

LOQUE AMERICANA

RESUMEN

*La Loque americana afecta a la larva de la abeja de miel *Apis mellifera* y de otras sub-especies de *Apis* en todo el mundo. El organismo causante de esta enfermedad, la subespecie *larvae* (White), de *Paenibacillus larvae* (White), es una bacteria que puede producir más de mil millones de esporas en cada larva infectada. Las esporas son extremadamente resistentes al calor y a los agentes químicos y ellas solas son capaces de inducir la enfermedad.*

Identificación del agente: *Los panales de las colonias infectadas tienen una apariencia moteada debido a una mezcla de crías operculadas sanas, celdas no operculadas que contienen restos de larvas enfermas y celdas vacías. Esto no es sólo característico de la Loque americana. Las celdas operculadas de una larva enferma aparecen húmedas y oscuras, volviéndose cóncavas y, posiblemente, perforadas a medida que progresa la infección. El color de la larva o pupa cambia a marrón crema y luego a marrón oscuro con una apariencia viscosa cuando se extraen. Durante el estadio avanzado se desprende un olor característico. Eventualmente, la cría enferma se seca y forma unas escamas frágiles características, que se adhieren fuertemente a las partes bajas de las celdas. La formación de una lengua pupal es una de las señales más características de la enfermedad, aunque raramente observada, y precede a la formación de escamas.*

*El método a utilizar para el diagnóstico de la Loque americana depende de si los signos clínicos de la enfermedad están presentes o no. En caso de enfermedad clínica, se dispone de diferentes técnicas de laboratorio sencillas para su confirmación. Algunas de ellas requieren el aislamiento del agente patógeno por medio de sub-cultivos. La presencia de esporas resistentes al calor, las características de crecimiento de la bacteria, y la morfología de la colonia, combinadas con las siguientes pruebas simples de laboratorio, se consideran concluyentes: tinción de Gram, prueba de la catalasa, y prueba de la reducción de nitratos (facultativa). Puede realizarse una identificación completa de la bacteria aislada estableciendo su perfil bioquímico o mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta última también permite el examen directo de los restos de la larva sin llevar a cabo la larga etapa de cultivo previo. Las técnicas basadas en los anticuerpos son útiles cuando no se han demostrado reacciones cruzadas con otros bacilos, por ejemplo contra el *Paenibacillus alvei*, que se encuentra con frecuencia en la última fase de la Loque europea.*

Cuando no existen signos clínicos o no se tiene información sobre la apariencia de los panales de crías (exámenes de los productos de las abejas melíferas), se recomienda la identificación del agente patógeno. Ésta puede realizarse mediante perfil bioquímico (de las colonias aisladas sospechosas) o por PCR (directamente sobre las muestras o después del cultivo). Sólo las personas experimentadas pueden basarse en las características del crecimiento, en la morfología de la colonia y en la utilización exclusiva de sencillas técnicas de confirmación de laboratorio antes mencionadas.

Pruebas serológicas: *No existen pruebas serológicas disponibles.*

Requisitos para las vacunas y los materiales de diagnóstico: *No existen productos biológicos disponibles.*

A. INTRODUCCIÓN

La Loque americana es una enfermedad que afecta a la larva de la abeja de miel *Apis mellifera* y de otras sub-especies de *Apis*, y se da en todas las zonas del mundo donde se crían tales abejas. El organismo causante, *Paenibacillus larvae* subesp. *larvae*, es una bacteria que puede producir más de mil millones de esporas en cada

larva infectada. La bacteria es un bacilo de extremos redondeados, recto o, a veces, curvo, que varía mucho de tamaño (0,5 μm de ancho por 1,5–6 μm de largo), y se presenta solo, en cadenas y en filamentos; algunas cepas son móviles. Con frecuencia, los esporangios son escasos *in vitro*, y las esporas elipsoidales, centrales o sub-terminales, que pueden deformar el esporangio se con frecuencia se encuentran libres (15). Las esporas son extremadamente estables al calor y resistentes a los agentes químicos. Sólo las esporas son capaces de inducir la enfermedad.

La infección puede transmitirse a la larva por las abejas nodrizas o por las esporas que permanecen en la base de las celdas de las crías. Aunque las larvas de las abejas obreras, de los zánganos y de las reinas son susceptibles de infección, las larvas de las reinas y los zánganos infectadas se observan raramente en condiciones naturales. La susceptibilidad de las larvas a la Loque americana disminuye cuando aumenta la edad (32); las larvas no pueden ser infectadas después de transcurridas 53 horas después de que el huevo ha eclosionado. La dosis media infectiva (ID_{50} = dosis de spora con la cual un 50% de las larvas mueren) necesaria para el inicio de la infección, aunque muy variable, es 8.49 esporas para las larvas que tienen entre 24 y 48 horas de vida (13). La forma más común de propagación de la enfermedad de una colonia a otra es el intercambio de panales con restos de larvas enfermas. Además, la enfermedad también puede propagarse por el robo de miel cargada de esporas o la alimentación con esta miel, por enjambres artificiales y por la introducción de reinas procedentes de colonias infectadas. La pronta detección de la Loque americana puede ayudar a prevenir la propagación de la enfermedad.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente

Una larva sana tiene un color blanco perla brillante. Primero se desarrolla en forma de C en el fondo de la celda y posteriormente crece erguida hasta llenar la celda. Las larvas infectadas mueren en esta posición erecta. En colonias seriamente afectadas, los panales parecen estar moteados debido a una combinación de crías operculadas sanas, células no operculadas con restos de larvas enfermas y celdas vacías. El opérculo de una celda que contiene una larva enferma aparece húmedo y oscurecido y empieza a ponerse cóncavo y perforado a medida que avanza la infección. También la larva o pupa cambia de color, primero a marrón cremoso y, eventualmente, a marrón oscuro. Las larvas adquieren una consistencia glutinosa y pueden extraerse como hilos insertando una sonda dentro de los restos de la larva y retirándola de la celda. En esta etapa la larva adquiere un olor característico parecido a la cola animal. Finalmente, después de un mes o más, los restos de las crías enfermas se secan formando las típicas escamas oscuras y duras que son frágiles y se adhieren fuertemente a las paredes bajas de la celda. (Figura 1). Si la muerte tiene lugar durante el estado pupal, la formación de la lengua pupal, una protuberancia que va desde la cabeza pupal atravesando la parte superior de la celda, es uno de los signos más característicos de la enfermedad, aunque esto raramente se puede ver. (Figura 2c). La lengua puede persistir también en la escama seca.

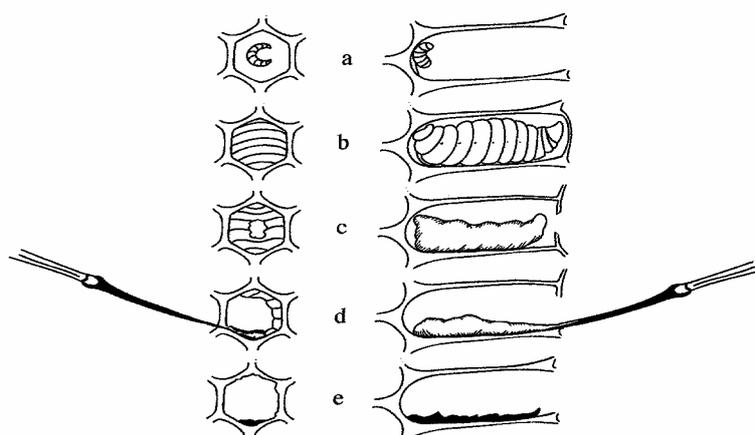


Fig. 1. Progresión de la enfermedad: (a) Punto de infección. (b) Desarrollo de la larva hasta la etapa prepupal. (c) Se reduce el contenido de las celdas y la operculación se hace hacia dentro o es perforada. (d) El contenido de las celdas se vuelve glutinoso. (e) Escama residual fuertemente adherida a la base de la celda.

El método a utilizar para el diagnóstico de la Loque americana depende de si los signos clínicos están presentes o no. En caso de enfermedad clínica, se dispone de varias técnicas sencillas de laboratorio para confirmarla. Algunas de ellas requieren el aislamiento del agente patógeno por sub-cultivo. La presencia de esporas resistentes al calor, las características de crecimiento de la bacteria, y la morfología de la colonia, combinadas con las siguientes pruebas simples de laboratorio, se consideran concluyentes: tinción de Gram, prueba de la catalasa, y prueba de la reducción de nitratos (facultativa). Puede realizarse una identificación completa de la bacteria aislada mediante el establecimiento del perfil bioquímico o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta última también permite el examen directo de los restos de la larva sin llevar a cabo la larga etapa de cultivo previo. Se describen otros métodos para el examen directo de los restos de la larva: la técnica modificada de la gota pendiente, la prueba láctea de Holst y diferentes técnicas basadas en anticuerpos. La técnica modificada de la gota pendiente basada en los movimientos Brownianos de las esporas de *P.I. larvae*, y en su morfología tiene una especificidad baja. Lo mismo cabe decir de la prueba láctea de Holst que está basada en un alto nivel de actividad proteolítica durante la esporulación de *P.I. larvae*. Ambas pruebas no deben usarse por sí solas. Las técnicas basadas en anticuerpos son útiles cuando se demuestre la ausencia de una reacción cruzada con otros bacilos, por ejemplo, contra *Paenibacillus alvei*, que se encuentra a menudo en la fase final de la Loque europea.

Cuando no existen signos clínicos o no se tiene información sobre la apariencia de los panales de cría (examen de los productos de las abejas melíferas), se recomienda una identificación cuidadosa del agente patógeno. Esto puede hacerse por perfil bioquímico (en colonias sospechosas aisladas) o por PCR (directamente en las muestras después del cultivo). Sólo personas experimentadas pueden basarse en las características de crecimiento, en la morfología de las colonias y únicamente en las técnicas de laboratorio de confirmación simples antes mencionadas.

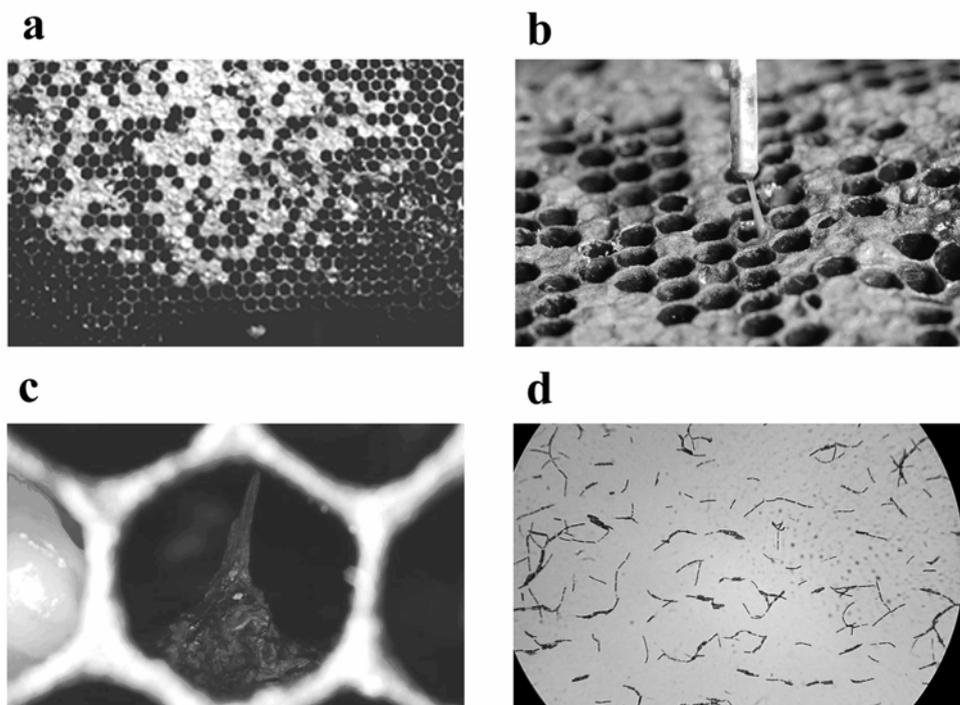


Fig. 2. Loque americana clínica (a–c) y reacción de Gram (d): (a) Los panales tienen apariencia moteada. (b) Un palillo saca restos de larva marrones y semi-fluidos en forma de hilo viscoso. (c) La formación de una lengua pupal es un signo característico, pero es raro que se la vea. (d) El examen microscópico de colonias aisladas revela bacilos Gram-positivos, que se encuentran aislados o en cadenas.

a) Preparación de la muestra

Cuando se observan signos típicos de la enfermedad en el apiario, se recomienda enviar al laboratorio una porción del panal de cría de aproximadamente 20 cm², que contenga el mayor número posible de crías muertas y descoloridas. En la muestra no debe haber miel. La muestra puede envolverse en papel, sin apretarla, y deben evitarse envoltorios tales como bolsas de plástico, papel de aluminio, papel parafinado, lata o cristal, dado que con dichos materiales las muestras se enmohecen, lo que casi imposibilita la realización de un diagnóstico preciso. Las muestras pueden enviarse en una caja de cartón grueso o de madera. Si no se puede enviar una parte del panal, la sonda utilizada para examinar el contenido de las

celdas debe contener suficiente material para realizar cualquier prueba. Ésta también puede envolverse en papel o colocarse en un tubo apropiado. Sin embargo, sólo puede tenerse en cuenta una muestra de tamaño tan pequeño, cuando la persona que la toma es suficientemente experta o está bien entrenada para identificar las áreas enfermas en el panal.

Algunas veces los restos de las larvas son difíciles de localizar debido a las condiciones del panal. El material de las escamas puede localizarse de forma efectiva utilizando luz ultra-violeta o casi ultra-violeta. La exposición entre 310 y 400 nm provocará la fluorescencia de cualquier material de escamas. Debe utilizarse esta técnica con cierto cuidado, dado que tanto la miel como el polen también pueden tornarse fluorescentes.

Cuando el examen macroscópico del apiario realizado por una persona experimentada revela que los panales de cría tienen una apariencia sana, deben enviarse muestras de miel al laboratorio para ser analizadas. Las muestras procedentes de alimentos y recogidas de las celdas operculadas cercanas al nido de cría, pueden tomarse con una cuchara y colocarse dentro de una bolsa o tubo de plástico (31). También se puede tomar la miel recolectada lista para la venta, aunque esto no permite la identificación de las colonias enfermas si hay esporas presentes en la muestra. El tamaño de las muestras debería ser de 30 a 50 gramos.

b) Técnicas de cultivo

Para cultivar *P. l. larvae* a partir de los restos larvales, se preparan suspensiones de esporas en un tubo de ensayo mezclando el material infectado en 5-10 ml de agua esterilizada, solución fisiológica (tampón fosfato salino o NaCl al 0,9%) o en medio líquido (la misma composición del medio sólido descrita más adelante, pero sin agar). Todos los medios de cultivo deben someterse a control de calidad y deben permitir el crecimiento de *P. l. larvae* a partir de pequeños inóculos. En paralelo con las muestras sospechosas deberá cultivarse también una cepa de referencia para garantizar que las pruebas funcionan de forma correcta.

Para examinar las esporas de las muestras de miel, éstas se calientan a 45–50°C y se agitan para distribuir las esporas que estén presentes. Una dilución con un volumen igual de agua (25 ml), permite un manejo más fácil. La miel diluida se transfiere a un tubo de diálisis de 44 mm de ancho que se ha atado por un extremo. El extremo que está abierto se ata después de llenar el tubo. Los tubos se sumergen en agua corriente o en un baño de agua durante 18 horas, cambiando el agua 3-4 veces durante este período. Después de la diálisis, el contenido se centrifuga a 2.000 **g** durante 20 minutos. Se desecha el líquido sobrenadante dejando aproximadamente 1 ml (o menos) de residuo en cada muestra. El sedimento se resuspende en 9 ml de agua (29).

También puede prepararse la miel para cultivo sin realizar la fase de diálisis. Sin embargo, eso requiere un tiempo mayor (30 minutos) y una centrifugación más rápida (3.000 **g**). Asimismo, el volumen en el cual se resuspende el sedimento puede ser menor (200 µl) con el fin de aumentar la sensibilidad de la prueba (6). Cualquiera que sea el método que se elija, cuando se expresa el resultado de los análisis de la miel de manera cuantitativa y se fijan los valores límite, siempre se debe seguir estrictamente la metodología utilizada para establecer dichos valores.

Tanto las muestras tomadas de los panales de cría como las de miel pueden procesarse de la misma forma a partir de este momento. La suspensión se calienta a 80°C durante 10 minutos para matar las bacterias no esporuladoras. Se utiliza un hisopo de algodón aséptico para transferir una porción de la suspensión a la superficie de las placas de Petri que contienen medio sólido, las cuales se incuban durante 2-4 días a 34–37°C. Para una evaluación cuantitativa se recomienda extender un volumen fijo de la suspensión en agar sólido con una espátula aséptica en lugar de utilizar hisopos de algodón. Lo mejor es incubar las placas inoculadas en una atmósfera con 5–10% CO₂, aunque se podrá realizar también una incubación aeróbica.

Se pueden utilizar diferentes medios sólidos incluyendo agar infusión cerebro-corazón suplementado con tiamina HCl (29), medio J (19), MYPGP (7), medio de Michael (5) y agar Columbia que contenga sangre de caballo al 5% (15). Este último puede empezar a decolorarse o a hemolisarse parcialmente cuando *P.l. larvae* crece en dicho medio.

Las muestras obtenidas de larvas clínicamente enfermas darán lugar a placas con crecimiento confluyente después de 2 a 4 días, lo que conduce a la fase de subcultivo con el fin de obtener colonias aisladas. En agar sangre Columbia, las colonias son pequeñas (< 1 mm de diámetro), regulares, brillantes, mantecosas, y de color grisáceo o descolorido, con pigmentos de sangre (15). En medio de Michael, las colonias son blanquecinas, opacas, aplanadas, con bordes irregulares y generalmente con un diámetro de 1-3 mm (5). Se recomienda a los técnicos sin experiencia operar en paralelo con las cepas de referencia de *P.l. larvae*, por ejemplo LMG 9820 (otra denominación es AYCC 9545). Una muestra de miel o de crías que ha resultado positiva puede servir como control positivo para el análisis completo.

Pueden surgir dificultades cuando las suspensiones de esporas contienen otras bacterias esporuladas, las cuales pueden saturar por completo el cultivo. Si esto es así, se recomienda complementar el medio sólido con ácido nalidíxico (18) y/o ácido pipemídico (2). Las soluciones madre se preparan disolviendo 0,3 gramos de ácido nalidíxico o 0,4 g de ácido pipemídico en 2 ml de NaOH 1 N y diluyendo a 100 ml con tampón fosfato 0,01M o agua, se esterilizan por filtración y se guardan refrigeradas. Estas soluciones madre se añaden al medio de agar líquido para obtener una concentración final de 6-9 µg/ml de ácido nalidíxico y 10–20 µg/ml de ácido pipemídico.

También se han recuperado esporas similares a *P. l. larvae* de la cera de las abejas por extracción con cloroformo (21) y del polen mediante filtración acuosa (10).

c) Pruebas confirmativas sencillas

Paenibacillus l. larvae es un bacilo Gram-positivo, con algunos rasgos que lo diferencian de muchos otros bacilos que contaminan a las abejas y a sus productos. En efecto, la bacteria es catalasa negativa (14) y reduce el nitrato a nitrito (23). En consecuencia, varias pruebas sencillas de laboratorio pueden confirmar la Loque americana si se observan signos clínicos y cuando el cultivo de muestras tratadas con calor produce colonias con una característica morfología y velocidad de crecimiento (lenta), que contienen bacilos Gram-positivos.

Prueba de la Catalasa: Se coloca una gota de peróxido de hidrógeno al 3% en un cultivo en crecimiento activo sobre un medio sólido. La mayoría de las bacterias aeróbicas descomponen el peróxido en agua y oxígeno, produciendo una espuma efervescente, pero *P.l. larvae* casi siempre es negativa a esta reacción. Cuando se utilizan cultivos en agar sangre Columbia la prueba no puede realizarse en medio sólido, dado que la presencia de sangre de caballo causaría una reacción falsa positiva. En este caso, las colonias deben transferirse a un portaobjetos limpio para la realización de la prueba.

Prueba de la reducción de nitratos: la bacteria puede obtenerse en medio agar infusión de cerebro-corazón que contenga nitrato de potasio (1-2 mg/litro de medio). Cuando tiene lugar el crecimiento, la adición de una gota de reactivo ácido sulfanílico -alfa-naftol produce un color rojo si el nitrato se ha reducido a nitrito. También se han descrito cepas nitrato reductasa negativas (16, 20).

d) Perfil bioquímico

Cuando el analista no puede basarse en la presencia de signos clínicos (por ejemplo, examen de los productos de las abejas melíferas) o cuando la enfermedad está aun en su fase subclínica, se recomienda una identificación más completa del agente patógeno. Puede considerarse como concluyente el establecimiento del perfil bioquímico de colonias aisladas sospechosas así como de sus características básicas (resistencia al calor, velocidad de crecimiento, morfología de la colonia y morfología de las bacterias). Para establecer el perfil bioquímico se requiere, además de las pruebas de catalasa y reducción de nitratos, antes mencionadas, la producción de ácido a partir de carbohidratos, la hidrólisis de almidón y caseína, la utilización de citrato y la licuación de gelatina.

Producción de ácidos a partir de carbohidratos (11): Las bacterias se cultivan en caldo J (la misma composición que la del medio J, pero sin agar), en el que el 0,5% del sustrato de prueba, esterilizado por separado en una solución acuosa, se sustituye por el azúcar. Los carbohidratos utilizados son L (+)-arabinosa, D (+)-glucosa, D (+)-xilosa y D (+)-trehalosa. Los cultivos se prueban a los 14 días tomando asepticamente 1 ml o menos, mezclando la muestra con una gota de púrpura de bromocresol alcohólico al 0,04% y observando el color del indicador. *Paenibacillus l. larvae* produce ácido de forma aeróbica a partir de la glucosa y de la trehalosa. No se produce ácido a partir de la arabinosa y la xilosa (1). La diferenciación entre *P. l. larvae* and *P. l. pulvificiens* –la última se asocia con la rara enfermedad de nombre “costra pulverulenta” – puede realizarse sobre la base de la producción de ácido a partir de manita y salicina (15). Este parece ser uno de los pocos rasgos que permiten la diferenciación de las sub-especies. Además, *P. l. pulvificiens* también crece a 20°C (*P. l. larvae* no lo hace) y algunas cepas producen colonias pigmentadas de color amarillo-naranja (15).

Hidrólisis de almidón (11): Se disuelve 1 g de almidón de patata en 10 ml de agua destilada fría, se mezcla con 100 ml de medio J sin glucosa, se autoclava, se enfría a 45°C y luego se mezcla con cuidado y se vierte en 5 placas de Petri. Después de 3 días de almacenamiento a temperatura ambiente (para permitir que se evapore el exceso de humedad), las placas se siembran por duplicado con cada cultivo. En los días 5 y 10 de la incubación, las placas se inundan con yodo de Gram. Transcurridos 15-30 minutos, el almidón que no ha cambiado se vuelve violeta y opaco. Una vez raspado el crecimiento, una zona clara debajo y alrededor del mismo indica hidrólisis del almidón. Las cepas de *Paenibacillus l. larvae* no hidrolizan el almidón.

Hidrólisis de la caseína (5): el medio que se utiliza para esta prueba se compone de una solución A (10 g de leche en polvo desnatada, 90 ml de agua destilada) y una solución B (3 g de agar, 97 ml de agua destilada) que se esterilizan por separado (a 121° C durante 20 minutos), se enfrían hasta 45°C y luego se mezclan. El medio así preparado (25 ml) se vierte en placas de Petri que son inoculadas con cultivos de 24 horas. Se prolonga la incubación sin interrupción durante 7 días. Una reacción positiva se indica por la clarificación del medio por debajo y alrededor de la zona de crecimiento de la colonia. *Paenibacillus l. larvae* produce una reacción positiva.

Utilización de citrato: éste se prueba utilizando medio J semi-sólido sin glucosa, pero suplementado con 2 g de citrato de sodio (11). El medio, esterilizado en tubos de ensayo, se inocula con dos o tres gotas de un cultivo reciente (de 3-4 días) en medio J semi-sólido. Los días 14 y 21 de la incubación, se mezcla una pequeña cantidad del cultivo con un indicador rojo de fenol. Una reacción alcalina significa que utiliza el citrato. *Paenibacillus l. larvae* no utiliza el citrato.

Crecimiento en caldo nutritivo (11): las bacterias se inoculan en un tubo de caldo nutritivo (3 g de extracto de carne, 5 g de peptona, 1.000 ml de agua destilada) y se incuban hasta que aparezca crecimiento o durante 14 días. Si el cultivo crece, se transfiere una pequeña cantidad a otro tubo de caldo nutritivo. Este procedimiento se repite de forma seriada con 10 transferencias sucesivas o hasta que no haya crecimiento. Sólo los cultivos que sobrevivan a las 10 transferencias seriadas se consideran aptos para crecer en caldo nutritivo. *Paenibacillus l. larvae* no es capaz de resistir la transferencia seriada en caldo nutritivo (1). Por el contrario *P. l. pulvificiens* puede crecer en este medio de rutina. (15)

Licuación de la gelatina (11): los cultivos en tubos de gelatina (120 g de gelatina, 1.000 ml de agua destilada, pH 7,0) incubados a 28°C se prueban para observar la licuación a intervalos de 3-4 días durante 4 semanas. Antes de la prueba, se ponen los cultivos a 20° C durante 4 horas aproximadamente para permitir que la gelatina se endurezca. *Paenibacillus l. larvae* licua la gelatina. (1).

Puede considerarse la utilización de kits comerciales, como API 50 CHB (5) y BBL CRYSTAL (8), para una caracterización bioquímica de *P. l. larvae*. Sin embargo, como se ha comprobado que estos equipos producen diferentes resultados para algunas de las reacciones bioquímicas, tiene que elaborarse un perfil de *P. l. larvae* para cada sistema de forma independiente (8).

e) Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR es una técnica de huella genética que permite la identificación de aislados bacterianos sospechosos y la detección de *P. l. larvae* en larvas clínica y subclínicamente enfermas y en los productos de las abejas melíferas. El tratamiento de las muestras depende de la aplicación de la prueba.

Se toma una colonia sospechosa, se suspende en 50 µl de agua destilada y se calienta a 95°C durante 15 minutos (12). Después de centrifugar a 5.000 x *g* durante 5 minutos, se añade como ADN molde 1 µl del sobrenadante a una mezcla de 50 µl para PCR que contiene MgCl₂ 2 mM, 50 pmoles de un cebador directo y uno inverso (las secuencias de los cebadores se indican más adelante), una concentración de 25-200 mM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato, y 1-1,25 U de polimerasa *Taq*. La amplificación de un fragmento específico del ADN se obtiene mediante un termociclador ajustado a las siguientes condiciones para la PCR: una etapa a 95° C (1-15 minutos); 30 ciclos a 93° C (1 minuto); 55°C (30 segundos) y 72°C (1 minuto) y un ciclo final a 72° C (5 minutos). Los pesos moleculares de los productos obtenidos de la PCR se determinan por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y tinción con bromuro de etidio.

Se suspenden los restos de dos larvas de abejas de miel enfermas en 1ml de agua destilada esterilizada y se mezcla bien; se diluyen 100 µl de esta suspensión con 900 µl de agua destilada. Esta dilución se agita y se utilizan 100 µl de la misma para extraer el ADN por calentamiento y centrifugación. (véase arriba) (9). El método PCR permanece igual en las diferentes aplicaciones.

El método de preparación para el ADN molde, anteriormente mencionado, basado en calentamiento y centrifugación, sólo puede utilizarse en las fases vegetativas de las bacterias. La extracción del ADN de las esporas requiere otro enfoque. En efecto, las suspensiones de esporas se centrifugan a 6.000 *g* y a 4°C durante 30 minutos. El precipitado se somete entonces a un tratamiento en microondas durante 5 minutos a la máxima potencia para romper las esporas, y el ADN liberado se suspende en 30 µl de Tris/HCl 10 mM, pH 8,0, que contenga ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM. Cuando se trata de detectar las esporas en la miel, el ADN se diluye de forma seriada con agua destilada esterilizada para eliminar la inhibición de la PCR causada por la miel (28). Se ha descrito otro método de extracción del ADN basado en el tratamiento con lisozima y la proteinasa K (4).

Se pueden obtener buenos resultados incubando una suspensión de esporas precipitadas (por ejemplo, de una muestra de miel o de larvas infectadas subclínicamente) en caldo MYPGP a 37°C durante 2-24 horas.

La suspensión se centrifuga después a 14.500 **g** durante 5 minutos, se lava con agua destilada esterilizada y se resuspende en 200 µl de agua destilada esterilizada. Esta breve fase de incubación hace que las esporas germinen haciendo que sean sensibles para la preparación de ADN mediante un nuevo tratamiento por calor (véase arriba) (22).

Se ha demostrado que varias combinaciones de cebadores basadas en el gen rRNA 16S son específicas de especie. Es posible la diferenciación entre *P. l. larvae* and *P. l. pulvificiens* utilizando el conjunto de cebadores proporcionado por Piccini *et al.*, cuando el número de ciclos se reduce de 30 a 25 (28). Las secuencias de los cebadores son:

Ref.	Dirección	Secuencia	Tamaño del producto-PCR	Nivel de especificidad
(12)	Directo inverso	5'-AAG-TCG-AGC-GGA-CCT-TGT-GTT-TC-3' 5'-TCT-ATC-TCA-AAA-CCG-GTC-AGA-GG-3'	973 bp	especies
(9)	Directo Inverso	5'-CTT-GTG-TTT-CTT-TCG-GGA-GAC-GCC-A-3' 5'-TCT-TAG-AGT-GCC-CAC-CTC-TGC-G-3'	1106 bp	especies
(28)	Directo inverso	5'-CGA-GCG-GAC-CTT-GTG-TTT-CC-3' 5'-TCA-GTT-ATA-GGC-CAG-AAA-GC-3'	700 bp	subespecies

La identificación de las dos subespecies también es posible mediante la digestión posterior, con endonucleasa *HaeIII*, de un fragmento de ADNr 16S amplificado por PCR (3). A tal efecto, los cebadores que se utilizan tienen una especificidad mucho más baja y amplifican los genes rRNA 16S de las especies de *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* y *Virgibacillus*

f) Técnica modificada de la gota pendiente

La técnica modificada de la gota pendiente (21) se puede realizar directamente con los restos de las larvas. Sin embargo, esta técnica no es concluyente debido a su baja especificidad.

Se mezcla el material sospechoso con agua y se coloca una gota de esta suspensión en un cubre, se seca, se fija por calor, y se tiñe durante 30 segundos con carbol fucsina o una tinción para esporas adecuada. Se aclara con agua cualquier exceso de colorante. Mientras la preparación está aún húmeda, el cubreobjetos se invierte sobre un porta sobre el que se ha colocado una fina capa de aceite de inmersión. El exceso de agua saldrá a la superficie. Se seca el porta con cuidado y se examina con un microscopio de gran potencia. Mediante el examen de zonas en las que se han formado bolsas de agua en el aceite, se verán las esporas de *P.l. larvae* mostrando un movimiento Browniano. Frecuentemente, las esporas de otros bacilos permanecen fijas; además, esta técnica permite el examen microscópico de la morfología característica de las esporas de Loque. Si la infección tiene menos de 10 días, se presentan formas vegetativas largas de la bacteria y se pueden observar algunas esporas recién formadas (24).

g) Prueba láctea de Holst

La prueba láctea de Holst (17) se basa en el hecho de que *P.l. larvae* produce una gran cantidad de enzimas proteolíticas durante la esporulación. Esta prueba se realiza suspendiendo una escama sospechosa, o un frotis de una larva enferma en un tubo que contenga 1-4 ml de leche en polvo desnatada al 1%. El tubo se incuba a 37°C. Si *P.l. larvae* está presente, la suspensión se aclarará en 10-20 minutos

h) Técnicas basadas en anticuerpos

Se han desarrollado diferentes técnicas basadas en anticuerpos para el diagnóstico de la Loque americana. La mayoría de ellas utilizan suero policlonal de conejo obtenido frente a cultivos puros de *P.l. larvae*. En una prueba de inmunodifusión, los anticuerpos interactúan con el antígeno bacteriano durante un proceso de difusión doble, dejando líneas de precipitación (27). En la técnica de anticuerpos fluorescentes, estos anticuerpos se conjugan con un fluorocromo. El anticuerpo fluorescente resultante reacciona con un frotis bacteriano sobre un porta. Se enjuaga el antisuero sobrante y se examina el frotis con un microscopio de fluorescencia. *Paenibacillus l. larvae* se tiñe específicamente como una bacteria muy fluorescente sobre un fondo oscuro (26, 30, 33). Las técnicas basadas en anticuerpos son útiles cuando no se ha demostrado una reacción cruzada con otros bacilos, por ejemplo, contra *Paenibacillus alvei*, que se encuentra a menudo en la última fase de la Loque europea.

Existe un enzimoimmunoensayo en el que se utiliza un anticuerpo monoclonal específico para *P.l. larvae* (25).

2. Pruebas serológicas

No existen pruebas serológicas disponibles.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

No existen vacunas ni materiales de diagnóstico disponibles.

AGRADECIMIENTOS

Ilustraciones de Karl Weiss, tomadas de *Bienen-Pathologie*, 1984, y reproducidas con el amable permiso del autor y de Ehrenwirth-Verlag, Munich (Alemania). Las fotografías son del Laboratorio Central de Ciencia de York, (Reino Unido) y del Informatiecentrum voor Bijenteelt, Gent (Bélgica) y se han publicado con el amable permiso de Ruth Waite y Frans J. Jacobs, respectivamente

REFERENCIAS

1. ALIPPI A.M. (1992). Characterization of *Bacillus larvae* White, the causative agent of American foulbrood of honey-bees. First record of its occurrence in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.*, **24**, 67–72.
2. ALIPPI A.M. (1995). Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinean honeys by using a semi-selective medium. *Microbiologica SEM*, **11**, 343–350.
3. ALIPPI A.M., LOPEZ A.C. & AGUILAR O.M. (2002). Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American foulbrood of honeybees, by using PCR and restriction fragment analysis of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68** (7), 3655–3660.
4. BAKONYI T., DERAKHSHIFAR I, GRABENSTEINER E., NOWOTNY N. (2003). Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: comparison with isolation and biochemical characterization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69** (3), 1504–1510.
5. CARPANA E., MAROCCHI L. & GELMINI L. (1995). Evaluation of the API 50CHB system for the identification and biochemical characterization of *Bacillus larvae*. *Apidologie*, **26**, 11–16.
6. DE GRAAF D.C., VANDEKERCHOVE D., DOBBELAERE W., PEETERS J.E. & JACOBS F.J. (2001). Influence of the proximity of American foulbrood cases and apicultural management on the prevalence of *Paenibacillus larvae* spores in Belgian honey. *Apidologie*, **32**, 587–599.
7. DINGMANN D.W. & STAHLY D.P. (1983). Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 860–869.
8. DOBBELAERE W., DE GRAAF D.C., PEETERS J.E & JACOBS F.J. (2001). Comparison of two commercial kits for the biochemical characterization of *Paenibacillus larvae larvae* in the diagnosis of AFB. *J. Apic. Res.*, **40**, 37–40.
9. DOBBELAERE W., DE GRAAF D.C., PEETERS J.E & JACOBS F.J. (2001). Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR. *Apidologie*, **32**, 363–370.
10. GOCHNAUER T.A. & CORNER J. (1987). Detection and identification of *Bacillus larvae* in a commercial pollen sample. *J. Apic. Res.*, **13**, 264–267.
11. GORDON R.E., HAYNES W.C. & PANG C.H.N. (1973). The genus *Bacillus*. Agriculture Handbook No. 427, United States Department of Agriculture, Washington DC, USA.
12. GOVAN V.A., ALLSOPP M.H. & DAVISON S. (1999). A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 2243–2245.
13. HANSEN H. & BRODSGAARD C.J. (1999). American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World*, **80** (1), 5–23.
14. HAYNES W.C. (1972). The catalase test. An aid in the identification of *Bacillus larvae*. *Am. Bee J.*, **112**, 130–131.

15. HEYNDRIKX M., VANDEMEULEBROECKE K., HOSTE B., JANSSEN P., KERSTERS K., DE VOS P., LOGAN N.A., ALI N. & BERKELEY R.C. (1996). Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash *et al.* 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash *et al.* 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 270–279.
16. HITCHCOCK J.D. & WILSON W.T. (1973). Pathogenicity to honey bees of a strain of *Bacillus larvae* that does not reduce nitrate. *J. Econ. Entomol.*, **66**, 901–902.
17. HOLST E.C. (1946). A single field test for American foulbrood. *Am. Bee J.*, **86**, 14–34.
18. HORNITZKY M.A.Z. & CLARK S. (1991). Culture of *Bacillus larvae* from bulk honey samples for the detection of American foulbrood. *J. Apic. Res.*, **30** (1), 13–16.
19. HORNITZKY M.A.Z. & NICHOLLS P.J. (1993). J-medium is superior to sheep blood agar and brain heart infusion agar for the isolation of *Bacillus larvae* from honey samples. *J. Apic. Res.*, **32** (1), 51–52.
20. JELINSKI M. (1985). Some biochemical properties of *Bacillus larvae* White. *Apidologie*, **16** (1), 69–76.
21. KOSTECKI R. (1969). Studies on improvement of control of American foulbrood of the honey bee (in Polish). *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, **13**, 97–135.
22. LAURO F.M., FAVARETTO M., COVOLO L., RASSU M. & BERTOLONI G. (2003). Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *Int. J. Food Microbiol.*, **81**, 195–201.
23. LOCHHEAD A.G. (1937). The nitrate reduction test and its significance in the detection of *Bacillus larvae*. *Can. J. Res.*, **C15**, 79–86.
24. MICHAEL A.S. (1957). Droplet method for observation of living unstained bacteria. *J. Bacteriol.*, **74**, 831–832.
25. OLSEN P.E., GRANT G.A., NELSON D.L. & RICE W.A. (1990). Detection of American foulbrood disease of the honeybee, using a monoclonal antibody specific to *Bacillus larvae* in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Can. J. Microbiol.*, **36**, 732–735.
26. OTTE E. (1973). Contribution to the laboratory diagnosis of American foulbrood of the honey bee with particular reference to the fluorescent antibody technique. *Apidologie*, **4** (4), 331–339.
27. PENG Y.S. & PENG K.Y. (1979). A study on the possible utilization of immunodiffusion and immunofluorescence techniques as diagnostic methods for American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.*, **33**, 284–289.
28. PICCINI C., D'ALESSANDRO B., ANTUNEZ K. & ZUNINO P. (2002). Detection of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in naturally infected bee larvae and artificially contaminated honey by PCR. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 761–765.
29. SHIMANUKI H. & KNOX D.A. (1988). Improved method for the detection of *Bacillus larvae* spores in honey. *Am. Bee J.*, **128**, 353–354.
30. TOSHKOV A., VALARIANOV T. & TOMOV A. (1970). The immunofluorescence method and the quick and specific diagnosis of American foulbrood of bee brood (in German). *Bull. Apic.*, **13**, 13–18.
31. VON DER OHE W. & DUSTMANN J.H. (1997). Efficient prophylactic measures against American foulbrood by bacteriological analysis of honey for spore contamination. *Am. Bee J.*, **137** (8), 603–606.
32. WOODROW A.W. (1941). Susceptibility of honey bee larvae to American foulbrood. *Gleanings Bee Cult.*, **69**, 148–151.
33. ZHAVNENKO V.M. (1971). Indirect method of immunofluorescence in the diagnosis of foulbrood (American and European) (in Russian). *Veterinariia*, **8**, 109–111.

*

* *

NB: Existe un laboratorio de referencia de la OIE para Enfermedades de las abejas (véase el Cuadro en la Parte 3 de este *Manual de animales terrestres* o consúltese la página Web de la OIE para conseguir la relación más actualizada: www.oie.int).