

Diagnóstico clínico de Loque americana en colmenas y prevalencia de esporos viables de *Paenibacillus larvae* subs. *larvae* en miel de apiarios de Tandil

Clinical diagnostic of American Foulbrood in hives and prevalence of viable spores of *Paenibacillus larvae* subs. *larvae* in honey of apiaries from Tandil

Passucci¹, J.A., West¹, M., Torres¹, J.O., Ballesteros¹, B., Rodríguez², G. y Tabera³, A.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Prov. de Buenos Aires
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA H. Ascasubi

Resumen

Loque Americana es la más seria de las enfermedades de la cría de la abeja melífera, producida por el *Paenibacillus larvae* subs. *larvae*. Numerosos autores encontraron que colmenas con esporos de *Paenibacillus* en miel siguen siendo negativas a la signología clínica por 6 años. Para llevar adelante un programa de control es importante realizar un buen diagnóstico de la enfermedad. El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de esporos viables de *Paenibacillus larvae* subs. *larvae* en miel de apiarios de Tandil, mediante una técnica microbiológica y su comparación con el diagnóstico clínico a campo. En el año 2003 se seleccionaron 42 apiarios al azar, dividiéndose la muestra en forma proporcional al número de colmenas por productor. Los productores fueron previamente clasificados en 7 estratos. De cada apiario se seleccionaron 6 colmenas en forma sistemática, las cuales fueron revisadas para la detección de signos clínicos de Loque Americana y se les tomaron muestras de miel. Se hizo un pool de muestras por apiario, que fueron analizadas para la detección de esporos viables de *Paenibacillus larvae* subs. *larvae*, comparándose los resultados de laboratorio con el diagnóstico clínico. De los 42 apiarios analizados, el 66,6% fue positivo al aislamiento. El 100% de los apiarios con signología clínica fue positivo al aislamiento, mientras que el 46% de los colmenares sin signología clínica fue positivo al aislamiento. No existen diferencias entre el número de colmenas que tienen los productores y el aislamiento de esporos. El alto porcentaje de aislamientos muestra que el agente causal de Loque Americana está ampliamente distribuido en los apiarios de Tandil, lo que determina la necesidad de tomar medidas preventivas de manejo contra la enfermedad para evitar la aparición de los signos clínicos y un brote de la enfermedad. Debido a la alta proporción de apiarios sin signología clínica pero con aislamiento del agente etiológico, se recomienda la utilización de esta técnica como complemento necesario a cualquier programa de control de la enfermedad basado en

Recibido: marzo de 2005

Aceptado: marzo de 2006

1. Área Epidemiología Básica, Fac. Cs. Veterinarias, UNCPBA. Pinto 399. (7000) Tandil. japass@vet.unicen.edu.ar

2. INTA Ascasubi.

3. Laboratorio Calidad de Miel, Fac. Cs. Veterinarias, UNCPBA.

medidas de manejo.

Palabras clave: Loque americana, cuantificación, diagnóstico a campo, diagnóstico microbiológico.

Summary

American foulbrood is the most harmful disease of honey bee brood. The causal agent is *Paenibacillus larvae* subs. *larvae*. Several authors had shown that hives with spores of *Paenibacillus* in honey continue without clinical symptoms over 6 years. For carrying out a control programme it is important to make a good diagnosis of the disease. The aim of this study was to determine the prevalence of viable spores of *Paenibacillus larvae* subs. *larvae* in honey of apiaries from Tandil applying a microbiological test and to compare it with clinical diagnosis. In 2003, 42 apiaries were selected at random and the sample size was proportionally allocated to the number of hives per beekeeper, who were previously classified in 7 strata. From each apiary six hives were systematically selected and they were checked to look for clinical symptoms of American foulbrood. Furthermore, honey samples were taken. It was made a pool of samples per apiary which were analysed to detect viable spores of *Paenibacillus*. Then, laboratory results were compared with clinical ones. From 42 apiaries studied, 66.6% had causal agent isolations. 100% of the apiaries with presence of clinical symptoms had causal agent isolations, while 46% of the hives without presence of clinical symptoms did so. High isolation percentages show that causal agent for American foulbrood is widely spreaded in Tandil apiaries and it determines the need of taking preventive management measures against the disease to avoid clinical symptoms and disease outbreaks. Due to the high proportion of apiaries without presence of clinical symptoms, but positive to the causal agent isolation, it is suggested to apply this technique as a useful complement to any disease control programme based on management measures. Key words: American foulbrood, measurement, visual diagnostic, microbiology diagnostic.

Introducción

Loque Americana (LA) es la más seria de las enfermedades de la cría que afectan a la abeja melífera y uno de los mayores problemas para el desarrollo de la apicultura en nuestro país.

Su agente etiológico es el *Paenibacillus larvae* subs. *larvae*; bacilo de unas 2,5 micras de longitud por 0,4 a 0,8 micras, móvil con flagelos. Una característica de dicho agente es la formación de endosporas, las que son sumamente resistentes al calor, desinfectantes químicos y radiaciones UV, pudiendo permanecer infectantes por más de 40 años.

Las vías de transmisión de dicha enfermedad son: deriva de abejas, pillaje, ali-

mentación con miel ó polen contaminado, intercambio de material entre colmenas enfermas y sanas, herramientas contaminadas utilizadas por el apicultor para el trabajo diario en el apiario y compra de material vivo no certificado libre de esta enfermedad (PROAPI, 1994).

Entre las medidas de control utilizadas por los productores se encuentran medidas de manejo como la revisión periódica de todas las colmenas del apiario; destrucción por medio de fuego de las colonias enfermas (cuando la prevalencia es baja); el paqueteado, el cepillado doble o simple de abejas (Del Hoyo et al., 1999); la desinfección de material apícola por medio del fuego, parafina caliente (Del Hoyo et al.,

1998 a,b) o lavado por soda cáustica al 15% con agua hirviendo; la esterilización del mismo por medio de irradiación (Charbonneau et al., 1992) y la selección de abejas con un alto comportamiento higiénico (Musen, 2000), entre otras.

El uso de antibiótico para el control de la enfermedad es controvertido debido a que los mismos solo actúan sobre la forma vegetativa de la bacteria y no sobre el esporo, lo cual trae aparejado un descenso en la signología clínica de dicha enfermedad (Alippi et al., 1992), pero no disminuye la masa infectante de esporas, además de que aumenta el riesgo de contaminación de la miel y contribuye a mantener una población de abejas poco resistentes. Actualmente se experimenta con aceites esenciales, los cuales no son tóxicos para las abejas ni dejan residuos en miel (Alippi et al., 2001).

Según Matheson (1992) es imprescindible para llevar adelante un programa de control, realizar un buen diagnóstico de la enfermedad. Dicho autor cita a Hornitzky y Karlovskis (1989), quienes encontraron que las abejas adultas y la miel de colmenas sin signología clínica podrían tener esporas de *Paenibacillus larvae* subs. *larvae*. Asimismo cita a Hansen y Rasmussen quienes en 1986 encontraron que colmenas con niveles de 3 millones de esporos por gramo de miel siguen siendo negativas a la signología clínica por 6 años.

Goodwin et al. (1993), aseguran que pese a que se revisen todas las colmenas y no se observen signos clínicos, no significa que no haya esporas. Hornitzky et al. (1991), en un ensayo, no encontraron cultivos negativos a partir de las muestras de miel de colonias que presentaban signos de LA.

Kabay (1995) encontró que el 66% de los apiarios positivos al aislamiento tuvieron signos clínicos de la enfermedad. Del Hoyo et al. (1993) encontraron que el 71% de 266 muestras (cuadros de cría) provenientes de colmenas con signología clínica fueron positivas a *Paenibacillus larvae* subs. *larvae* por medio de la técnica de la gota pendiente.

Debido a estos antecedentes se realizó el presente trabajo cuyo objetivo fue determinar la prevalencia de esporos viables de *Paenibacillus larvae* subs. *larvae* en miel de apiarios del partido de Tandil por medio del uso de una técnica microbiológica y el diagnóstico clínico de dicha enfermedad.

Materiales y Métodos

Los productores fueron previamente clasificados, según el número de colmenas que presentaban, en 7 estratos: menos de 50 colmenas, entre 51 y 100, entre 101 y 200, entre 201 y 400, entre 401 y 600, entre 601 y 1000 y más de 1000.

Durante el año 2003 se seleccionaron 42 apiarios del partido de Tandil, lo que representa un 14% del total de apiarios relevados durante un trabajo previo en 1997 (Mariani et al., 1998) dividiéndose la muestra en forma proporcional al número de colmenas por productor.

De cada uno de los apiarios en cuestión se seleccionaron 6 colmenas en forma sistemática, las cuales fueron revisadas para la detección de signos clínicos de Loque Americana y a cada una se les tomó muestras de miel de cámara de cría. Con la miel de las 6 colmenas de cada apiario se hizo un pool colocando el mismo en potes de plástico estériles y rotulados. En el laboratorio fueron procesadas y analizadas las muestras por la técnica descrita por Alippi (1995) para la detección de esporos viables de *Paenibacillus larvae* subs. *larvae*. Se sembraron por triplicado en medio agar MYPGP en microaerofilia con el agregado de ácido nalidíxico. Las lecturas se realizaron los días 4^{to}, 7^{mo} y 14^{to} clasificando las muestras como positivas y negativas a dicho aislamiento. Se consideraron positivas, aquellos aislamientos que presentaron al menos una UFC.

Otras variables tenidas en cuenta para el análisis de la información fueron: el número de colmenas y apiarios de los productores muestreados.

La información se procesó por medio del programa Epi Info 6.04.

Para comparar los promedios de número de apiarios y de colmenas de productores con y sin aislamiento de *Paenibacillus larvae* subs. *larvae*, se realizó un test "t".

Resultados

En 28 muestras del total de 42 analizadas se detectaron esporos viables de *Paenibacillus larvae* subs. *larvae*. (Figura 1).

La relación entre el número de colmenas y apiarios que tienen los productores muestreados con el aislamiento de *Paenibacillus larvae* subs. *larvae* se muestra en el Cuadro 1.

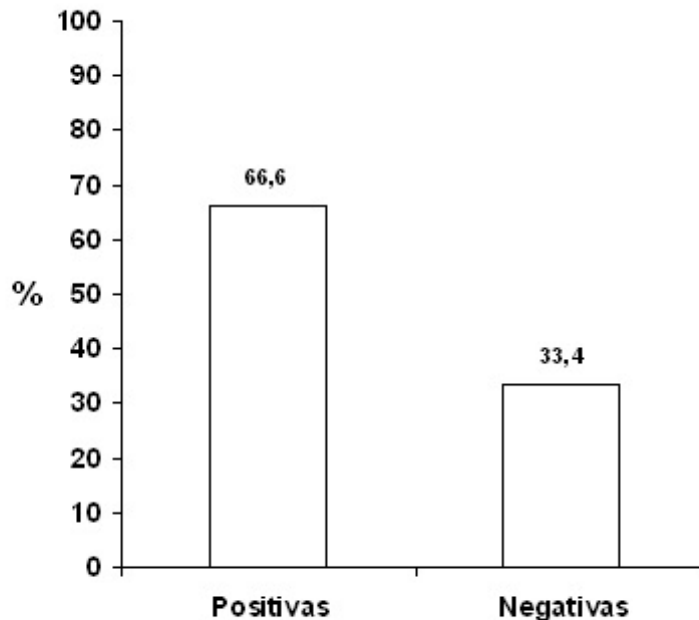
No se evidencian diferencias significativas respecto del número promedio de apia-

rios de los productores, entre los que presentan aislamiento positivo a *Paenibacillus larvae* subs. *larvae* de los que presentan aislamiento negativo ($p > 0,05$). Lo mismo ocurrió al comparar el número promedio de colmenas que tienen los productores con aislamiento positivo y negativo ($p > 0,05$).

En el Cuadro 2 se comparan el diagnóstico de laboratorio con el clínico.

El 46% de los apiarios sin signología clínica dieron positivos a la detección de esporos viables de *Paenibacillus larvae* subs. *larvae*, mientras que el 100% de los que tenían signos clínicos fueron positivos a la técnica de laboratorio.

De todas las muestras positivas al aislamiento, el 64,28% (18 de 28) tenían signología clínica, mientras que el 35,72% (10 de 28) no tenían signos clínicos.



Figur
Amer:

.oque

Figure 1: Result of the analysis of honey samples for the microbiological diagnostic of American Foulbrood (in %). Tandil. 2003.

Cuadro 1: Promedio (mínimo y máximo) de colmenas y apiarios por productor positivos y negativos al aislamiento de *Paenibacillus larvae* subs. *larvae*. Tandil 2003.

Table 1: Average (minimum and maximum values) of hives and apiaries for positive and negative beekeeper to the isolation of *Paenibacillus larvae* subs. *larvae*. Tandil. 2003

Tipo de información \ Aislamiento	Positivo	Negativo
Número de colmenas por productor	69,5 (14-1700)a	125 (20-631)a
Número de apiarios por productor	2 (1-12)a	3 (1-6)a

Letras iguales, no se evidencian diferencias significativas, $p > 0,05$, por filas

Cuadro 2: Frecuencia (porcentaje) de diagnósticos de laboratorio y clínico para Loque Americana. Tandil. 2003.

Table 2: Frequency (percentage) of laboratory and clinical diagnoses for American Foulbrood. Tandil. 2003.

Diagnóstico \ Diagnóstico clínico	Apiarios con signos clínicos	Apiarios sin signos clínicos	Totales
Diagnóstico Microbiológico			
Muestras positivas	18 (100)	10 (46)	28
Muestras negativas	0 (0)	14 (54)	14
Total	18	24	42

Discusión

El agente causal de la Loque Americana está ampliamente distribuido en los apiarios del partido de Tandil (66,6%).

El número promedio de apiarios y colmenas por productor no influye significativamente ($p > 0,05$) en el aislamiento de *paenibacillus larvae* subs *larvae*, lo que indica que el tamaño del productor no está asociado al aislamiento del agente causal, como si podrían estarlo otros parámetros tecnológicos como por ejemplo genética, manejo, etc.

Es importante destacar que el 46% de los apiarios que no tenían signología clínica dieron positivos a la detección de esporos viables de *Paenibacillus larvae* subs. *larvae*, mientras que el 100% (18) de los que tenían signos clínicos fueron todos positivos a la técnica de laboratorio. El método microbiológico detecta colmenas con presencia del

agente pero que, por algún motivo, no desarrollan la enfermedad.

El 64,28% de apiarios positivos al aislamiento tuvieron signos clínicos de la enfermedad, lo que coincide con el trabajo realizado por Kabay (1995).

Conclusiones

El alto porcentaje de aislamientos positivos muestra que el agente causal de la Loque Americana está ampliamente distribuido en los apiarios de Tandil, lo que determina la necesidad de tomar medidas preventivas de manejo contra la enfermedad para evitar la aparición de los signos clínicos y la consecuente pérdida de colmenas.

La alta proporción de apiarios sin signología clínica pero con aislamiento del agente etiológico encontrada, podría deberse a

que muchos productores tratan de manera preventiva con antibióticos sus colmenas, enmascarando de esta forma la signología clínica. Otra posibilidad sería que la carga de esporas fuese lo suficientemente baja como para no producir signos clínicos.

El aislamiento puede ser una herramienta complementaria del diagnóstico clínico para cualquier programa de control de la enfermedad basado en medidas de manejo.

Bibliografía

- Alippi, A.M. y Albo, G.N. 1992. Riesgos derivados del uso inadecuado de oxitetraciclina en colmenas de *Apis mellifera*. *Industria Apícola*. 2. 12: 4-5.
- Alippi, A.M. 1995. Detection of *Bacillus* larvae spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium. *Microbiología SEM*. 11: 343-350.
- Alippi, A.M., Ringuélet, J.A., Henning, C.P. y Bandonio, A. 2001. Actividad antimicrobiana in vitro de algunos aceites esenciales y mezclas de esencias sobre *Paenibacillus* larvae subsp. larvae. *Vida Apícola* 106. 41-44.
- Charbonneau, R., Gosselin, P. and Thibault, C. 1992. Irradiation and American foulbrood. *American Bee Journal* 132.4. 249-251.
- Del Hoyo, M., Basualdo, M., Figini, E. y Carrasco, M. 1993. Incidencia de *Bacillus* larvae white en colonias de *Apis mellifera* L. An. IX Reunión y Asamblea Anual de la Asociación de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Ed. Sociedad Argentina Veterinaria. Tandil, Buenos Aires, Argentina. 37.
- Del Hoyo, M., Basualdo, M., Torres, J. and Bedascarrasbure, E. 1998a. Use of DHT-Equipment for disinfection of AFB-Contaminated beehive materials in Argentina. *American Bee Journal*. 138 (10) 738-740.
- Del Hoyo, M., Basualdo, M., Torres, J. and Bedascarrasbure, E. 1998b. A method to test the efficiency of a disinfecting process with hot paraffin for AFB control. *American Bee Journal*. 138 (10) 741-742.
- Del Hoyo, M., Basualdo, M., Lorenzo, A., Palacio, A., Bedascarrasbure, E. y Rodriguez, E.M. 1999. Efecto del cepillado de colmenas afectadas por Loque Americana sobre la carga de esporas de *Paenibacillus* larvae. Encuentro de investigadores en temas relacionados a la apicultura Azul. pp 66-67
- EPI-INFO 6.04. 1996. Centers for Disease Control & Prevention (CDC) – World Health Organization (OMS) Geneva. Switzerland. Software.
- Goodwin, R.M., Perry, J.H. and Haine, H.M. 1993. American foulbrood disease. Part II: Subclinical infections. *The New Zealand beekeeper*. Winter. 7-9.
- Hornitzky, M.A. and Clark, S. 1991 Culture of *Bacillus* larvae from bulk honey samples for the detection of American Foulbrood. *Journal of Apicultural Research* 30 (1): 13-16.
- Kabay, M.J. 1995. Evaluation of the culture of honey to detect American foul brood. *Australian Veterinary Journal*. 72 (1): 33-35.
- Mariani, F., West, M. y Del Hoyo, M. 1998. Presentación del trabajo "Caracterización de la producción apícola del partido de Tandil", Anales XXII Congreso Argentino de Producción Animal. Río Cuarto, Córdoba.
- Matheson, A. 1992. Strategies for the Prevention and Control of American foulbrood. Part I. *American Bee Journal*. 132. 6. 399-402.
- Mussen, G.C. 2000 Antibiotic-resistant American foulbrood. *American Bee Journal*. 140(4): 300-301.
- PROAPI 1994. Workshop internacional sobre Loque Americana, 29-30 noviembre 1994, Tandil, Argentina. PROAPI, Fac. de Ciencias Vet., Fundación Argentina, Ministerio de la Producción de la Provincia de Buenos Aires.