores de ratio A260/A280 equivalentes a 1,54 y 1,76 los cuales se encontraron por debajo de los rangos ideales para este ensayo. Es considerado contaminación de fenol en la fase acuosa cuando existe ratio A260/A280  $< 1,8$ ; del mismo modo cuando el ratio  $260/280 \geq 2$ , existe contaminación por proteínas. Por lo descrito en la guía para el uso del equipo NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, 2013) se considera un ARN puro con un valor de A260/A280  $\sim 2$ . No obstante los valores afuera de los rangos no interfirieron en la reacción de la RT-PCR.

Por otro lado, las concentraciones de ARN totales de muestras y controles se encontraron en rangos de entre 405,1 a 2725 ng/ $\mu$ L (Tabla 19) valores que se encuentran dentro de lo esperado de acuerdo a lo descrito por el kit empleado TRI reagent (MCR, 2017). Al comparar estos resultados con otras investigaciones donde se han empleado muestras de abejas en menor cantidad y el uso del reactivo TRIzol reagent (Invitrogen, USA, 2010) se ha visto que se puede obtener concentraciones entre 290,9 a 399,7 ng/ $\mu$ L al momento de extraer ARN totales de abejas (Squazza et al., 2013, p. 104), lo cual al momento de usar el reactivo TRI reagent es más eficiente al momento de la obtención de ARN de abejas.

Además cabe recalcar que al transformar estos resultados a masa se observan valores entre 1,1 a 9,5  $\mu$ g ARN (Tabla 19) estos valores se ajustan a los descritos por el fabricante (MCR, 2017) donde el rendimiento esperado es de 1 a 15  $\mu$ g ARN para diferentes tejidos.

Tabla 19.

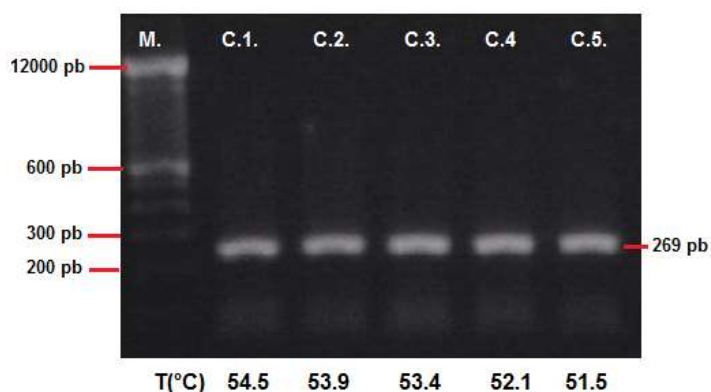
*Concentración ARN totales de controles positivos y muestras, cuantificados por NanoDrop 8000.*

Muestra	Concentración	µg ARN	A260	A280	260/280	260/230
<b>CONTROL 1</b>	3165 ng/µL	9,5	79,122	40,769	1,94	1,35
<b>CONTROL 2</b>	2346 ng/µL	7,0	58,662	29,767	1,97	1,12
<b>CONTROL 3</b>	3081 ng/µL	9,2	77,029	40,440	1,90	1,35
<b>M 1</b>	1981 ng/µL	5,9	49,517	24,808	2,00	1,27
<b>M 2</b>	405,1 ng/µL	1,2	10,129	5,364	1,89	1,23
<b>M 3</b>	2725,0 ng/µL	8,2	68,118	44,246	1,54	1,29
<b>M 4</b>	704,0 ng/µL	2,1	17,600	9,021	1,95	1,58
<b>M 5</b>	756,9 ng/µL	2,3	18,932	9,883	1,91	1,76
<b>M 6</b>	569,7 ng/µL	1,7	14,242	7,328	1,94	1,93
<b>M 7</b>	478,8 ng/µL	1,4	11,971	6,108	1,96	1,46
<b>M 8</b>	552,6 ng/µL	1,7	13,814	7,252	1,90	1,71
<b>M 9</b>	511,6 ng/µL	1,5	12,790	6,236	2,05	1,46
<b>M 10</b>	834 ng/µL	2,5	20,854	10,41	2,00	1,66
<b>M 11</b>	724,3 ng/µL	2,2	18,106	9,247	1,96	1,66
<b>M 12</b>	788,1 ng/µL	2,4	19,703	10,163	1,94	1,83
<b>M 13</b>	525,4 ng/µL	1,6	13,136	7,484	1,76	1,99
<b>M 14</b>	368,2 ng/µL	1,1	9,205	4,646	1,98	1,63
<b>M 15</b>	437,0 ng/µL	1,3	10,925	5,446	2,01	1,72

## 5.2. Estandarización de la reacción en cadena polimerasa

### 5.2.1. Gradiente de temperatura de alineamiento

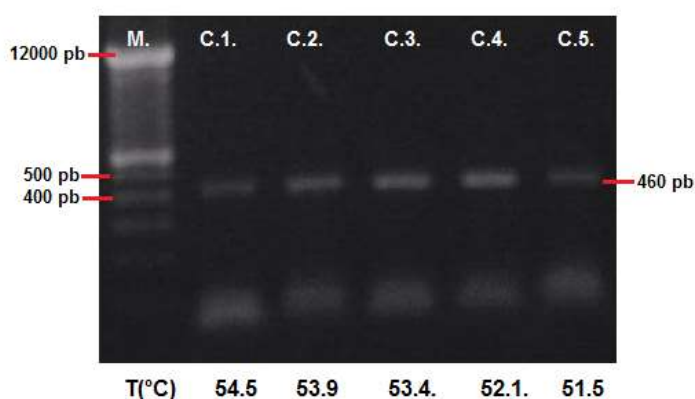
Se obtuvo la amplificación de los controles tanto para el gen que codifica la proteína de la cápside de ABPV con un peso 460 pb. y de la región del gen de la poliproteína de DWV 269 pb. tal como se aprecia en las figuras 7 y 8 respectivamente.



*Figura 7.* Gel de electroforesis de agarosa al 2%, teñido con SYBR safe de los productos de PCR de la gradiente de temperatura de alineamiento de DWV.

- a) Carril M: Marcador de peso molecular de 1Kb (invitrogen).
- b) Carril C.1. – C.5.: Amplicon de 269 pb obtenidos del gradiente de temperatura de alineamiento.

En cuanto a la amplificación del fragmento DWV se observar que la mejor  $T_a$  fue de 53,4 °C (figura 7) donde se aprecia la banda con una mejor concentración y sin la evidencia de productos inespecíficos por lo cual esta temperatura fue la seleccionada. A su vez para el gen APBV se seleccionó de igual manera  $T_a$  de 53,4 °C donde el amplicón presentó mejor apariencia visual a esta temperatura (Figura 8).



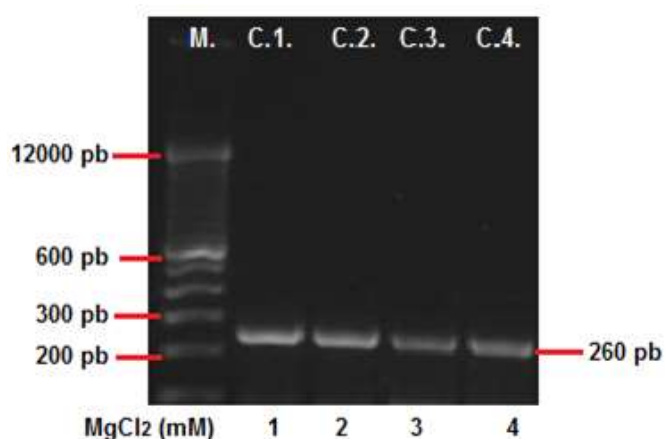
*Figura 8.* Gel de electroforesis de agarosa al 2%, teñido con SYBR safe, de los productos de PCR de la gradiente de temperatura de alineamiento de ABPV.

- a) Carril M. Marcador de peso molecular de 1Kb (invitrogen).
- b) Carril C.1. – C.5.: Amplicon de 460 pb obtenidos del gradiente de temperatura de alineamiento.

Gracias a estos resultados podemos comprobar que es indispensable la evaluación a diferentes valores de temperaturas para poder encontrar la temperatura óptima y poder obtener un método más sensible y específico, como lo menciona Kolmodin L. y Birch D. (2002) las temperaturas más bajas deben probarse para evaluar el éxito de la amplificación y una mejor especificidad del producto amplificado de igual manera, Surzycki (2012) describe que cuando la temperatura de alineamiento es errónea se generaron productos inespecíficos siendo de vital importancia ejecutar este ensayo y escoger la temperatura adecuada de  $T_a$ .

### 5.2.2. Gradiente de cloruro de magnesio

Se consiguió la amplificación específica de los controles en todos los rangos establecidos al momento de realizar el gradiente, sin embargo, se determinó que la concentración óptima para amplificar el fragmento del gen de la proteína de la poliproteína DWV (Figura 9) y de la proteína de la cápside de ABPV (Figura 10) fue entre 1 a 2 mM, siendo escogido el valor de 1 mM donde las bandas presentaron la mayor intensidad en el mismo.

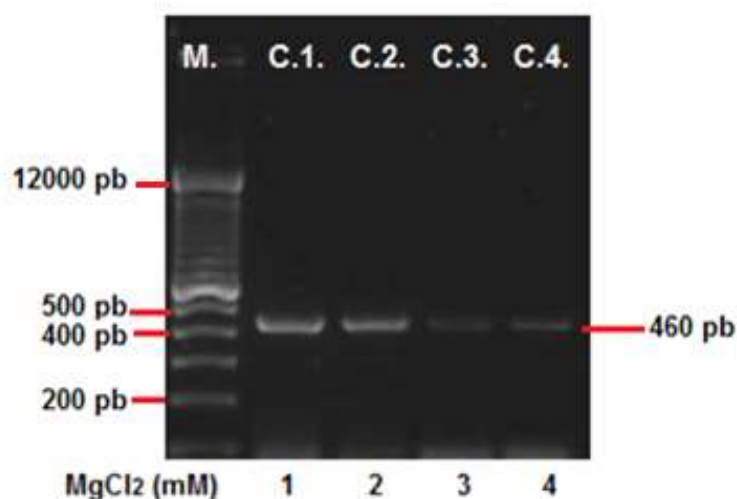


*Figura 9.* Gel de electroforesis de agarosa al 2%, teñido con SYBR safe de los resultados de PCR de la gradiente de cloruro de magnesio de DWV.

a) Carril M. Marcador de peso molecular de 1Kb (invitrogen).

b) Carril C.1. - C.4.: Amplicon de 260 pb obtenidos del gradiente Cloruro de magnesio.

De acuerdo a lo reportado por Rodríguez et al., (2012) la concentración de  $MgCl_2$  en una PCR convencional debe encontrarse de 0.5 a 3 mM y por Sguazza et al., (2013) entre 0.5 a 2.5 mM, respectivamente, esto concuerda con los valores obtenidos en esta investigación los cuales están dentro de los rangos antes mencionados. Es importante recalcar que la cantidad excesiva de  $MgCl_2$  puede llegar a reducir la especificidad en el enzima generando productos inespecíficos y, a su vez la carencia de  $MgCl_2$  puede generar que el enzima sea inactivada Surzycki (2002).



*Figura 10.* Gel de electroforesis de agarosa al 2%, teñido con SYBR safe de los resultados de PCR de la gradiente de cloruro de magnesio de ABPV.

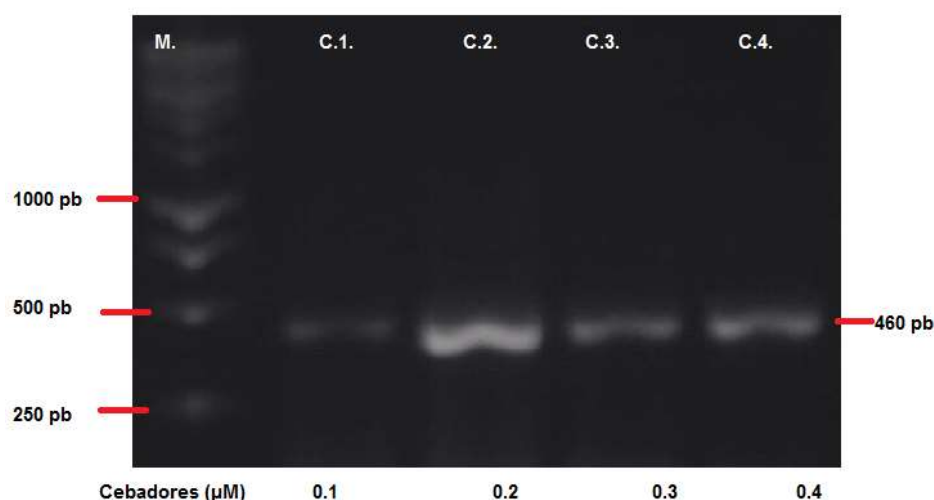
a) Carril M. Marcador de peso molecular de 1Kb (invitrogen).

b) Carril C.1. - C.4.: Amplicon de 460 pb obtenidos del gradiente Cloruro de magnesio.

### 5.2.3. Gradiente de cebadores

Al evaluar las diferentes concentraciones de cebadores, se probó un rango entre 0.1 y 0.4  $\mu M$  de los mismos, observando una mejor amplificación a partir de 0.2  $\mu M$  hasta el límite superior de las concentraciones, en cuanto al resultado de la concentración 0.1  $\mu M$  se observa una intensidad de banda menor (Figura 11 y 12). Por lo antes expuesto se escogió como la mejor concentración a 0.2  $\mu M$  ya que presenta una buena amplificación con la cantidad más baja de reactivo, este valor se encuentra en los rangos reportados por varios autores, los mismos que pueden estar entre 0.2 a 0.4  $\mu M$

o entre 0.1 a 0.5  $\mu\text{M}$ , según Guevara et al., (2016) y Surzycki (2012) respectivamente. Es importante recalcar que una concentración alta de cebadores puede generar una acumulación de productos inespecíficos y aumentar la probabilidad de la generación de dímeros de primer, los cuales interferirían en la reacción. Por lo tanto, la concentración escogida, es la adecuada porque se encuentra en el rango inferior y permite una ejecución optimizada de la prueba para el diagnóstico de estas enfermedades.



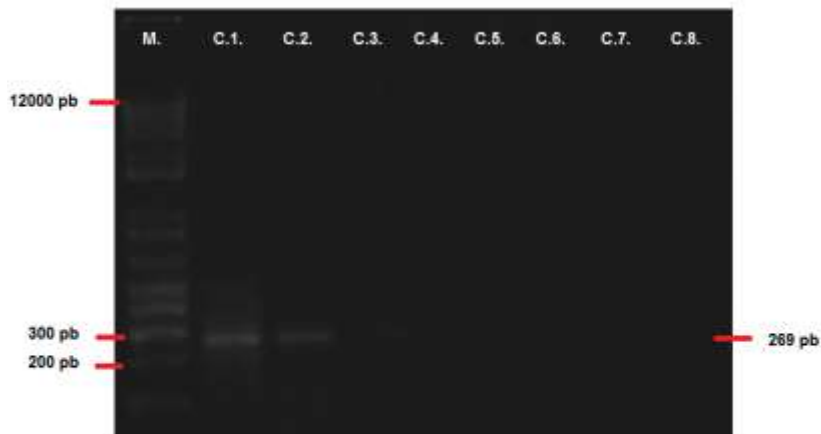
*Figura 11.* Gel de electroforesis de agarosa al 2% teñido con SYBR safe, de los productos de PCR de la gradiente de cebadores de ABPV.

- a) Carril M. Marcador de peso molecular de 1Kb (Promega).
- b) Carril C.1. - C.4.: Amplicon de 460 pb obtenidos del gradiente Cloruro de magnesio.

#### 5.2.4. Sensibilidad analítica por dilución seriada de ARN

El límite de detección para la amplificación del fragmento del gen de la poliproteína de DWV con un tamaño de amplicon 269 pb, el límite de detección identificado fue el correspondiente a la dilución 1:100, que fue equivalente a una concentración de  $10^{-2}$  ng/ $\mu\text{l}$  de ARN (Figura 13).

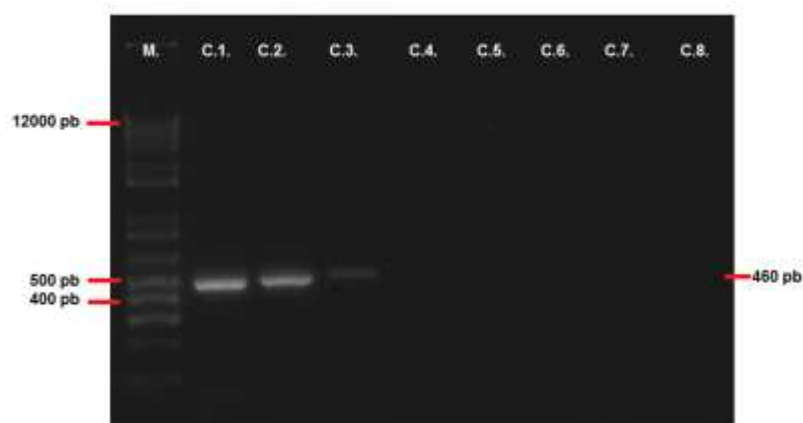




*Figura 12.* Gel de electroforesis de agarosa al 2%, teñido con SYBR safe, de la sensibilidad analítica de DWV.

- a) Carril M. Marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen).
- b) Carril C1: dilución 1:10.
- c) Carril C2: dilución 1:100.
- d) Carril C3: dilución 1:1000.
- e) Carril C4: dilución 1:10000.
- f) Carril C5: dilución 1:100000.
- g) Carril C6: dilución 1:1000000.
- h) Carril C7: dilución 1:10000000.
- i) Carril C8: Control negativo.

En el caso del fragmento génico de ABPV de 460 pb, el límite de detección para la amplificación dentro de la prueba de PCR correspondió a la dilución de 1:1000, la misma que equivale a un valor de concentración de  $10^{-3}$  ng/ $\mu$ l de ARN como se puede observar en la Figura 14.



*Figura 13.* Gel de electroforesis de agarosa al 2%, teñido con SYBR safe, de la sensibilidad analítica de ABPV.

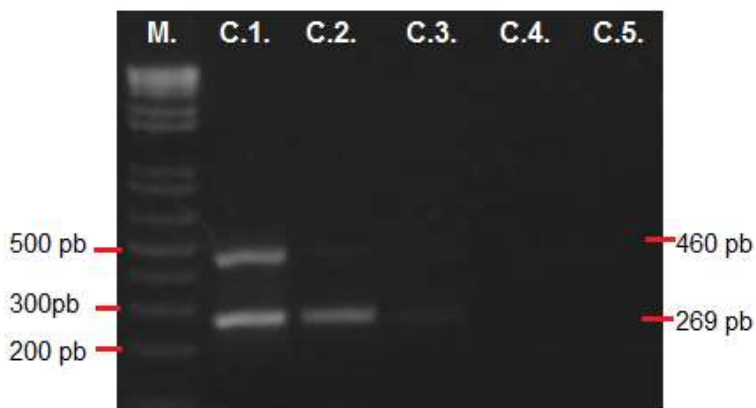
- a) Carril M. Marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen).
- b) Carril C1: dilución 1:10.
- c) Carril C2: dilución 1:100.
- d) Carril C3: dilución 1:1000.
- e) Carril C4: dilución 1:10000.
- f) Carril C5: dilución 1:100000.
- g) Carril C6: dilución 1:1000000.
- h) Carril C7: dilución 1:10000000.
- i) Carril C8: Control negativo.

En el caso del fragmento los valores obtenidos reflejan una menor sensibilidad analítica de esta prueba al comparar con otras investigaciones como la de Grabensteiner et al., (2007) donde se reportaron límites de detección con un grado de sensibilidad para identificar ARN viral en abejas de  $10^{-4}$  ng/ $\mu$ l de ARN, asimismo, el reporte de Sguazza et al., (2013) describe que se obtuvo un valor de  $10^{-5}$  ng/ $\mu$ l. Sin embargo, los valores obtenidos reflejan una sensibilidad analítica aceptable para una PCR convencional, tomando en cuenta que en los extractos de ARN obtenidos siempre se ha logrado una concentración mayor a los límites detectados. Finalmente cabe recalcar que estos valores se encuentran dentro de los rangos generales descritos para los PCR de punto final, que son entre  $10^{-5}$  ng/ $\mu$ l a  $10^{-7}$  ng/ $\mu$ l y en algunas pruebas se han observado con niveles más altos de sensibilidad (Suazo et al., 2010).

## 5.2.5. Optimización PCR múltiple

### 5.2.5.1. Sensibilidad de la PCR múltiple

Se realizó la amplificación de los genes en donde se identificó que el para gen de la poliproteína de DWV con un peso molecular de 269 pb presentó un límite de detección de 1:1000, es decir, un valor de  $10^{-3}$  ng/ $\mu$ l de ARN y para gen de la proteína de la cápside de ABPV con un peso molecular de 460 pb, el límite de detección fue 1:100, es decir, una concentración de  $10^{-2}$  ng/ $\mu$ l de ARN (Figura 15). Asimismo, la sensibilidad de la prueba presenta una relación inversa con la especificidad, mientras tanto la eficiencia de la enzima utilizada depende de la concentración del ácido nucleico. Mientras que los valores obtenidos son mayores a los reportados por Sguazza et al., (2013) donde fueron seleccionados los cebadores para esta investigación describe una sensibilidad de  $10^{-5}$  ng/ $\mu$ l. Con respecto a Kolmodin y Brich (2002) en una técnica de PCR entre mayor es su especificidad inversamente proporcional es su sensibilidad. Por otro lado Kramer, M.F. y Coen (2001) mencionan que la sensibilidad depende del tipo de enzima usada dentro de la reacción la cual puede garantizar una amplificación con muy poca cantidad de material genético. En cuanto a la enzima utilizada *GoTaq Flexi DNA polymerase* (Promega, 2007, USA) describe una dilución de 1:10000 de ácido nucleico es efectiva.



**Figura 14.** Gel de electroforesis de agarosa al 2%, teñido con SYBR safe, de la sensibilidad analítica de los genes de ABPV y DWV.

- a) Carril M. Marcador de peso molecular de 1Kb (invitrogen).
- b) Carril C1: dilución 1:10.
- c) Carril C2: dilución 1:100.
- d) Carril C3: dilución 1:1000.
- e) Carril C4: dilución 1:10000.
- f) Carril C5: dilución 1:100000.

#### 5.2.5.2. Especificidad de la reacción en cada de la polimerasa múltiple (m-PCR)

La amplificación de la PCR múltiple fue específica para ambos fragmentos génicos como se puede apreciar en la figura 17 en donde solo se pueden visualizar los amplicones en el gel de agarosa correspondientes del gen de la poliproteína de DWV con un peso de 269 pb. y del gen de la proteína de la cápside de ABPV con un peso 460 pb. sin la formación de dímeros de primers en la columna 2. Como era de esperarse cuando se trabaja con virus de la misma familia *Picornaviridae* como es el virus de Fiebre Aftosa serotipo A, no existe amplificación de bandas como se aprecia en la columna 1 de la Figura 16, observando la especificidad de la prueba de PCR y de los cebadores.

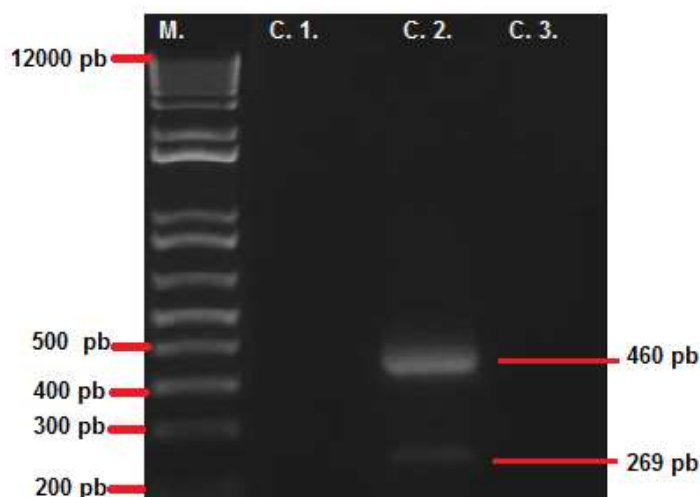


Figura 15. Gel de electroforesis de agarosa al 2%, teñido con SYBR safe, de los productos de PCR de la prueba de especificidad.

- a) Carril M. Marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen).
- b) Carril C.1. Control positivo de fiebre aftosa.
- c) Carril C.2. Control positivo de DWV de 269 pb. y ABPV de 460 pb.
- d) Carril C.3. Control negativo de PCR.

Al momento de evaluar la técnica de la PCR *in silico* con el programa bioinformático Serial Cloner 2.6.1 (Serial Cloner, USA) se evidencia en la PCR que los cebadores son específicos solo para los fragmentos génicos de ABPV con un peso 460 pb. y DWV con un peso de 269 pb. (Figura 17).

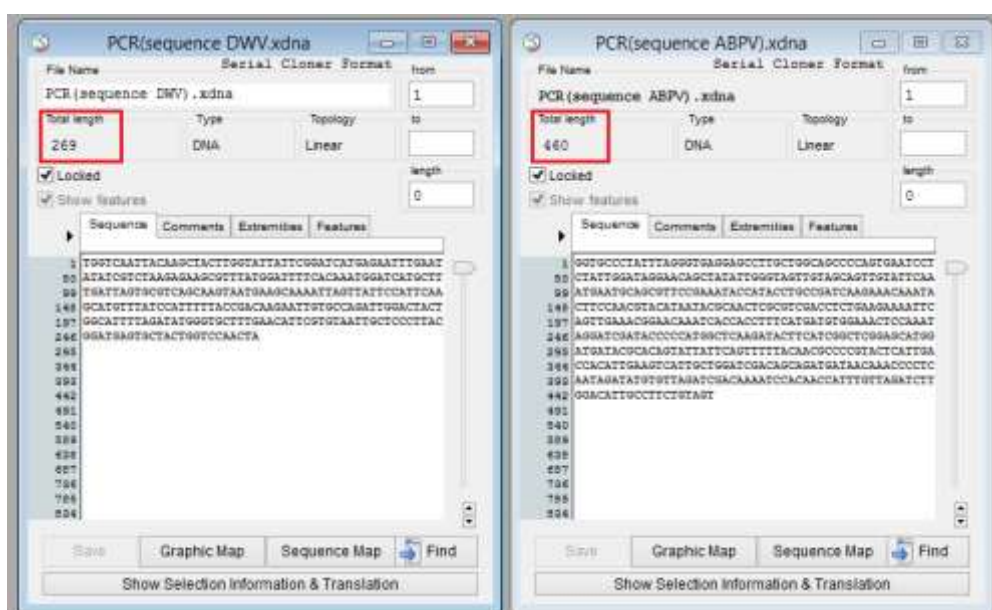


Figura 16. Resultado de la PCR *in silico* al momento de evaluar los cebadores de los virus DWV con un peso 269 pb y ABPV con un peso 460 pb con las secuencias de ABPV y DWV respectivamente.

El desarrollo del análisis de cada uno de los pares de cebadores de ABPV (Figura 18) y DWV (Figura 19) por PCR *in silico*, con el programa bioinformático Serial Cloner 2.6.1 (Serial Cloner, USA) respectivamente no reconoce ningún sitio de la secuencia del virus de Fiebre Aftosa. Los resultados obtenidos anteriormente concuerdan con otras investigaciones donde reportan ensayos realizados con la técnica de PCR para virus como DWV y ABPV (Guevara et al., 2016; Sguazza, Reynaldi, Galosi, y Pecoraro, 2013), donde presentan una alta especificidad al momento de analizar la especificidad al igual que los datos obtenidos en esta investigación.

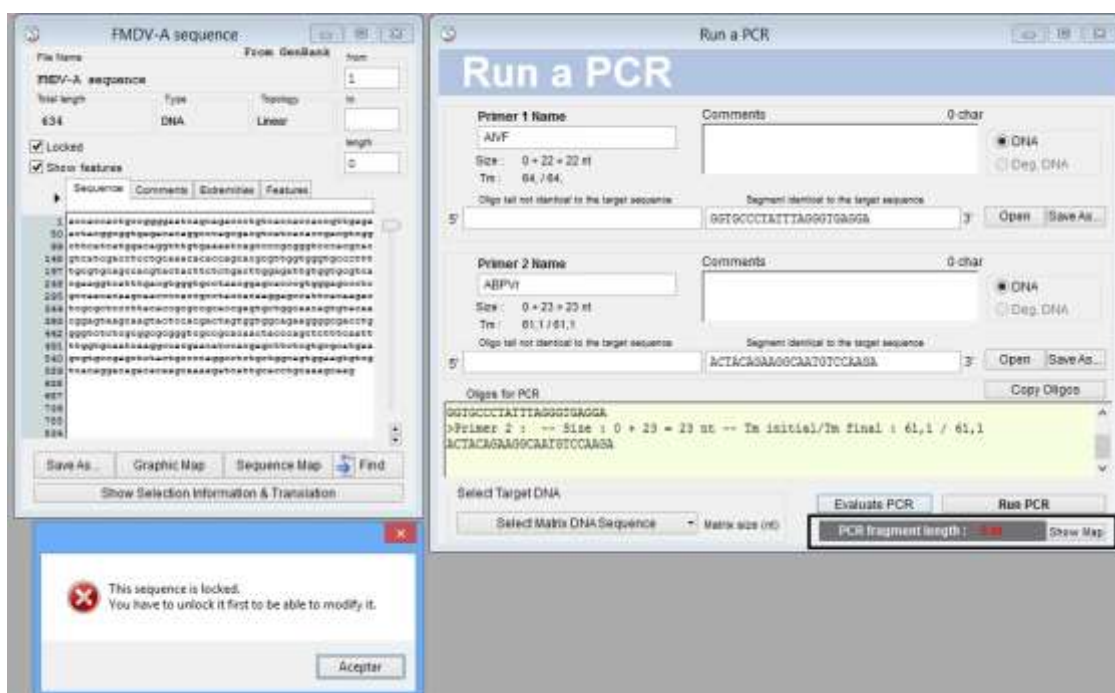


Figura 17. Resultado de la PCR *in silico* al momento de evaluar los cebadores de los virus ABPV con la secuencia del virus de Fiebre Aftosa de Serotipo A.

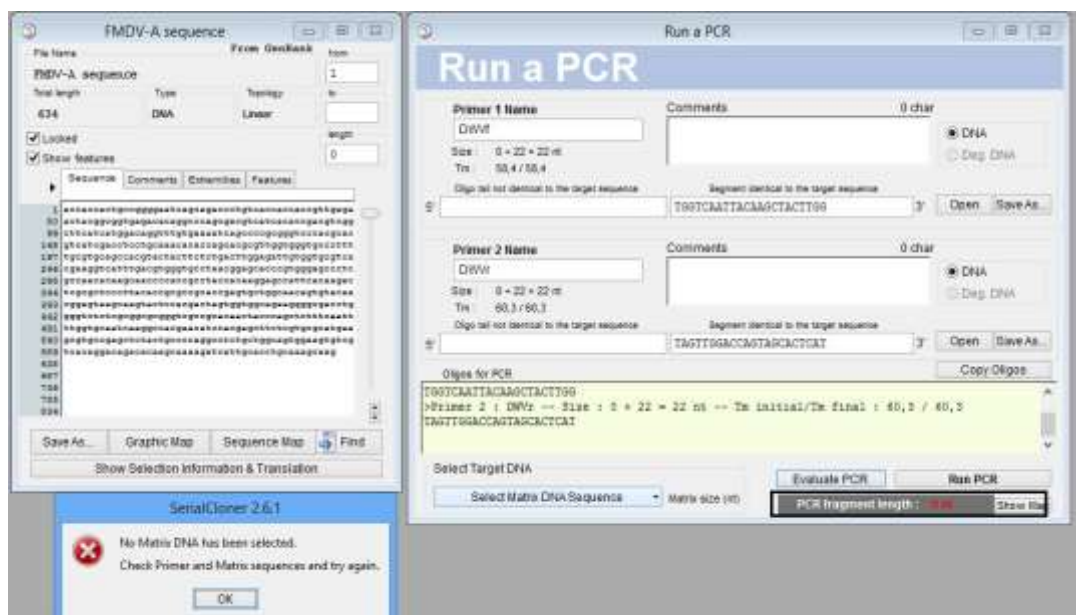


Figura 18. Resultado de la PCR *in silico* al momento de evaluar los cebadores de los virus DWV con la secuencia del virus de Fiebre Aftosa de Serotipo A.

### 5.2.5.3. Validación de la reacción en cadena de la polimerasa con muestras de campo

El ensayo mostrado en la figura 20 permitió validar la técnica con muestras de campo, las cuales fueron analizadas para ABPV y DWV. Es decir el proceso de la validación permite determinar la idoneidad de la prueba ya desarrollada, estandarizada y optimizada anteriormente (OIE, 2012, pp. 1–5).



Figura 19. Gel de agarosa al 2%, teñido con SYBR safe, de los resultados de la amplificación de ABPV y DWV a partir de muestras de abejas de miel.

a) Carril M: Marcador de peso molecular de 1 kb (promega).

b) Carril C.1.: Muestra M1.

c) Carril C.2.: Muestra M2.

d) Carril C.3.: Muestra M3.

e) Carril C.4.: Muestras M4

f) Carril C.5.: Muestra M5.

g) Carril C.6.: Muestra M6.

h) Carril C.7.: Muestra M7.

i) Carril C.8.: Muestra M8.

j) Carril C.9.: Muestra M9.

k) Carril C.10.: Muestra M10.

m) Carril C.11.: Muestra M11.

n) Carril C.12.: Muestra M12.

l) Carril C.13.: Muestra M13

o) Carril C.14.: Muestra M14.

p) Carril C.15.: Muestra M15.

q) Carril C+: Control positivo ABPV y DWV.

r) Carril C -: Control negativo.

En cuanto a los resultados obtenidos (Tabla 20), se observan de las 15 muestras analizadas, 5 presentan amplificación para ABPV mientras que 1 muestra presentó amplificación de DWV.

Tabla 20.

*Resultado de la presencia de el para gen de la poliproteína de DWV para gen de la proteína de la cápside de ABPV en la validación de la técnica.*

Muestra	Carril del gel	ABPV	DWV
<b>M1</b>	C1	(+)	(-)
<b>M2</b>	C2	(+)	(-)
<b>M3</b>	C3	(+)	(-)
<b>M4</b>	C4	(+)	(-)



<b>M5</b>	C5	(-)	(-)
<b>M6</b>	C6	(-)	(-)
<b>M7</b>	C7	(-)	(+)
<b>M8</b>	C8	(-)	(-)
<b>M9</b>	C9	(-)	(-)
<b>M10</b>	C10	(-)	(-)
<b>M11</b>	C11	(-)	(-)
<b>M12</b>	C12	(-)	(-)
<b>M13</b>	C13	(+)	(-)
<b>M14</b>	C14	(-)	(-)
<b>M15</b>	C15	(-)	(-)

Nota: (+) Presencia del virus en la muestra. (-) Ausencia del virus en la muestra.

Los resultados obtenidos (figura 21), se observaron del 100% de las muestras analizadas, el 60% presento Negativo, el 33% de ABPV y mientras que el 7% presento DWV. En otras investigaciones realizadas se han podido observar prevalencias para el virus DWV de entre 50% al 100 % en las poblaciones de Beijing, Xinjiang, Fujian y Hainan (China), así como entre el 56,9% al 90% para las poblaciones de Balcarce, Rafaela y Formosa (Argentina) como lo reportan Ding y colaboradores (2016).

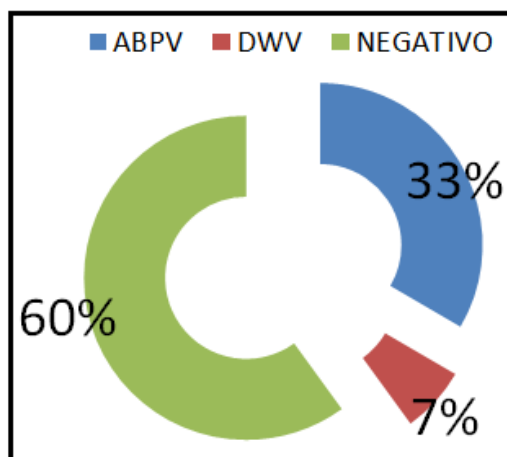


Figura 20. Porcentaje de infección de DWV y ABPV de las 15 muestras de *A. mellifera*.

Nuestro porcentaje es un poco bajo en relación a estas prevalencias, pero esto puede deberse a que el N muestral es bajo, ya que el objetivo de este proyecto de investigación no era realizar un estudio de prevalencia sino de validación,

esto podrá ser verificado en futuros estudios en donde se realice el muestro con un N más amplio, se recomienda un  $N \geq 540$  apiarios de la sierra ecuatoriana (Agencia ecuatoriana de aseguramiento de la calidad del agro, 2016b).

## 6. Conclusiones y Recomendaciones

### 6.1. Conclusiones

Las condiciones establecidas en la técnica de PCR múltiple para la temperatura de hibridación de 53,4 °C, MgCl<sub>2</sub> 1 mM y los cebadores de 0,2 μM se encontraron dentro de los rangos esperados de una PCR.

Los resultados de sensibilidad de la PCR múltiple para la identificación de ABPV 10<sup>-2</sup> ng/μl y DWV 10<sup>-3</sup> ng/μl los cuales resultaron aceptables con los valores trabajados dentro del laboratorio de Biología Molecular de Agrocalidad.

La especificidad de los cebadores DWVf, DWVr, AIVf y ABPVr usados para la amplificación del gen de la poliproteína de DWV y del gen de la proteína de la cápside de ABPV respectivamente, poseen con una alta especificidad para los mismos.

### 6.2. Recomendaciones

Se recomienda probar otro tipo de enzima con diferente tecnología, que permita mejorar la sensibilidad de la prueba de PCR, como la enzima hot start DNA polymerase.

Realizar dos muestreos anuales al final de cada verano e invierno, para tener un mayor conocimiento de cómo afecta el cambio de estaciones en la presencia o ausencia de ABPV y DWV dentro de las colmenas.

Aumentar el número de colmenas analizadas en distintas regiones del Ecuador, para tener un mayor conocimiento frente a la parte epidemiológica de DWV y ABPV a nivel nacional.

El uso de duplicados y repeticiones al momento de realizar los ensayos de PCR, con el fin de disminuir falsos positivos o falsos negativos al realizar otras estandarizaciones de PCR.

Por último, realizar el secuenciado de los amplicones para poder obtener un mayor conocimiento genómico de los virus y saber las diferencias genómicas entre los otros países a comparar.

## REFERENCIAS

- Agencia ecuatoriana de aseguramiento de la calidad del agro. (2016a). Instructivo para la obtención del certificado sanitario de funcionamiento de explotaciones apícolas, 40. Recuperado el 12 enero de 2018 de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2016/07/resolucion-241.pdf>
- Agencia ecuatoriana de aseguramiento de la calidad del agro. (2016b). Programa Nacional Sanitario Apícola. Quito. <https://doi.org/DAJ-2016204-0201>
- Allen, M., & Ball, B. (1996). The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World*, 141–162. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1996.11099306>
- Argüello, N. O. (2010). Guía Práctica Sobre Manejo Técnico De Colmenas (p. 87). Lomas del Guijarro.
- Aubert, M., Ball, B., Fries, I., Moritz, R., Milani, N., & Bernardinelli, I. (2007). *Virology and the Honey Bee*. (S. F. Programme, Ed.). Belgium.
- Bellez, X. (1997). Los Insectos Y El Hombre Prehistorico, 319–325.
- Benjeddou, M., Leat, N., Allsopp, M., & Davison, S. (2002). Development of infectious transcripts and genome manipulation of Black queen-cell virus of honey bees. *Journal of General Virology*, 83(12), 3139–3146.
- Bradbear, N. (2005). *La apicultura y los medios de vida sostenible. Folleto de la FAO sobre diversificación* (Vol. 1). Roma.
- Cabrera, J. (2012). La Apicultura en el Ecuador: Antecedentes Históricos, 1–5. Recuperado el 15 de enero de 2018 de <https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiRiqKRopvTAhWF6SYKHfxxCTQQFggpMAE&url=https%253A%252F%252Fse148c6884df32392.jimcontent.com%252Fdownload%252Fversion%252F135884162%252Fmodule%252F5718032019%252Fn>
- Chen, Y., Pettis, J., Collins, A., y Feldlaufer, M. (2006). Prevalence and

- transmission of honeybee viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 606–611. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.606-611.2006>
- Chen, Y., y Siede, R. (2007). Honey Bee Viruses, 70(7), 309–323. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1006/rwvi.1999.0139>
- Chen, Y., Zhao, Y., Hammond, J., Hsu, H. T., Evans, J., y Feldlaufer, M. (2004). Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. *Journal of Invertebrate Pathology*, 87(2–3), 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.07.005>
- Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., ... Lipkin, W. I. (2007). A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Science*, 318(5848), 283–287. <https://doi.org/10.1126/science.1146498>
- de Smet, L., Ravoet, J., de Miranda, J. R., Wenseleers, T., Mueller, M. Y., Moritz, R. F. A., y de Graaf, D. C. (2012). BeeDoctor, a Versatile MLPA-Based Diagnostic Tool for Screening Bee Viruses. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047953>
- De Smet, L., Ravoet, J., de Miranda, J. R., Wenseleers, T., Mueller, M. Y., Moritz, R. F. A., y de Graaf, D. C. (2012). BeeDoctor, a Versatile MLPA-Based Diagnostic Tool for Screening Bee Viruses. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047953>
- Ding, G., Fondevila, N., Palacio, M. A., Merke, J., Martinez, A., Camacho, B., ... SHI, W. (2016). Prevalence of honeybee viruses in different regions of China and Argentina. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 35(3), 825–833. <https://doi.org/10.20506/rst.35.3.2572>
- Grabensteiner, E., Bakonyi, T., Ritter, W., Pechhacker, H., & Nowotny, N (2007). Development of a multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of three viruses of the honeybee (*Apis mellifera L.*): Acute bee paralysis virus, Black queen cell virus and Sacbrood virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(3), 222–225. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.11.006>
- Guevara, G. C., Murillo, A. C., Cordero, J. M., Vicente-rubiano, M., Kukielka, D.,

- León, B., y Sánchez-vizcaíno, J. M. (2016). Diagnóstico del Virus de la Celda Real Negra , el Virus de Alas Deformes y el Virus de la Parálisis Aguda en abejas africanizadas ( *Apis mellifera scutellata* ), sintomáticas de Costa Rica , utilizando RT - PCR en tiempo real ., *34*, 7–21. <https://doi.org/10.15359/rcv.34-1.1>
- Jean, P., y Le Conte, Y. (2007). Apicultura, Conocimiento de la abeja, pag 791, Recuperado el <https://www.mundiprensa.com/catalogo/9788484762041/apicultura-conocimiento-de-la-abeja--manejo-de-la-colmena--4%C2%AA-edicion>.
- Kolmodin, L. A., y Brich, J. F. (2002). Polymerase Chain Reaction. Basic Principles and Routine Practice. *The Nucleic Acid Protocols Handbook*, *192*, 569–580. <https://doi.org/10.1385/1-59259-177-9:003>
- Kramer, M.F. y Coen, D. M. (2001). Enzymatic amplification of DNA by the polymerase chain reaction: standard procedures and optimization. *Current Protocols in Molecular Biology*, *2*, 15.1.1.-15.1.7.
- Lanzi, G., Miranda, J. R. De, Boniotti, M. B., Cameron, C. E., Lavazza, A., Capucci, L., ... de Miranda, J. R. (2006). Molecular and Biological Characterization of Deformed Wing Virus of Honeybees ( *Apis mellifera* L .). *Society*, *80*(10), 4998–5009. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.10.4998>
- Meeus, I., Smaghe, G., Siede, R., Jans, K., y de Graaf, D. C. (2010). Multiplex RT-PCR with broad-range primers and an exogenous internal amplification control for the detection of honeybee viruses in bumblebees. *Journal of Invertebrate Pathology*, *105*(2), 200–203. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.06.012>
- Morse, R. A., y Calderone, N. W. (2000). The value of honey bees as pollinators of US crops in 2000. Recuperado el 18 de enero de 2018 de <http://www.beeculture.com/content/pollinationreprint07.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/480F22F5-2367-4853-AD20->

88441298BE0B

- Neumann, P., y Carreck, N. L. (2010). Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 1–6.  
<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.01>
- OIE. (2012). Principios y Métodos de Validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. *Manual Acuático de La OIE 2012*, 20.
- Reyes, J., y Cano, P. (2000). Manual de Polinización Apícola. *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca Y Alimentación.*, 58.
- Reynaldi, F. J., Sguazza, G. H., Pecoraro, M. R., Tizzano, M. A., y Galosi, C. M. (2010). First report of viral infections that affect argentine honeybees. *Environmental Microbiology Reports*, 2(6), 749–751.  
<https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00173.x>
- Runckel, C., Flenniken, M. L., Engel, J. C., Ruby, J. G., Ganem, D., Andino, R., y DeRisi, J. L. (2011). Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, Nosema, and Crithidia. *PLoS ONE*, 6(6).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020656>
- Sandoval, C., y Calispa, A. (2015). *Buenas Prácticas Apícolas*. Recuperado el 17 de enero de 2018 de <http://www.peremarques.net/bpracti.htm>
- Sguazza, G. H., Reynaldi, F. J., Galosi, C. M., y Pecoraro, M. R. (2013). Simultaneous detection of bee viruses by multiplex PCR. *Journal of Virological Methods*.  
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.08.003>
- Suazo, F. M., Harris, B., Díaz, C. A., Thomsen, B., Stuber, T., Suárez, D. G., ... Chávez, C. E. (2010). Sensitivity and specificity of nested PCR and spoligotyping as quick diagnostic tests for bovine tuberculosis in fresh tissue. Recuperado el 15 de enero de 2018 de <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-78649455913&partnerID=40&md5=18db6c5f564c9406d241ac03e6f19ff2%0A>



- Tantillo, G., Bottaro, M., Di Pinto, A., Martella, V., Di Pinto, P., y Terio, V. (2015). Virus infections of honeybees *Apis Mellifera*. *Italian Journal of Food Safety*, 4(3). <https://doi.org/10.4081/ijfs.2015.5364>
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M. E., y Bergoin, M. (n.d.). Prevalence and Seasonal Variations of Six Bee Viruses in *Apis mellifera* L . and *Varroa destructor* Mite Populations in France. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7185–7191. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7185>
- Thermo Scientific. (2013). NanoDrop 8000 Spectrophotometer. *NanoDrop Products*, 1. Recuperado el 12 de enero de 2018 de [www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com)
- Topley, E., Davison, S., Leat, N., y Benjeddou, M. (2005). Detection of three honeybee viruses simultaneously by a single Multiplex Reverse Transcriptase PCR. *African Journal of Biotechnology*, 4(8), 763–767.
- VanEngelsdorp, D., Traynor, K. S., Andree, M., Lichtenberg, E. M., Chen, Y., Saegerman, C., y Cox-Foster, D. L. (2017). Colony Collapse Disorder (CCD) and bee age impact honey bee pathophysiology. *PLoS ONE*, 12(7), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179535>
- Wu-Smart, J., y Spivak, M. (2016). Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide exposure on honey bee queen fecundity and colony development. *Scientific Reports*, 6(1), 32108. <https://doi.org/10.1038/srep32108>

## **ANEXOS**

## Anexo 1: Certificado Ambiental



### CERTIFICADO AMBIENTAL DIRECCIÓN PROVINCIAL DE PICHINCHA

La DIRECCIÓN PROVINCIAL DE PICHINCHA, en cumplimiento a las disposiciones contenidas en la Constitución de la República del Ecuador, la normativa ambiental aplicable y los requerimientos previstos para esta categoría:

**CERTIFICA QUE EL PROYECTO, OBRA O ACTIVIDAD:**

**ESTANDARIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA DETERMINACIÓN DE BACTERIAS, VIRUS Y HONGOS EN ABEJAS DE MIEL EN LA SIERRA ECUATORIANA**

Se encuentra registrado con el No. MAE-SUIA-RA-DPAPCH-2017-241323, debiendo aplicar durante todas las fases de su actividad la Guía de Buenas Prácticas Ambientales emitida por el Ministerio del Ambiente del Ecuador, la misma que debe ser descargada de la página del SUIA de forma obligatoria.

**DETALLES DEL PROYECTO, OBRA O ACTIVIDAD:**

#### Datos Técnicos

**Actividad:**

SERVICIOS DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DESARROLLO

**Ubicación Geográfica**

**Dirección:**

En el sector de Tumbaco ubicado en la Avenida Interoceánica km. 141/2 y Gonzales

Provincia	Canton	Parroquia
PICHINCHA	QUITO	TUMBACO

#### Datos Administrativos

<b>Nombre del representante legal:</b>	AVALOS VALENZUELA JORGE VINICIO
<b>Email:</b>	javalos@udlanet.ec
<b>Teléfono:</b>	2352492
<b>Código del proyecto:</b>	MAE-RA-2017-332655
<b>Dirección:</b>	Pomasqui, Marieta de veintimilla y García moreno, E3-19

El presente Certificado Ambiental no es de carácter obligatorio, siendo importante la aplicación de las buenas prácticas ambientales en el desarrollo de su actividad.

Atentamente,

JURADO MOSQUERA JORGE ENRIQUE  
SUBSECRETARIO DE CALIDAD AMBIENTAL

Yo, AVALOS VALENZUELA JORGE VINICIO con cédula de Identidad 1721782181 declaro bajo juramento que la información que consta en el presente certificado es de mi absoluta responsabilidad. En caso de forzar, falsificar, modificar, alterar o introducir cualquier corrección al presente documento, asumo tacitamente las responsabilidades y sanciones determinadas por la ley.

Atentamente,

Sr. AVALOS VALENZUELA JORGE VINICIO (Firma)

Dado en PICHINCHA, el 11 de diciembre del 2017

MINISTERIO DEL AMBIENTE

Calle Madrid 1158 y Andalucía  
Quito - Ecuador  
Código Postal: 170109  
Teléfonos: (593 2) 3887-600  
[www.ambiente.pcb.ec](http://www.ambiente.pcb.ec)



