

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

Karina Antúnez¹, Bruno D'Alessandro¹, Claudia Piccini¹, Eduardo Corbella², Pablo Zunino¹

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 afectan a las larvas de abejas melíferas. Es causada por la bacteria *Paenibacillus larvae larvae* y está presente a nivel mundial en la casi totalidad de las regiones donde se practica apicultura. 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 a nivel nacional, por primera vez en el año 2000, a partir de larvas con síntomas característicos y de abejas de colonias aparentemente sanas (Piccini y Zunino, 2001).

A diferencia de la Loque europea, la Loque americana mata a la cría después de que las celdas son operculadas; en su mayoría en el estadio de prepupa, cuando las larvas ya elaboraron el capullo, se apoyaron dorsalmente en el interior de las celdas y orientaron su cabeza hacia el opérculo. Cuando se manifiesta la enfermedad, los opérculos que cubren las larvas muertas aparecen hundidos, oscuros y húmedos. Frecuentemente presentan un pequeño orificio en el centro, hecho por las propias abejas. Proceso este que puede llevar al desoperculado total de las celdas, dejando expuestas a las larvas muertas. Estas presentan una coloración amarronada, son viscosas y carecen de forma. Al secarse forman escamas duras, fuertemente adheridas a la pared de las celdas, conservando la cápsula cefálica y la glosa extendida (Baily & Ball, 1991; Hansen & Brodsgaard, 1999).

P.l. larvae alterna una fase de crecimiento y multiplicación en el interior de las larvas ocasionando su muerte, con una fase de dispersión y de reinfección bajo la forma de esporas. Estas esporas resisten altas temperaturas y la acción de diversos agentes químicos y pueden permanecer viables durante muchos años. La mayoría de las colonias afectadas son tratadas habitualmente con antibióticos, la más empleada es la oxitetraciclina, lo que no llega a eliminar al agente por no matar a las bacterias, apenas impide temporalmente su multiplicación. Por otra parte, esta medida puede acarrear riesgos adicionales, como ser la contaminación de la miel con residuos del producto y la generación potencial de cepas bacterianas resistentes.

Debemos aclarar que el consumo de miel con esporas de la bacteria de la 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 la miel, el polen o la jalea real.

Los niveles de contaminación en miel con esporas de *P.l. larvae* tienen mucha importancia desde el punto de vista epidemiológico. Es de esperar que la miel de colonias afectadas por Loque americana presente esporas contaminantes, aunque también se ha

detectado esporas en muestras de miel provenientes de colonias que no presentaban síntomas de la enfermedad. Por estos motivos, la detección de esporas en miel es una herramienta sumamente útil, tanto para el diagnóstico anticipado como para la prevención mediante la aplicación de manejos que ayuden a su control sanitario.

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, con la administración del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Este proyecto posibilitó la implementación de una técnica diagnóstica 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, esta técnica se basa en el reconocimiento de secuencias del ADN de *P.l. larvae*. Una vez que fue puesta a punto se demostró que la técnica es específica, sensible y rápida, presentando un alto poder de discriminación de *P.l. larvae*.

El desarrollo de esta tecnología permite contar con un medio útil no sólo para el diagnóstico, sino también para el diseño de medidas de control de la Loque americana a nivel nacional.

A partir del 2002, el Laboratorio de Microbiología de I.I.B.C.Estable y el INIA llevan adelante un estudio para conocer la presencia de esporas del agente causal de la Loque americana en muestras de mieles de la temporada 2001-2002 provenientes de apiarios de todo el país, obtenidas directamente de los productores.

Materiales y métodos

Analizamos 101 muestras de miel de todos los departamentos del país mediante cultivo en Medio Semiselectivo J. Los aislamientos se caracterizaron por la forma, márgenes de las colonias, reacciones químicas, observación al microscopio de los preparados bacterianos 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 cantidad de esporas recuperadas mediante cultivo de las muestras de miel y su distribución geográfica se presenta en la tabla 1.

Los resultados indican que el agente bacteriano está distribuido en la mayor parte de nuestro territorio, aunque su presencia difiere según las zonas. Los departamentos del Litoral Oeste aparecen claramente como los más afectados. Las muestras provenientes de Colonia poseen la mayor carga, llegando a presentar algunas más de 1000 esporas por gramo de miel. Estos valores disminuyen gradualmente hacia el este y norte del país. En las mieles de Soriano, Flores y San José la carga bacteriana decrece. Las de 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.

Es necesario señalar que del Departamento de Montevideo se consiguió solo una muestra para analizar

Origen de las Muestras	Muestras analizadas	Muestras contaminadas	Promedio de esporas	Variación de las esporas
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	

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

Este padrón de distribución sugiere que la bacteria ingresó a Uruguay desde el Suroeste y que desde allí se está dispersando al resto del territorio. No se descarta el arribo recurrente del agente mediante enjambres naturales de Argentina, también con la introducción de abejas y reinas de ese país, como de otros países donde está presente la enfermedad. Además, su distribución estaría relacionada con la densidad de colmenas y apiarios y la antigüedad de la actividad apícola en los distintos departamentos.

Aunque la detección de esporas en muestras de miel no es un indicador absoluto de la ocurrencia de la Loque americana, puede ser una buena herramienta epidemiológica. Hasta ahora los síntomas clínicos de campo de esta enfermedad se manifiestan en los departamentos cuyas mieles poseen los mayores niveles de esporas. Correlativamente, no se ha constatado, al momento, síntomas característicos de Loque americana en los departamentos cuyas mieles presentan baja o nula contaminación de esporas.

Perspectivas

Pensamos que los resultados de nuestro trabajo brindan información útil para la elaboración de un programa de control de la Loque americana en Uruguay. En la actualidad estamos analizando la diversidad y prevalencia de un amplio rango de aislamientos de esta bacteria colectados en diferentes regiones del país. Esto podrá contribuir a la elucidación de algunos aspectos básicos de esta enfermedad a nivel nacional, incluyendo las posibles rutas de entrada, su dispersión, la resistencia a antibióticos y la posible relación entre las diferentes cepas y los síntomas clínicos.

Agradecimientos

A los apicultores que nos confiaron su miel.

A las intendencias municipales que colaboraron en el muestreo.

Referencias

Bailey, L; Ball, BV (1991) Honey bee pathology. Academic Press; London, UK (2nd edition).

Hansen, H; Brodsgaard, C (1999) American fouldbrood: a review of its biology, diagnosis and control. Bee World 80: 5-23.

Piccini, C; Zunino, P (2001) American fouldbrood 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.