



Instituto
Nacional de
Investigación
Agropecuaria

URUGUAY

PRESENCIA DE ESPORAS DE LA BACTERIA CAUSANTE DE LOQUE AMERICANA EN MIELES DE URUGUAY

ABRIL 2004

**Serie Actividades
de Difusión N°355**

PRESENCIA DE ESPORAS DE LA BACTERIA CAUSANTE DE LOQUE AMERICANA EN MIELES DE URUGUAY.

Karina Antúnez 1, Bruno D'Alessandro 1, Claudia Piccini 1, Eduardo Corbella 2, Pablo Zunino 1

1 Laboratorio de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

2 Apicultura, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Introducción

La Loque americana es una de las enfermedades más graves que afecta a la cría de las abejas melíferas. Es causada por la bacteria *Paenibacillus larvae larvae* y está presente a nivel mundial en todas las regiones donde se practica apicultura. Recientemente se comprobó la presencia de esporas de *P.l. larvae* en mieles de África sub Sahariana, región que hasta entonces se consideraba libre de esta enfermedad (Hansen, et al. 2003).

A pesar de que en Uruguay este problema sanitario se manifiesta desde hace varias décadas, fundamentalmente en el Litoral Suroeste, el agente bacteriano recién fue aislado en el año 2000, a partir de larvas con síntomas característicos y también en abejas de colonias aparentemente sanas (Piccini & Zunino, 2001).

Esta enfermedad se transmite únicamente por vía oral, cuando las larvas ingieren alimento contaminado con esporas de la bacteria.

Las larvas con menos de 24 horas son las más sensibles al patógeno, aumentando su resistencia a medida que se desarrollan. Los resultados obtenidos por Wedenig, et al. 2003, sugieren la existencia de una o más sustancias que inhiben el crecimiento de *P.l. larvae* presentes en extractos de larvas de 2 a 4 días de edad.

A diferencia de la Loque europea, la americana mata a la cría después que las celdas son operculadas; en su mayoría en el estadio de prepupa, cuando ya elaboraron el capullo, se apoyaron dorsalmente y orientaron su cabeza hacia el opérculo. Al manifestarse la enfermedad, los opérculos que cubren las larvas muertas parecen hundidos, oscuros y húmedos. Frecuentemente presentan un pequeño orificio en el centro, hecho por las obreras. Este proceso puede llevar al desoperculado total de las celdas, dejando expuestas a las larvas muertas, aunque es frecuente encontrar restos de larvas o escamas totalmente operculadas. La cría enferma presenta una coloración amarronada, es viscosa y carece de forma. Al secarse se transforman en escamas duras, fuertemente adheridas a la pared de las celdas, conservando la cápsula cefálica y además la glosa extendida (Baily & Ball, 1991; Hansen & Brodsgaard, 1999).

P.l. larvae alterna una fase de crecimiento vegetativo y multiplicación en el interior de las larvas ocasionando su muerte, con una fase de dispersión y reinfección bajo la forma de esporas. Estas esporas resisten altas temperaturas, la acción de diversos agentes químicos y pueden permanecer viables durante muchos años.

Las colonias afectadas son tratadas habitualmente con antibióticos, el más empleado es oxitetraciclina, lo que no llega a eliminar al agente por no matar a las bacterias, apenas impide temporalmente su multiplicación. Esta medida aplicada en forma inadecuada puede

acarrear riesgos, como ser la contaminación de la miel con residuos del producto y la potencial generación de cepas bacterianas resistentes.

Debemos aclarar que el consumo de miel con esporas de la bacteria de Loque americana no afecta en absoluto la salud humana, a tal punto que su presencia no es motivo de restricciones en el mercado internacional de miel, polen o jalea real.

Conocer los niveles de contaminación en miel con esporas de *P.l. larvae* puede tener importancia desde el punto de vista epidemiológico. Es de esperar que la miel de colonias afectadas por Loque americana o que corren un inminente riesgo de serlo, presenten esporas contaminantes.

Según Hansen & Brodsgaard, 1997, no hay una relación directa entre la cantidad de esporas en la miel de una colonia y el tiempo que demora en aparecer el primer síntoma de Loque americana en las larvas. La presencia de *P.l. larvae* en un apiario no determina necesariamente la enfermedad, se ha detectado esporas en miel de colonias que no presentaban los síntomas clínicos característicos.

Graaf, et al. 2001, sostienen que el análisis bacteriológico de la miel, es una herramienta válida para el control sanitario de las colonias de abejas. Estos autores encontraron, en los mismos apiarios, una relación positiva entre las muestras de miel contaminadas con esporas de *P.l. larvae* en 1999 y los casos de Loque americana en el año 2000.

El proyecto “Desarrollo de un método de diagnóstico de Loque americana, enfermedad de la cría de abejas melíferas, basado en PCR” fue llevado a cabo en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. El mismo fue financiado con fondos del Banco Interamericano de Desarrollo, bajo la administración del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Posibilitó la implementación de una técnica rápida, certera y de alta sensibilidad para detectar la bacteria causante de la Loque americana a partir de diferentes materiales apícolas, incluyendo larvas, abejas y miel (Piccini, et al. 2002). En forma resumida, la técnica se basa en el reconocimiento de secuencias del ADN de *P.l. larvae*.

Esta tecnología permite contar con un medio idóneo no sólo para el diagnóstico, sino también para colaborar en el diseño de medidas de control de la enfermedad.

Materiales y métodos

Las muestras de miel de la cosecha 2001-2002 se consiguieron mediante la participación de técnicos de intendencias departamentales e integrantes de diferentes grupos de apicultores. A estos intermediarios colaboradores les enviamos frascos esterilizados numerados y los formularios correspondientes. En ellos se solicitaba anotar el nombre del apicultor, la localización del o los apiarios de donde provenía la miel muestreada, la flora preponderante en los mismos y detalles básicos sobre el manejo sanitario y de cosecha.

Analizamos 101 muestras de todos los departamentos del país mediante cultivo en Medio Semiselectivo J. Los aislamientos bacterianos se caracterizaron por la forma, márgenes de las colonias, reacciones químicas, observación al microscopio de preparados coloreados con Gram y se confirmaron a través del método molecular (PCR) desarrollado previamente en el laboratorio para la identificación específica de *P.l. larvae*.

Resultados

La mayoría de las muestras resultó ser la mezcla de miel cosechada en más de un apiario. Nos aseguramos de que ninguna muestra fuera expresamente enviada por provenir de colonias con sospecha o síntomas de Loque americana. Esta aseveración vale para una eventual situación contraria. No pretendimos un muestreo representativo de las mieles de Uruguay, ni podemos afirmar que se realizó al azar, en el sentido estricto de la palabra. Tampoco tuvimos condiciones de analizar muestras de larvas y abejas, ni de hacer inspecciones de campo en los apiarios.

La mitad de las mieles analizadas presentaron algún nivel de contaminación con esporas. La cantidad de esporas recuperadas mediante cultivo de las muestras y su distribución geográfica se presenta en la tabla 1 y en la figura 1.

Origen de las muestras	Muestras analizadas	Muestras contaminadas	Promedio de esporas	Rango de variación
Colonia	8	7	819	0,75-1406,60
San José	5	4	318	0-989
Soriano	5	5	202	0,05-703,30
Flores	5	4	202	0-989
Salto	6	5	98	0,05-466,55
Paysandú	5	3	37	0-167,05
Río Negro	5	5	12	1,1-37
Florida	6	5	4	0,10-13,15
Maldonado	4	2	3	0-12,10
Durazno	5	3	2	0,20-4,30
Canelones	4	3	2	0,25-3,00
Tacuarembó	5	4	0.72	0-3,50
Treinta y Tres	4	1	0.5	0-1,90
Lavalleja	7	1	0.007	0-0,05
Cerro Largo	5	0	0	
Rocha	6	0	0	
Montevideo	1	0	0	
Rivera	11	0	0	
Artigas	4	0	0	
Total	101	51		

Tabla 1. Cuantificación de esporas de *P.l. larvae* por gramo de miel

Nuestros resultados indican que el agente bacteriano está presente en la mayor parte del país, aunque difiere según las regiones. La miel de los departamentos del Litoral Oeste es claramente la más contaminada con esporas de Loque americana. Las muestras

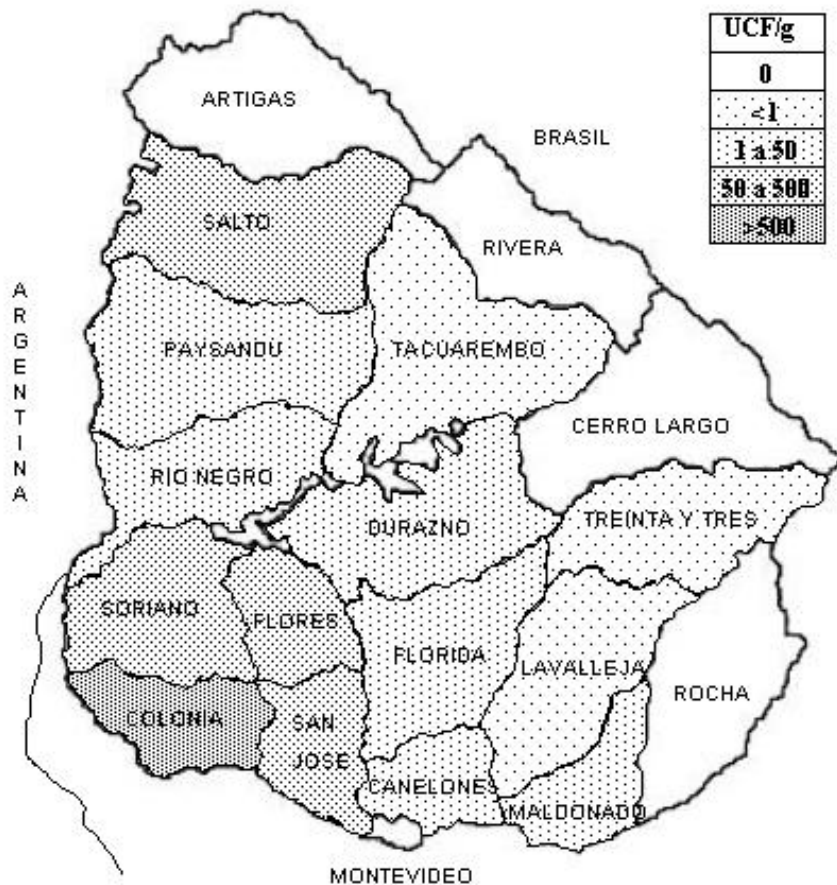


Figura 1 : Distribución de esporas *Paenibacillus larvae larvae* por departamento.

provenientes de Colonia poseen la mayor carga, presentando algunas más de 1000 esporas por gramo de miel. Los valores disminuyen gradualmente hacia el Este y Norte del país. En el caso de Soriano, Flores, San José y Salto la carga bacteriana decrece. Tacuarembó, Treinta y Tres y Lavalleja presentaron menos de una espora por gramo. En las muestras provenientes de Rivera, Cerro Largo, Artigas, Rocha y Montevideo no se detectó esporas

de *P.l. larvae*. Es necesario señalar que de este último departamento solamente se consiguió una muestra para analizar

Discusión

El padrón de presencia y prevalencia sugiere que la bacteria ingresó, probablemente, a Uruguay desde el Suroeste y que desde allí, se está dispersando al resto del territorio. No sería de descartar el arribo recurrente del agente mediante enjambres naturales desde Argentina y también con la introducción de abejas de ese país o, con menor frecuencia, de otros países donde está presente la enfermedad. Además, estaría fundamentalmente relacionado con la densidad de colmenas y apiarios y con la antigüedad de la actividad apícola. Los departamentos del litoral Suroeste fueron los pioneros, tanto por sus particularidades históricas y sociales, como por la diversidad agrícola que hay en ellos. Esta apicultura de más de un siglo dio lugar a diferentes etapas y escalas productivas, que llevó, sobretodo en las últimas tres décadas, a un desarrollo muy intensivo. Dicho desarrollo incluye, además del aumento en la cantidad de colmenares, la importación de reinas y la aplicación, muchas veces preventiva, durante años, de tratamientos sanitarios. Es en esta región que se constata el efecto negativo sobre la producción apícola, no sólo de la Loque americana, sino también de la Varroosis, la Cría yesificada (Ascosperosis) y el síndrome de despoblación de colmenas.

La situación es sensiblemente diferente en la apicultura del Noreste, ésta es relativamente reciente, en franco desarrollo, con menor cantidad de apicultores, colmenas y en otras condiciones agroecológicas. No parece, por ahora, presentar problemas sanitarios. Seguramente lo hará en más o menos tiempo, en la medida que aumente el número de apiarios, se apliquen ciertos vicios de manejo y se incremente el intercambio activo de material vivo de las regiones más afectadas. Por ejemplo el traslado de colmenas para polinizar semilleros o la apicultura trashumante.

Es importante tener en cuenta que, recientemente, Schuch, et al. 2003, aislaron esporas de *P.l. larvae* en miel y abejas en Rio Grande do Sul. Si bien no aportan datos numéricos, indican que la cantidad de esporas es baja, no habiendo encontrado síntomas clínicos de campo en las colonias inspeccionadas. Sea cual fuere el medio de entrada discutido por los autores, del otro lado de esa frontera se comprueba algo que tardó en ser admitido, la presencia de esta bacteria, por lo menos, en el Sur de Brasil.

Frente a todo esto pensamos que no es bueno esconder o negar el problema, igualmente perjudicial sería magnificarlo. Hace mucho tiempo que la Loque americana está entre nosotros y también sabemos que la tienen, con más o menos intensidad, los países limítrofes. Necesitamos aumentar nuestro conocimiento sobre esta enfermedad, familiarizar a los apicultores con los síntomas de campo y realizar estudios que nos permita efectuar un manejo sanitario adecuado.

La detección de esporas de *P.l. larvae* en muestras de miel no es un indicador absoluto de la ocurrencia mediata o inmediata de la Loque americana. Hay varias razones para que no exista una relación directa entre la contaminación de la miel y la manifestación clínica de la enfermedad. Por ejemplo, se requiere de un nivel mínimo de esporas para contaminar y enfermar a las larvas. No todas las cepas de *P.l. larvae* son igualmente virulentas, además

existe diferencias en la respuesta defensiva a esta bacteria entre poblaciones de abejas. Posiblemente la interacción entre éstos y otros factores determinen la ocurrencia de la enfermedad (Graaf, et al. 2001).

Hasta ahora los síntomas clínicos de campo de la Loque americana tienen prevalencia en los departamentos cuyas mieles poseen los mayores niveles de esporas. Correlativamente, no se ha constatado, por las informaciones indirectas que manejamos, los síntomas característicos de esta enfermedad en aquellos departamentos cuyas mieles presentan baja o nula contaminación.

Perspectivas

Pensamos que los resultados de nuestro trabajo brindan información útil en la elaboración de un programa de control de esta enfermedad en Uruguay. Estamos analizando la diversidad de un amplio rango de aislamientos de bacterias colectadas en diferentes regiones. Esto contribuirá a la elucidación de aspectos básicos a nivel nacional, incluyendo rutas de entrada, dispersión, resistencia a antibióticos y la posible relación entre diferentes cepas y síntomas clínicos.

Agradecimientos

A los apicultores e Intendencias Municipales que colaboraron en el muestreo.
A la Lic. Graciela Vila y a Alejandra Díaz, de Biblioteca INIA - La Estanzuela, por la búsqueda bibliográfica.

Referencias

- Bailey, L; Ball, BV (1991) Honey bee pathology. 2. ed. London, Academic Press.
- Graaf, D C de; Vandekerchove, D; Dobbelaere, W; Peeters, JE; Jacobs, FJ. 2001. Influence of the proximity of American foulbrood cases and apicultural management on the prevalence of *Paenibacillus larvae* spores in Belgian honey. *Apidologie* 32: 587-599.
- Hansen, H; Brodsgaard, C.1999. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World* 80: 5-23.
- Hansen, H; Brodsgaard, C J; Kryger, P; Nicolaisen, M. 2003. A scientific note on the presence of *Paenibacillus larvae larvae* spores in sub-Saharan African honey. *Apidologie* 34: 471-472.
- Piccini, C; Zunino, P. 2001. American foulbrood in Uruguay: isolation of *Paenibacillus larvae larvae* from larvae with clinical symptoms and adult honeybees and susceptibility to oxitetracycline. *Journal of Invertebrate Pathology* 78: 176-177.
- Piccini, C; D'Alessandro, B; Antúnez, K; Zunino, P. 2002. Detection of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae* spores in naturally infected larvae and artificially contaminated honey by PCR. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 761-765.

Schuch, DMT; Tochetto, LG; Sattler, A. 2003. Isolamento de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* no Brasil. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 38: 441-444.

Wedenig, M; Riessberger-Gallé, U; Crailsheim, K. 2003. A substance in honey bee larvae inhibits the growth of *Paenibacillus larvae larvae*. Apidologie 34: 43-51.