

## LOQUE AMERICANA DE LAS ABEJAS MELÍFERAS (INFECCIÓN DE LAS ABEJAS MELÍFERAS POR *PAENIBACILLUS LARVAE*)

---

### RESUMEN

**Descripción de la enfermedad:** La loque americana (LA) afecta a la larva de la abeja de miel *Apis mellifera* y de otras sub-especies de *Apis* en todo el mundo. El microorganismo causante de esta enfermedad, *Paenibacillus larvae*, 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 pueden sobrevivir durante muchos años en escamas (procedentes de crías enfermas muertas), y productos y equipos para colmenas. Solo las esporas son capaces de inducir la enfermedad.

Los panales de las colonias infectadas tienen un aspecto moteado debido a una mezcla de crías operculadas sanas, celdas no operculadas que contienen restos de larvas enfermas y celdas vacías. Esto no es solo característico de la LA. 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 un aspecto viscoso cuando se extraen. En algunos casos, los restos de larvas son más bien acuosos. La cría enferma termina secándose y forma unas escamas frágiles características, que se adhieren fuertemente a la parte baja de las paredes 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. Los signos clínicos de la LA son muy variados y dependen del genotipo involucrado, la fase de la enfermedad y la fuerza de la colonia de abejas (y posiblemente su resistencia a la LA). Todos los genotipos ERIC I-IV son patógenos para las abejas melíferas.

**Identificación del agente:** El diagnóstico de la LA se basa en la identificación del agente patógeno y en la presencia de signos clínicos. El análisis puede basarse en una amplia gama de muestras. Sin embargo, en la práctica, la elección de las muestras dependerá de si aquél está relacionado con una colonia o un colmenar sospechoso o enfermo, o se trata de un análisis que es parte de un programa de seguimiento o prevención de la LA. Algunos métodos de identificación requieren una fase previa de cultivo, mientras que otros pueden aplicarse directamente a las muestras recogidas. Se recomiendan cinco medios de cultivo sólidos: PLA (agar *Paenibacillus larvae*), agar MYPGP, agar BHIT, agar J y agar Columbia sangre de oveja. En este capítulo se describen dos protocolos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que pueden utilizarse para una confirmación rápida de la LA clínica y para identificar las colonias bacterianas después de una fase de cultivo. El perfil bioquímico de *P. larvae* se establece mediante la prueba de la catalasa, la producción de ácido a partir de carbohidratos y la hidrólisis de la caseína, en función del genotipo involucrado. Además, se describen las técnicas basadas en anticuerpos y la identificación microscópica del agente patógeno.

**Pruebas serológicas:** No se dispone de pruebas serológicas.

**Requisitos para las vacunas:** No se dispone de vacunas.

### A. INTRODUCCIÓN

La Loque americana (LA) es una enfermedad infecciosa que afecta a la larva de la abeja de miel *Apis mellifera* y de otras especies de *Apis*, y se da en todas las zonas del mundo donde se crían tales abejas. El microorganismo

causante, *Paenibacillus larvae*, es una bacteria grampositiva 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, de tamaño muy variable (0,5-0,8 µm de ancho por 1,5 a 6 µm de largo), y se presenta solo, en cadenas y en filamentos; la mayoría de cepas son móviles. Con frecuencia, los esporangios son escasos *in vitro*, y es frecuente que las esporas elipsoidales, centrales o sub-terminales, que pueden deformar el esporangio se encuentren libres y que midan 0,6 × 1,3 µm (Heyndrickx *et al.*, 1996).

Empleando PCR de elemento repetitivo (rep-PCR) y los cebadores ERIC1R-ERIC2, se han diferenciado cuatro genotipos distintos (ERIC I, II, III and IV) (Genersch *et al.*, 2006). Los genotipos ERIC I y II corresponden a las antiguas subespecies *P. l. larvae*, mientras que los genotipos ERIC III y IV corresponden a las antiguas subespecies *P. l. pulvificiens* (Genersch, 2010). Los cuatro genotipos difieren en cuanto a morfología de la colonia y de las esporas, a su metabolismo de las fuentes de carbono y, lo que es más importante, en cuanto a virulencia. En bioensayos de exposición se ha observado que los miembros de ERIC II, III y IV son muy virulentos contra las larvas en cuanto al tiempo que transcurre hasta causar la muerte. Todas las larvas infectadas por estos genotipos mueren en un plazo máximo de unos 7 días (Genersch *et al.*, 2005, 2006). Esto significa que solo una pequeña parte de las larvas muere tras la operculación de la celda, lo cual da lugar a los signos clínicos descritos de AFB (fase pegajosa, escama de loque). Por el contrario, el genotipo ERIC I precisó alrededor de 12 días para matar todas las larvas infectadas y, por lo tanto, se considera menos virulento que ERIC II, III y IV a nivel de larva individual (Genersch *et al.*, 2005, 2006; Genersch, 2010; Djukic *et al.*, 2014). En estudios epidemiológicos se ha observado que solo ERIC I y ERIC II se aíslan con frecuencia de colonias obtenidas a partir de la LA. El genotipo ERIC I de *Paenibacillus larvae* es el genotipo más frecuente, mientras que el genotipo ERIC II parece más limitado, aunque ambos se han hallado en todo el mundo. Los genotipos ERIC III y IV no se han identificado en condiciones de campo durante décadas, pero existen unas pocas cepas en colecciones de cultivo (Genersch, 2010; De Graaf *et al.*, 2013). Dado que los perfiles de huella genética obtenidos mediante electroforesis del ADN amplificado por rep-PCR no son reproducibles entre laboratorios, es necesario incluir cepas de *P. larvae* de referencia previamente tipificadas. Para potenciar la discriminación entre cepas, el análisis con cebadores ERIC puede complementarse con el uso de otros cebadores (De Graaf *et al.*, 2013). Un esquema de tipificación de la secuencia multilocus reveló la distribución y biogeografía de 294 muestras de *P. larvae* en seis continentes (Morrissey *et al.*, 2015).

Las esporas son extremadamente termoestables y resistentes a las sustancias químicas. Solo las esporas son capaces de inducir la infección. La infección puede ser transmitida a las larvas por parte de obreras nodrizas o por esporas que queden en la base de una celda de cría. 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 (Woodrow, 1941); las larvas no pueden ser infectadas una vez transcurridas 53 horas desde la eclosión del huevo. La dosis infectiva 50 (LD<sub>50</sub>= dosis de spora con la cual mueren un 50% de las larvas) necesaria para el inicio de la infección, aunque muy variable, es 8,49 ± 1,49 esporas para las larvas que tienen entre 24 y 48 horas de vida (Hansen y Brødsgaard, 1999). La forma más común de propagación de la enfermedad de una colonia a otra es el intercambio de panales con restos de crías enfermas. Además, la enfermedad también puede propagarse por el robo de miel cargada de esporas, la alimentación con esta miel o el polen de abeja, los cúmulos de abejas y por la introducción de reinas procedentes de colonias infectadas. La cera contaminada con esporas de *P. larvae*, que se usan para la producción de la base de los panales, también puede contribuir a la propagación de la enfermedad si no se aplica el tratamiento adecuado. La pronta detección de la LA puede ayudar a impedir que la enfermedad se siga propagando.

Aunque en general existe un riesgo bajo de infección humana por microorganismos de la LA, es importante recordar que se ha observado septicemia bacteriana letal en personal que, durante la administración de fármacos, se han inyectado miel contaminada por esporas de *P. larvae* (Rieg *et al.*, 2010). Las medidas de biocontención deberán determinarse en función de un análisis del riesgo, como se describe en el Capítulo 1.1.4. *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales.*

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

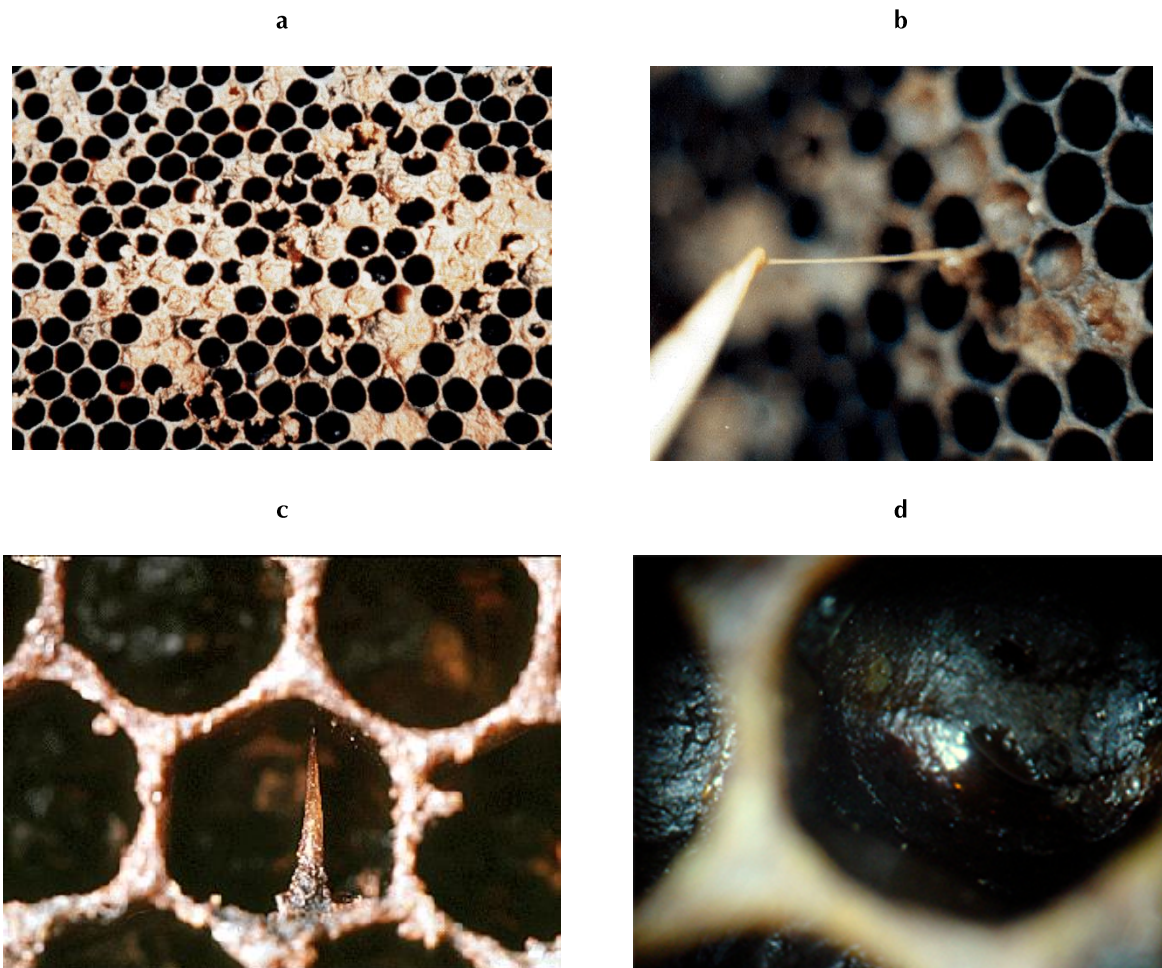
### 1. Epizootiología y sintomatología

Las esporas de *P. larvae* pueden sobrevivir en los productos de la abeja (miel, cera, escamas secas de larvas) en el medio ambiente entre 3 y 10 años, y en las escamas secas de larvas durante 35 años (Haseman, 1961). Las esporas purificadas pueden sobrevivir incluso más de 70 años (Rudenko, 1987).

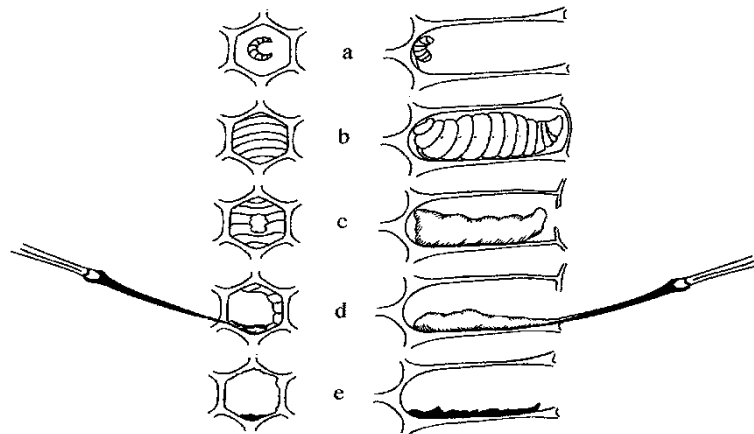
Los signos clínicos de la LA son muy diversos y dependen del genotipo implicado, la fase de la enfermedad y la fuerza de la colonia de abejas (y, posiblemente, de su resistencia a la LA) (Genersch *et al.*, 2005). Las larvas pueden morir a temprana edad cuando tienen forma de C en la base de las celdas de cría no operculadas. Las

obreras adultas retirarán esas larvas muertas dejando las celdas vacías (Brødsgaard *et al.*, 2000). Otras larvas perecerán en una fase más tardía de desarrollo, cuando están en posición erguida, ocupando casi toda la celda de cría. Con frecuencia, las larvas o pupas morirán tras la operculación de las celdas de cría.

En las colonias gravemente infectadas, los panales tienen un aspecto moteado a causa de un patrón de crías sanas operculadas, celdas no operculadas que contienen los restos de larvas enfermas y celdas vacías. La operculación de la celda que contiene una larva enferma aparece húmeda y oscura y se vuelve cóncava y perforada a medida que se desarrolla la infección (Figura 1a). Además, la larva o pupa cambia de color, primero a beige y, finalmente, 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 (prueba del palillo de cerilla) (Figura 1b). Esta es probablemente la técnica más conocida para el diagnóstico de campo de la enfermedad, pero en algunos casos, los restos de larva son más bien acuosos, lo que provoca un resultado negativo del palillo de cerilla. Finalmente, después de un mes o más, los restos de las crías enfermas se secan formando las típicas escamas oscuras y duras que son quebradizas y se adhieren fuertemente a la parte baja de las paredes de la celda (Figura 2). Si la muerte tiene lugar durante el estado pupal, la lengua de la pupa sobresale de la cabeza, extendiéndose hasta lo alto de la celda de cría e incluso angulando hacia atrás en dirección al suelo de la celda. Esta lengua protuberante es uno de los signos más característicos de la enfermedad, aunque raramente se puede observar (Figura 1c). La lengua puede persistir también en la escama seca. La loque europea debe tenerse en cuenta en el diagnóstico diferencial.



**Fig. 1.** Loque americana clínica (a–d): (a) Los panales tienen aspecto moteado. (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 infrecuente verla. (d) Escama residual adherida al fondo de la celda. Las fotografías a, b y d son de A. M. Alippi; La fotografía (c) es del MAAREC-Mid Atlantic Apiculture and Extension Consortium (at [https://agdev.anr.udel.edu/maarec/honey-bee-biology/honey-bee-parasites-pests-predators-and-diseases/diseases-of-honey-bees/nggallery/show-photocrati-nextgen\\_basic\\_thumbnails/page/1/](https://agdev.anr.udel.edu/maarec/honey-bee-biology/honey-bee-parasites-pests-predators-and-diseases/diseases-of-honey-bees/nggallery/show-photocrati-nextgen_basic_thumbnails/page/1/))



**Fig. 2.** Progresión de la enfermedad:(a) Punto de la infección. (b) Desarrollo larvario hasta la fase de pre-pupal. (c) El contenido de la celda y la operculación son atraídos hacia el interior o perforados. (d) El contenido de la celda se vuelve glutinoso. (e) Escama residual firmemente adherida a la parte baja de la celda.

Recientemente, se ha observado que cada genotipo tiene una virulencia distinta; las cepas ERIC I comportan un 100% de mortalidad de las larvas infectadas en 12 días, mientras que las cepas ERIC II matan las larvas infectadas en unos 7 días (Djucik *et al.*, 2014; Genersch, 2010; Genersch *et al.*, 2005). Cuanto más rápido mate *P. larvae* las larvas infectadas, más larvas infectadas se eliminarán, ya que las abejas nodrizas parecen reconocer las larvas muertas con menos rapidez tras la operculación de las celdas (Rauch *et al.*, 2009). Por lo tanto, la proporción de larvas que desarrollan una masa pegajosa bajo las operculaciones de las celdas es mayor en el caso de infecciones por cepas del genotipo ERIC I. Dado que veterinarios y apicultores buscan una masa pegajosa dentro de las celdas operculadas como principal signo de enfermedad, es probable que se dejen de diagnosticar los casos en los que las colonias con LA estén infectados por cepas del genotipo ERIC II, ya que es posible que haya apenas unas pocas celdas infectadas (Rauch *et al.*, 2009).

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

**Tabla 1.** Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la loque americana de las abejas melíferas y sus propósitos

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de circulación del virus en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
<b>Identificación del agente<sup>1</sup></b>						
<b>Aislamiento bacteriano</b>	+++	+++	+++	+++	+++	n/a
<b>Microscopía</b>	++	++	++	+++	+++	n/a
<b>Detección del antígeno</b>	++	++	++	++	++	n/a
<b>PCR convencional</b>	+++	+++	+++	+++	+++	n/a

1 Se recomienda utilizar una combinación de métodos de identificación del agente en la misma muestral clínica.

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de circulación del virus en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
PCR en tiempo real	+++	+++	+++	+++	+++	n/a
Espectrometría de masas	n/a	n/a	n/a	++	n/a	n/a

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método idóneo; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito; n/a = no apropiado para este propósito; n/a = no aplicable.

PCR = reacción en cadena de la polimerasa.

## 1. Identificación del agente

El diagnóstico de la LA se basa en la identificación del agente patógeno y la presencia de signos clínicos. El analista puede basarse en una amplia gama de muestras. No obstante, en la práctica, la elección de las muestras se realizará en función de si las mismas están relacionadas con una colonia/colmenar de abejas melíferas sospechosas o enfermas, o si se examinan como parte de un programa de seguimiento o prevención de la LA. En el apartado A de este capítulo se ofrece un examen inicial de la sintomatología de la enfermedad. Las técnicas de identificación son la caracterización microbiológica, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el establecimiento del perfil bioquímico, las técnicas basadas en anticuerpos y la microscopía. El analista debe tener en cuenta las diferencias de sensibilidad de los distintos enfoques aquí presentados y debe elegir el más adecuado para cada situación concreta.

### 1.1. La selección de muestras

#### 1.1.1. Recogida de muestras de una colonia/colmenar sospechoso o enfermo

Los apicultores encuentran con frecuencia panales de cría con signos de la enfermedad cuando atienden a sus colmenas. Siempre que sea posible, debe enviarse un marco entero al laboratorio, para evitar el riesgo de deformación durante el transporte. Como alternativa, las crías se muestrean cortando un trozo de panal de un tamaño de unos 20 cm<sup>2</sup>, que contenga la mayor cantidad posible de crías muertas o que presenten cambio de color. Una persona experimentada puede recoger restos de larva o de pupa infectados directamente de las celdas con un hisopo estéril, en cuyo caso el tamaño de la muestra puede ser más reducido, facilitándose así el embalaje y el transporte de la muestra al laboratorio (véase más adelante). Cuando se utiliza el examen microscópico, pueden realizarse frotis de restos de larvas enfermas en el colmenar (Hornitzky & Wilson, 1989). Tras secarse al aire, los frotis se embalan para poder enviarlos a laboratorio con el fin de que se realice un examen microscópico y un cultivo.

Se deben considerar como sospechosas todas las colonias ubicadas en las proximidades de un caso sospechoso de padecer la LA y debe tomarse una amplia variedad de muestras para la confirmación. Para detectar la presencia de esporas de *P. larvae*, pueden utilizarse, además de las muestras de crías, reservas de alimento (miel [Ritter y Kiefer, 1995; von der Ohe y Dustmann, 1997], polen [Gochnauer y Corner, 1987] y jalea real), obreras adultas (Lindström y Fries, 2005) y restos de cera (Bzdil, 2007; Titera y Haklova, 2003). Las muestras de miel pueden recogerse de las celdas próximas a las crías con cucharas desechables distintas para prevenir la contaminación cruzada de las muestras; no obstante, en el momento del muestreo, puede que la miel haya estado depositada en el panal durante meses. Las abejas adultas pueden recogerse sacudiendo o cepillando los panales de la cámara de cría o de las alzas melarias para que caigan en un saco o recipiente de plástico. Para obtener unos resultados los más fiables posible de la situación actual, deben analizarse abejas del nido de las crías (y no de las alzas melarias). Los restos de cera pueden recogerse del fondo de la colmena durante todo el año.

### 1.1.2. Muestras para los programas de seguimiento o prevención de la LA

Para evitar la propagación de crías enfermas, se pueden utilizar muestras de miel, de abejas adultas y restos para detectar la LA en colonias en las que no se observen signos clínicos. La toma rutinaria de muestras de colonias o de la miel recogida puede utilizarse como parte de un programa operativo o regional de detección de la LA.

El examen microscópico de frotis de larvas asintomáticas es mucho menos sensible para la detección de esporas en las colonias en comparación con los métodos bacteriológicos o basados en la PCR. De hecho, con estos últimos a menudo se detectan esporas en colonias que nunca desarrollan signos clínicos de LA. Sin embargo, grandes cantidades de esporas cultivadas a partir de muestras de miel y de abeja mediante métodos bacteriológicos pueden a menudo predecir la presencia de signos clínicos de LA a nivel de colonia, de colmenar y operativo.

### 1.2. Embalaje y envío de muestras al laboratorio

Se debe envolver el panal de cría en una bolsa de papel, una toalla de papel o un periódico, y colocarse en una caja de madera o cartón duro para el transporte; es necesario evitar los envoltorios de plástico, para prevenir el crecimiento fúngico. Los hisopos que contienen restos de larvas pueden introducirse en tubos de ensayo adecuados con tapón. Los frotis de larvas muertas sobre portas de microscopio colocan en cajas para portaobjetos, que pueden comprarse. Para el transporte, las abejas adultas pueden congelarse o sumergirse en recipientes bien cerrados con etanol al 70%, aunque también son adecuadas las abejas secas; cada muestra debe contener al menos 30 abejas. Las provisiones alimenticias se pueden introducir en un tubo de ensayo o en un tarro adecuado, o envolverse en una bolsa de plástico junto con la cuchara. Debe evitarse la fuga o la contaminación cruzada de las muestras. A ser posible, las muestras frescas deben enviarse al laboratorio refrigeradas.

Los detritus y la cera de las colmenas deben embalarse en una bolsa de papel, un bote de plástico tapado con una tapa de papel o en tubos de papel tapados con una tapa de plástico. El embalaje secundario consiste en una bolsa de plástico a modo de protección frente a la contaminación cruzada. En el caso de las muestras a granel, se pueden conservar incluso en un embalaje terciario (cajas de cartón grandes) que proteja frente a los posibles daños mecánicos.

La cantidad mínima de miel para poder detectar esporas viables de *P. larvae* es de 50 g y debe introducirse en un recipiente de plástico hermético (un recipiente por muestra, con etiqueta identificativa).

### 1.3. Cultivo

#### 1.3.1. Preparación de la muestra

##### i) Muestras para el cultivo

En general, debe prepararse una solución acuosa que contenga esporas de *P. larvae* para un examen adicional. Esa suspensión de esporas se calienta a 80°C durante 10 minutos o a 95–96°C durante 3–5 minutos a fin de matar las formas vegetativas u otros microorganismos, incluidos otros formadores de esporas. Cada genotipo de *P. larvae* presenta una capacidad de germinación diferente y una respuesta distinta al tratamiento térmico (Forsgren *et al.*, 2008). Es posible la siembra en placa directa de restos de larvas para el cultivo en agar sin tratamiento térmico.

Los restos de larva o de pupa del panal de cría se recogen con un hisopo estéril y se suspenden en 5–10 ml de agua esterilizada o de solución fisiológica (solución salina tamponada con fosfato [PBS] 0,01 M o NaCl al 0,9%) en un tubo de ensayo. En el caso de los restos de larvas o pupas enviados sobre portaobjetos, se añaden 2–3 gotas de agua estéril. Se emulsionan con un palo naranja o asa estéril. Se deposita la cantidad correspondiente a un asa llena de material emulsionado en una placa de agar adecuada y se realiza una siembra en estría con un asa estéril para obtener colonias aisladas. Las placas se incuban en un 5–7% de CO<sub>2</sub> y se examinan a diario durante un máximo de siete días. Pueden observarse colonias a partir del día 2 en adelante.

Cada muestra de suspensión de esporas debe dividirse y tratarse por triplicado:

- a) sin tratamiento térmico;
  - b) con tratamiento térmico a 80°C durante 10 minutos;
- y
- c) con tratamiento térmico a 95°C durante 3 minutos.

Los pasos ii) y iii) sirven para matar las formas vegetativas de otros microorganismos. El tratamiento térmico reducirá considerablemente el riesgo de que las colonias de *P. larvae* queden enmascaradas por estos competidores. Sin embargo, es posible que sigan acumulándose bacterias de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Brevibacillus* en las placas, lo cual exige el uso de medios semi-selectivos mediante la adición de los antibióticos ácido nalidíxico (Hornitzky y Clark, 1991) y ácido pipemídico (Alippi, 1992; 1995). En el paso i) (sin tratamiento térmico), además de ambos antibióticos, debe utilizarse anfotericina B a una concentración final de 16,8 µg/ml de medio de cultivo, para evitar la contaminación fúngica en las placas de aislamiento. Las placas se incuban a 37 + 1°C durante 4 días.

En el caso de los frotis preparados a partir de larvas muertas, se añaden 1–2 gotas de agua estéril y se mezclan sobre el portaobjetos. Se utiliza un asa de alambre para preparar un nuevo frotis para la tinción de Gram y el examen microscópico en el que se comprobará si hay esporas. Se emplea un segundo asa de material reconstituido para cultivar en una placa de agar adecuado.

Para examinar las esporas de las muestras de miel, estas se calientan a 45–50°C y se agitan para distribuir las esporas que pueda haber, y a continuación cada muestra de miel debe diluirse (1/1) en PBS 0,01 M a pH 7,2 o en NaCl al 0,9%, transferirse a un tubo de centrifuga y centrifugarse a 6 000 *g* durante 40 minutos. El sobrenadante se desecha dejando unos 3 ml por tubo, que a continuación se someten a vórtex y mezclan durante 1 minuto para volver a suspender el sedimento, y se tratan como se ha descrito para los restos larvarios. Las muestras se someten de nuevo al vórtex y mezclan a alta velocidad una vez más durante 2 minutos y se vierten 100–200 µl de la mezcla sedimento-líquido a medios de cultivo apropiados añadiendo antibióticos e incubándolas a 37°C durante 7–8 días (de Graaf *et al.*, 2013).

Se utiliza ampliamente la siembra en placa de la miel diluida (Ritter y Kiefer, 1995), pero su sensibilidad es inferior a la que se consigue mediante la centrifugación, ya que solo se siembra una pequeña fracción del volumen total. Sea cual sea el método elegido, 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.

Puede realizarse un filtrado acuoso de polen esparciendo concienzudamente 1 g de polen en un volumen final de 10 ml de agua esterilizada o PBS sódica 0,01 M a pH 7,2 y filtrándolo con papel N° 1 de Whatman (Gochnauer y Corner, 1987).

Cuando el envío de las abejas adultas se realiza colocándolas en etanol, este debe ser decantado y sustituido por agua esterilizada o solución fisiológica antes de machacar la muestra.

Hornitzky y Karlovskis (1989) desarrollaron una técnica de cultivo que constituye un método rápido de detección de esporas de *P. larvae* en abejas adultas que pudieran actuar como fuente de LA en larvas jóvenes. De forma resumida, cada muestra de 30 abejas nodrizas se homogeneiza en 20 ml de PBS estéril durante 30 segundos. El homogenado se filtra por un filtro de papel Whatman n°1, se centrifuga y el sedimento se vuelve a suspender en PBS. Las muestras se someten a shock térmico (véanse los tratamientos de la muestra de suspensión de esporas) y se vierten en placas de medio de cultivo suplementado con ácido nalidíxico y ácido pipemídico, lo cual servirá para evitar la propagación de *P. alvei* y de otras bacterias que pudieran crecer en las placas.

Se deben disolver los restos y la cera de las abejas (1.5 g) en un disolvente orgánico (10 ml), que puede ser tolueno (Titera y Haklova, 2003), cloroformo (Kostecki, 1969) o dietiléter (Ritter, 2003). Luego se diluye la parte líquida (2 ml) en solución fisiológica (6 ml). Tras agitarla con fuerza, esta suspensión puede sembrarse de forma inmediata (sin calentamiento) (Titera y Haklova, 2003). De acuerdo con otro protocolo, primero se diluye en agua la cera de las abejas (cera/agua 1/10) y se calienta hasta los 90°C durante 6 minutos. Tras enfriarlo, se añade el disolvente orgánico (disolvente orgánico en agua

1/9) y se agita con cuidado la mezcla. Transcurridos 2 minutos, se forma un depósito de solución acuosa con esporas de *P. larvae* (Ritter, 2003).

ii) Cultivo por el método del Tween 80 (Bzdil, 2007)

Se introduce 1 g de detritus o 1 g de cera en un tubo de ensayo con cierre hermético. Los trozos de cera más grandes deben cortarse con instrumental estéril en trozos muy pequeños (lo ideal es cortarlos hasta que midan 3 mm). Los trozos de cera de los detritus no tienen que cortarse más porque suelen ser muy pequeños. Cuanto más pequeños son los trozos, más fácil y rápido resulta el proceso de homogeneización. El material seco preparado de este modo debe removerse firmemente y diluirse con 8,5 ml de agua destilada estéril. A continuación, la suspensión resultante se suplementa con 0,5 ml de Tween 80. Unos 30 minutos antes del pipeteado, debe extraerse el volumen necesario de Tween 80 del recipiente de origen e introducirse en otro recipiente estéril con cierre hermético, que se sumergirá en un baño de agua caliente ( $70\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) para reducir la viscosidad del Tween 80 y facilitar su pipeteado. La suspensión de detritus, agua y Tween 80 se agita a fondo y el tubo de ensayo se introduce en un baño de agua caliente ( $70\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durante 30 minutos. Si la cera se disuelve lentamente o hay trozos de cera de más de 5 mm, el tubo de ensayo puede dejarse en el baño de agua incluso durante 1 hora. Mientras se calienta el tubo hermético en el baño de agua, debe agitarse bien en sentido longitudinal al menos tres veces (o mejor, en varios ciclos de 5–30 segundos dejando transcurrir 5–10 minutos entre uno y otro). Esta homogeneización tan minuciosa da lugar a la aparición de un material pulposo de color marrón grisáceo homogéneo, que puede endurecerse a medida que se enfría. A continuación, los tubos se retiran del baño de agua y se dejan enfriar hasta temperatura ambiente, en cuyo momento deben dejarse reposar durante 2–4 horas hasta que se forma una cantidad suficiente de líquido en el fondo de los tubos. Después, se extraen 2–5 ml de este líquido mediante una pipeta de balón desechable y se mezclan con el mismo volumen de agua destilada en otro tubo estéril hermético. De nuevo, la mezcla resultante debe agitarse bien en sentido longitudinal durante al menos 5 minutos e introducirse en un baño de agua caliente ( $90\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Pasados 10 minutos, se retiran del baño los tubos con poso, se dejan enfriar hasta que alcanzan la temperatura ambiente y se agitan de nuevo. A continuación, el material se inocula en dosis de 0,2 ml en 3–5 placas de MYPGP con ácido nalidíxico y a un mínimo de una placa de agar sangre que servirá como control. Antes del cultivo, las placas deben secarse en un termostato a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ . El tiempo de secado se determinará en función de la humedad de la superficie del medio de cultivo (unos 30 minutos). Las placas de Petri deberán identificarse minuciosamente con la misma identidad. El líquido se esparce por las placas con un asa de plástico/vidrio estéril curvada o la punta de la pipeta. El líquido se deja secar y las placas se incuban con la parte superior hacia abajo a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 5–8 días.

### 1.3.2. Soluciones primarias

i) Solución primaria de ácido nalidíxico (Hornitzky y Clark, 1991)

Se prepara disolviendo 0,1 g en 2 ml de NaOH 0,1 N y diluyéndolo hasta 100 ml con tampón fosfato 0,01 M (pH 7,2), (concentración primaria de 1000  $\mu\text{g/ml}$ ). Se lleva a cabo una filtración esterilizante. Concentración final: 10  $\mu\text{g/ml}$  para las muestras de larvas y 20  $\mu\text{g/ml}$  para las muestras de miel.

ii) Solución primaria de ácido pipemídico (Alippi, 1995)

Se prepara disolviendo 0,2 g en 2 ml de NaOH 0,1 N y diluyéndolo hasta 100 ml con tampón fosfato 0,01 M (pH 7,2), (concentración primaria de 2000  $\mu\text{g/ml}$ ). Se lleva a cabo una filtración esterilizante. Concentración final: 10  $\mu\text{g/ml}$  para las muestras de miel.

Tras esterilizar en autoclave y enfriar a  $50^{\circ}\text{C}$ , se añaden los antibióticos a los medios a la concentración final exigida y se vierte en placas de Petri estériles (20 ml por placa) (De Graaf *et al*, 2013).

### 1.3.3. Medios de cultivo

Se han descrito varios medios para el cultivo de *P. larvae*, pero los mejores resultados se obtuvieron con PLA (agar *Paenibacillus larvae*) (Schuch *et al.*, 2001), con agar MYPGP (la abreviatura inglesa se refiere a los constituyentes del agar: caldo Mueller-Hinton, extracto de levadura, fosfato potásico, glucosa y piruvato) (Dingmann y Stahly, 1983), con agar BHIT (medio con infusión cerebro-corazón suplementado con tiamina) (Gochnauer, 1973), agar J



(Gordon *et al.*, 1973) y CSA (agar Columbia sangre de oveja) (Hornitzky y Karlovskis, 1989). Las formulaciones de los medios son las siguientes.

i) Agar PLA (agar *Paenibacillus larvae*)

Este medio selectivo combina tres medios diferentes para conformar una base a la que se añaden antibiótico y yema de huevo como suplementos (Schuch *et al.*, 2001). Se combinan y mezclan cantidades iguales (100 ml) de agar base estéril, líquido y selectivo de *Bacillus cereus* derretido, agar tripticasa de soja y agar nutritivo con suplementos (SNA). El SNA se compone (por cada litro) de: 23 g de agar nutritivo, 6 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl, 2 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; el pH final es 7,4 ± 0,2. Se esterilizan todos los medios sólidos a 121°C/15 minutos. Una vez combinados los tres medios derretidos, se añaden 3 ml de ácido nalidíxico, 3 ml de ácido pipemídico reserva y 30 ml de suspensión de yema de huevo al 50% (Gordon *et al.*, 1973) para formar el medio PLA (concentración final de µg/ml de ácido pipemídico y 18 µg/ml de ácido nalidíxico). El medio PLA se vierte (20 ml) a placas de Petri estériles, que deberán secarse antes de ser utilizadas (45–60°C durante 15 minutos).

ii) Agar MYPGP (la abreviatura inglesa se refiere a los constituyentes del agar: caldo Mueller-Hinton, extracto de levadura, fosfato potásico, glucosa y piruvato)

El agar MYPGP se compone (por cada litro) de: 10 g de caldo Mueller-Hinton, 15 g de extracto de levadura, 3 gramos de K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g de glucosa, 1 g de piruvato de Na y 20 g de agar (pH 7,1) (Dingmann y Stahly, 1983). La adición de los ácidos nalidíxico y pipemídico se lleva a cabo de la forma indicada más arriba.

iii) Agar J

El agar J contiene (por litro): 5 g de triptona, 15 g de extracto de levadura, 3 g de K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g de glucosa, 20 g de agar (pH 7,3–7,5) (Gordon *et al.*, 1973). La adición de ácido nalidíxico y de ácido pipemídico se realiza como se ha descrito anteriormente.

iv) CSA (agar Columbia sangre de oveja)

El agar CSA contiene (por litro): 39 g de agar Columbia sangre de oveja (pH 7,3). Tras esterilizarlo al autoclave y enfriarlo hasta 50°C, se añade sangre desfibrinada estéril al 5% (Hornitzky y Karlovskis, 1989). La adición de ácido nalidíxico y de ácido pipemídico se realiza como se ha descrito anteriormente. El cultivo en medios inclinados CSA induce una esporulación y permite la detección microscópica de los haces flagelares.

v) Agar BHIT (medio con infusión cerebro-corazón suplementado con tiamina)

El agar BHIT contiene (por litro): 47 g de agar de infusión cerebro-corazón (ajustado a pH 6,6 con HCl). Tras esterilizarlo al autoclave y enfriarlo hasta 50°C, se añade una solución estéril de hidrocloreto de tiamina para obtener una concentración final de 1 mg por litro (Gochnauer, 1973).

El agar MYPGP se utiliza sistemáticamente para cultivar *P. larvae* con fines de diagnóstico de la LA y se obtiene el máximo porcentaje de recuperación de esporas, mientras que se ha observado los agar J, BHI y CSA que son menos eficientes en este sentido. El medio PLA también muestra una eficacia de cultivo superior e inhibe la mayor parte de microorganismos habitualmente presentes en la colmena y en los productos de las abejas (Schuch *et al.*, 2001).

Si el cultivo de *P. larvae* se viera obstaculizado por la aparición de hongos, una buena solución consiste en añadir 16,8 µg/ml de medio de anfotericina B.

Se transfiere una porción de la muestra a la superficie del medio sólido con un hisopo de algodón estéril. Para la evaluación cuantitativa, se recomienda extender un volumen fijo de suspensión en agar sólido con una espátula o una pipeta estériles en lugar de usar hisopos de algodón.

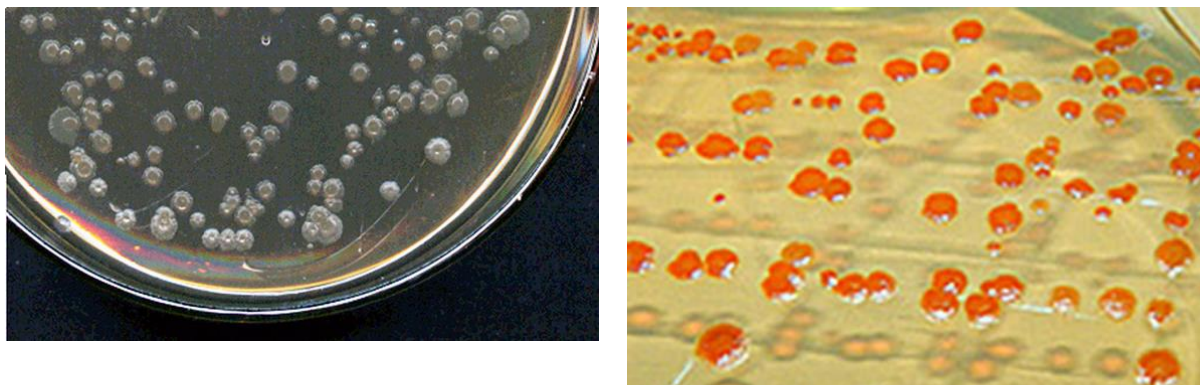
Lo mejor es incubar las placas a 37±1 °C durante 2–4 días en una atmósfera del 5–10% de CO<sub>2</sub>, aunque la incubación aeróbica también produce los mismos resultados. Las muestras de miel deberán incubarse durante más tiempo (al menos durante 6 días y hasta un máximo de 15 días) y evaluarse para comprobar si presentan colonias sospechosas a los 3 y a los 6 días.

#### 1.3.4. Identificación

i) Morfología de la colonia

Las muestras de larvas con enfermedad clínica darán lugar a placas con crecimiento confluyente después de 2–4 días, y seguirá una fase de subcultivo a fin de aislar las colonias.

En el medio de cultivo PLA, Las colonias de *P. larvae* son pequeñas, de verde claro a amarillo (= el mismo color que el medio) con una superficie ligeramente opaca y áspera, algunas veces con el centro elevado.

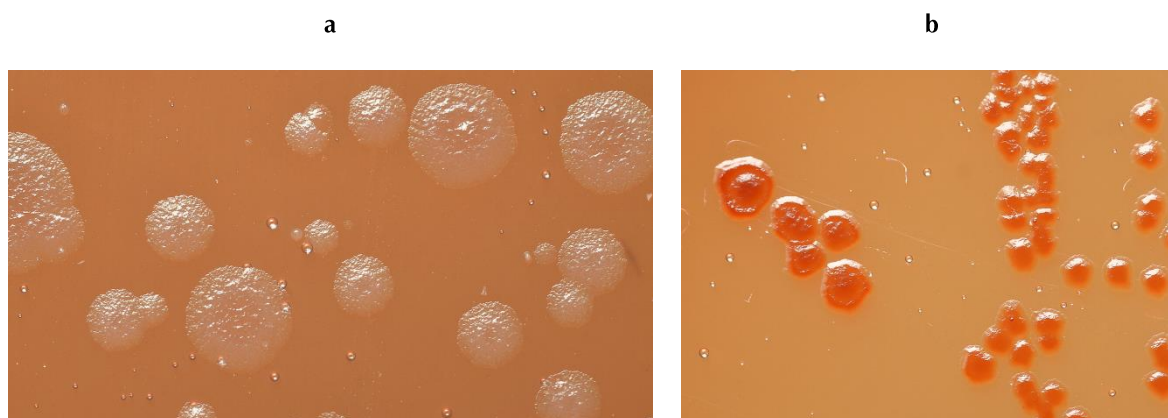


**Fig.3:** Aspecto de las colonias de *P. larvae* cultivadas en placas de agar MYPGP: (a) Cepa de referencia ATCC 9545<sup>T</sup> (ERIC I) y (b) Cepa PL SAG m290 (ERIC II). Fotografías: A.M. Alippi

En el MYPGP y el J-agar, las colonias son pequeñas, regulares, principalmente rugosas, planas o elevadas y de color entre blanquecino y beige (Figura 3a).

En el agar CSA, las colonias son pequeñas, regulares, rugosas, mantecosas y grisáceas, algo transparentes y de aspecto ligeramente brillante (Figura 4a).

Se han descrito colonias de *Paenibacillus larvae* de pigmentación entre naranja y roja, es decir, los genotipos ERIC II y III que producen colonias rojizas y/o naranja en los medios MYPGP, agar J y CSA (Tabla 2) (Figuras 3b, 3c y 4b) (Genersch *et al.*, 2005; 2006; Neuendorf *et al.*, 2004). Según Genersch *et al.* (2005; 2006), solo los genotipos ERIC II y III están pigmentados, pero existen cepas de ERIC IVs tanto pigmentadas como no pigmentadas (Dingman, 2015). Es importante destacar que los fenotipos pigmentados pueden perderse si se realizan excesivos subcultivos.



**Fig.4:** Morfología característica de una colonia de *P. larvae* cultivada en placas de agar Columbia sangre de oveja: (a) Cepa de referencia ATCC 9545<sup>T</sup> (ERIC I) y (b) Cepa PL SAG m290 (ERIC II). Fotografías: A.M. Alippi

Se ha aconsejado la utilización en paralelo de cepas de *P. larvae* de referencia, por ejemplo LMG 9820 (denominación alternativa: ATCC 9545, DSM 7030, NRRL B-2605, LMG 15969) para la variante no pigmentada y DSM 16115 o DSM 16116 para el genotipo pigmentado. (Graaf *et al.*, 2013 facilitan una lista completa de las cepas de referencia de *P. larvae*).

La morfología de la colonia no es concluyente, pero podría servir para escoger las colonias bacterianas para una posterior identificación.

ii) Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR se puede utilizar para identificar colonias bacterianas (=suspensiones de células/espores) tras un cultivo. El ADN se puede extraer del modo siguiente: se suspende una colonia en 50 µl de agua destilada y se calienta a 95°C durante 15 minutos. Tras la centrifugación a 5000 **g** durante 15 minutos, se utilizan 1-5 µl del sobrenadante como ADN molde en una mezcla de 50 µl para PCR (Dobbelaere *et al.*, 2001b). También pueden utilizarse kits comerciales de extracción del ADN, siguiendo las instrucciones del fabricante correspondientes a las bacterias grampositivas. Véase el apartado 1.5.2 abajo para consultar el método de la PCR.

**Tabla 2.** Características fenotípicas de los genotipos ERIC de *Paenibacillus larvae*. Todos los genotipos tienen esporas elipsoides y resultan patógenos en las abejas melíferas (datos basados en Genersch *et al.*, 2005)

Característica	ERIC I	ERIC II	ERIC III	ERIC IV
Colonias pigmentadas	–	+	+	Variable
Superficie de la spora (según se observa mediante SEM)	Lisa	Retorcida	Rugosa	Rugosa
Crecimiento en caldo nutritivo	–	+	+	+
Fermentación del manitol	–	+	+	+
Fermentación de la salicina	+	–	–	–
Fosfatasa alcalina	+	–	+	+
Fosfatasa ácida	+	–	+	+
Catalasa	–	–	Débilmente positiva, retardada	Débilmente positiva, retardada

v = variable.

iii) Espectrometría de masas

Con un palillo, se toma una colonia bacteriana y con ella se prepara un frotis en dos pocillos de la placa, que se dejan secar a temperatura ambiente antes de añadir 1 µl de matriz (ácido α-ciano-4-hidroxicinámico) a cada punto y antes de poner la placa en la máquina. La colonia bacteriana se transfiere a las placas correspondientes a modo de capa fina; tras secar a temperatura ambiente, se cubre con 1 µl de matriz MALDI (ácido cinamónico) y se deja secar de nuevo. A continuación, se lleva a cabo la medición mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. El dispositivo detecta espectros de masa específicos de péptidos ribosómicos bacterianos. Tras comprobar los espectros detectados en la base de datos de espectros conocidos, se identifica la cepa bacteriana (Schäfer *et al.*, 2014).

iv) Pruebas bioquímicas

*Paenibacillus larvae* también puede identificarse por su perfil bioquímico. Las bacterias son catalasa negativas o positivas débiles retardadas; tienen un perfil característico de fermentación por carbohidratos con producción de ácido procedente de glucosa y trehalosa, no de arabinosa y xilosa, y pueden hidrolizar la caseína o la leche. Los resultados de algunas pruebas varían en función del genotipo, como por ejemplo, la fermentación del manitol y la salicina (Tabla 2).

a) Prueba de la catalasa

Se coloca una gota de peróxido de hidrógeno al 3% en un medio sólido de cultivo en crecimiento activo. La mayor parte de las bacterias descomponen el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, produciendo una espuma efervescente, pero en esta reacción *P. larvae* es negativa o presenta una reacción débilmente positiva retardada, según el genotipo (Tabla 2) (Haynes, 1972). Los microorganismos pueden perder su actividad catalasa con la edad, lo cual da lugar a un falso negativo. Cuando se utiliza agar Colombia sangre de oveja para el cultivo, la prueba no puede realizarse sobre el medio sólido, porque la presencia de sangre de oveja

causaría un falso positivo. En este caso, las colonias deben transferirse a un portaobjetos limpio para la realización de la prueba. La correspondiente evaluación de la prueba se llevará a cabo a simple vista, como hemos visto más arriba.

b) Producción de ácidos a partir de carbohidratos (Gordon *et al.*, 1973)

Las bacterias se cultivan en caldo J (por cada litro: 15 g de extracto de levadura, 5 g de tripton y 3 g de  $K_2HPO_4$ ) en el que la glucosa se sustituye por un 0,5% del sustrato problema, previamente esterilizado en una solución acuosa. Los carbohidratos utilizados son L (+)-arabinosa, D (+)-glucosa, D (+)-xilosa y D (+)-trehalosa. Los cultivos se analizan a los 14 días tomando aseptícamente 1 ml o menos, que se observará en una platina de microscopio con depresión; se mezcla 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 (Alippi, 1992) y se obtienen resultados variables con el manitol y la salicina, en función de la cepa analizada (Genersch *et al.*, 2005; 2006) (Tabla 2).

Para la caracterización bioquímica de *P. larvae* también existen kits comerciales (Carpana *et al.*, 1995; Dobbelaere *et al.*, 2001a; Neuendorf *et al.*, 2004).

c) Hidrólisis de la caseína (Schuch *et al.*, 2001)

En la hidrólisis de la caseína se utiliza agar leche con tiamina (por cada litro: 20 g de agar, 10 g de extracto de levadura; se esteriliza a 121°C/15 minutos). A cada 70 ml de medio enfriado se añaden 30 ml de leche desnatada UHT (tratada por ultracalentamiento) y 1,5 ml de solución de tiamina al 0,1% esterilizada por filtración. Se siembran en estría las placas y se examinan tras 5 días de incubación a 36 ± 1°C. *Paenibacillus larvae* hidroliza la caseína, por lo que se observará clarificación del medio alrededor de la zona de crecimiento de la colonia bacteriana.

v) Técnicas basadas en anticuerpos

Se han desarrollado diferentes técnicas basadas en anticuerpos para el diagnóstico de la LA. La mayoría de ellas utilizan suero policlonal de conejo obtenido frente a cultivos puros de *P. larvae*. Pueden utilizarse para la identificación de colonias bacterianas aisladas o para el examen de restos larvales sospechosos.

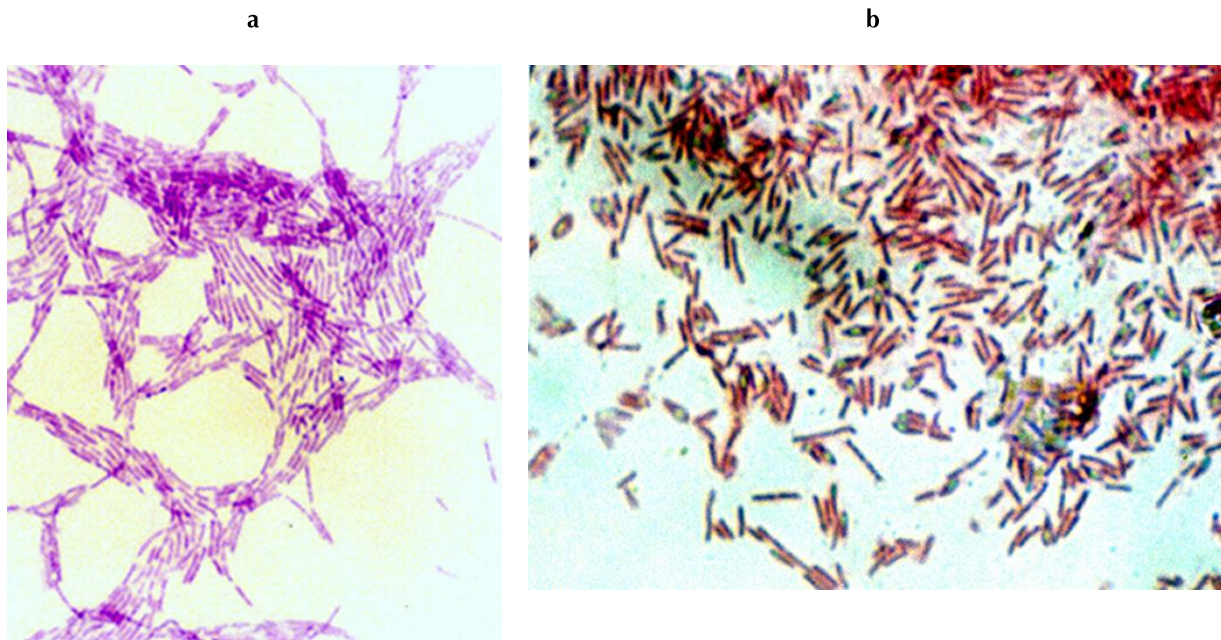
En una prueba de inmunodifusión, los anticuerpos interactúan con el antígeno bacteriano durante un proceso de difusión doble, dejando líneas de precipitación (Peng y Peng, 1979). En la técnica de anticuerpos fluorescentes, estos anticuerpos se conjugan con un fluorocromo. El anticuerpo fluorescente resultante reacciona con un frotis bacteriano sobre un porta. Se enjuaga el antisuero sobrante y se examina el frotis con un microscopio de fluorescencia. Puede reconocerse *Paenibacillus larvae* de forma específica porque se tiñe como una bacteria muy fluorescente sobre un fondo oscuro (Otte, 1973). Existe un enzimoimmunoanálisis en el que se utiliza un anticuerpo monoclonal específico para *P. larvae* (Olsen *et al.*, 1990). Se ha comercializado un instrumento de flujo lateral para la confirmación rápida de la LA.

vi) Microscopía

Por lo común, se utilizan dos técnicas microscópicas. La tinción de Gram se utiliza frecuentemente con frotis de bacterias procedentes de colonias bacterianas aisladas. *Paenibacillus larvae* es grampositiva (Figura 5). La tinción con carbol-fucsina se aplica a los frotis larvales y puede servir para confirmar la LA clínica basándose en la morfología de las esporas. Además, para poner de manifiesto la forma y posición de la spora y de posibles hinchazones del esporangio, se recomienda el método de Schaeffer y Fulton. A continuación se esbozan estas técnicas:

a) Tinción de Gram de bacterias

- i) Se sumerge (se cubre por completo) el portaobjetos entero en cristal violeta. Se deja reposar unos 60 segundos.
- ii) Transcurrido ese tiempo, se lava el portaobjetos con agua durante 5 segundos. Observándola a simple vista, la muestra debe tener un color azul-violeta.
- iii) Entonces se sumerge el portaobjetos en solución de yodo. Se deja que repose alrededor de 60 segundos.



**Fig. 5.** El examen microscópico de *Paenibacillus larvae*, el microorganismo causal de la Loque americana: a) la tinción de Gram pone de manifiesto bacilos grampositivos, que se disponen individualmente o formando cadenas (aumentos:  $\times 1000$ ); b) la tinción de esporas por el método de Schaeffer y Fulton pone de manifiesto que los esporangios (teñidos de rojo) están hinchados por las esporas (teñidas de verde), que se sitúan en una posición entre central y terminal (aumentos:  $\times 1000$ ). Fotografías: A.M. Alippi.

- iv) Se lava el portaobjetos con agua durante 5 segundos y se procede de inmediato. En ese momento, el frotis debería seguir de color azul-violeta.  
Nota: Este paso incluye la adición de un decolorante: etanol. Esta fase es en cierta manera subjetiva, porque si se usa demasiado decolorante puede obtenerse un falso Gram negativo. Por el contrario, si no se usa suficiente decolorante, puede obtenerse un falso Gram positivo.
- v) Para evitarlo, se van añadiendo gotas de etanol hasta que la muestra deje de emitir el color azul-violeta.
- vi) Como en los pasos anteriores, se lava el portaobjetos con agua durante 5 segundos.
- vii) El último paso consiste en añadir safranina como tinción de contraste. Se sumerge el portaobjetos en tintura y se espera un minuto para permitir que las bacterias asimilen la safranina.
- viii) Se lava con agua durante 5 segundos para retirar el sobrante de tintura. Se seca suavemente el portaobjetos con papel absorbente o se deja que se seque al aire antes de observarlo al microscopio.

#### Preparación para la tinción de Gram

##### i) Cristal violeta de Gram

Se disuelven 2 g de cristal violeta en 20 ml de etanol al 95%. Para su uso, se mezclan 20 ml de la solución primaria con 80 ml de oxalato de amonio al 1% en agua destilada. Se mezclan ambas y se filtran antes de ser utilizadas. Ambas soluciones son estables y se conservarán durante meses.

##### ii) Yodo de Gram

Se disuelve 1,0 g de yodo ( $I_2$ ) y 2,0 g de yoduro de potasio (KI) en 300 ml de agua destilada.

##### iii) Safranina de Gram

Se disuelven 0,25 g de safranina O en 100 ml de etanol al 95%. Para su uso, 10 ml de esta solución deben diluirse con 90 ml de agua destilada.

- b) Tinción de frotis larvales con carbol-fucsina (Hornitzky y Wilson, 1989)

Se secan los frotis con calor. Se sumergen los portaobjetos en carbol-fucsina de Ziehl-Neelsen durante 30 segundos. Se lava la tintura y se deja que se sequen al aire o se secan suavemente con papel absorbente. Se examinan al microscopio para ver si hay esporas de *P. larvae*, que miden en torno a 1,3 x 0,6 µm, son elipsoides y tienen un borde grueso. *Nota:* Si la infección aparece en larvas de menos de 10 días de vida, habrá bacilos vegetativos largos con flagelos fusionados. Estos haces flagelares son característicos del agente patógeno.

#### Preparación de carbol-fucsina para la tinción de Ziehl-Neelsen

- i) **Solución A**

Se disuelven 3 g de fucsina básica en 10 ml de etanol al 95%.

- ii) **Solución B**

Se disuelven 5 g de fenol en 95 ml de agua destilada.

- iii) **Tinción primaria**

Se mezcla la solución A con la B y se diluye a 1/10 antes de ser utilizada.

- c) Método de Schaeffer y Fulton para la tinción de endosporas (Schaeffer y Fulton, 1933)

Se prepara un frotis del microorganismo y se seca al aire; a continuación, se fija por calor pasándolo tres veces por la llama de un mechero Bunsen. Se sumergen los portas en verde malaquita acuoso al 5%, y se calientan al vapor 3–4 veces a lo largo de 1 minuto, y después se dejan enfriar. Se lavan para eliminar la tinción durante 30 segundos y se sumergen en safranina al 0,5% en agua destilada durante 30 segundos. Se elimina la tinción muy ligeramente, se secan dejándolos sobre un papel absorbente y se examinan al microscopio. Las esporas deberían teñirse de verde y las células vegetales, de rojo. Las esporas de *P. larvae* son elípticas, están situadas en una posición entre central y terminal, hinchan el esporangio y tienen los bordes engrosados, y miden alrededor de 0,6 x 1,3 µm.

#### Preparación de tinciones para el método de Schaeffer y Fulton

- i) **Verde de malaquita**

Se disuelven 5 g de cloruro de verde malaquita con 100 ml de agua destilada. Esta solución es muy estable.

- ii) **Safranina para la tinción de esporas**

Se disuelven 0,5 g de cloruro de safranina O con 100 ml de agua destilada. Esta solución es muy estable.

- d) Tinción negativa con nigrosina

Se toma una gota de la fase líquida del medio inclinado CSA, se mezcla sobre el porta con una solución de nigrosina al 5%, se seca al aire y a continuación se fija pasándola tres veces por la llama de un mechero Bunsen.

### 1.4. Reacción en cadena de la polimerasa

#### 1.4.1. Muestras para la PCR

Debe diferenciarse entre suspensiones de células/esporas y suspensiones que solo contienen esporas, porque estas últimas requieren un paso de extracción del ADN más complejo.

Para una confirmación rápida de la LA clínica, las muestras deben prepararse como sigue: los restos de dos larvas de abeja melífera enfermas (= suspensión de células/esporas) se emulsionan en 1 ml de agua destilada estéril y se mezclan bien. Se diluyen 100 µl de esta suspensión con 900 µl de agua destilada. Esta dilución se somete a vórtex y 100 µl se utilizan para extraer el ADN mediante calentamiento y centrifugación (véase arriba) (Dobbelaere *et al.*, 2001b). La extracción del ADN también puede realizarse mediante kits comerciales, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Todas las soluciones acuosas derivadas del muestreo de abejas adultas, detritus, cera de abejas, polen y jalea real deben considerarse como suspensiones de esporas. En este caso, la extracción del ADN exige otro enfoque. De hecho, las suspensiones de esporas se centrifugan a 6000 **g** y 4°C durante 30 minutos. A continuación, el sedimento se somete a tratamiento con microondas durante 5 minutos a potencia máxima para romper el recubrimiento de las esporas, y el ADN liberado se suspende en 30 µl de Tris/HCl 10 mM, pH 8,0, que contenga EDTA 1 mM (Piccini *et al.*, 2002).

Cuando se desea comprobar si la miel contiene esporas, se diluye el ADN de forma seriada con agua destilada estéril para eliminar la inhibición de la PCR provocada por la miel (Piccini *et al.*, 2002). Se ha descrito otro método de extracción del ADN, basado en un tratamiento con lisozima y proteinasa K (Bakonyi *et al.*, 2003).

También pueden obtenerse buenos resultados incubando una suspensión de esporas sedimentada en caldo MYPGP a 37°C durante 2–24 horas. A partir de ese momento, la suspensión se centrifuga a 14.500 **g** durante 5 minutos, se lava con agua destilada estéril y se vuelve a suspender en 200 µl de agua destilada estéril. Este paso de incubación corta hace que las esporas germinen, lo cual las hace de nuevo sensibles a la preparación del ADN mediante tratamiento térmico (véase arriba) (Lauro *et al.*, 2003).

Junto con las muestras problema, deben analizarse controles positivos y negativos.

#### 1.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa

Se han descrito varios protocolos de PCR para identificar *P. larvae* (revisado por de Graaf *et al.*, 2006 and De Graaf *et al.*, 2013), pero dos de ellos, basados en el gen del ARNr de la subunidad 16S, tienen una robustez demostrada, y se describen así:

Nota: si se utilizan mezclas comerciales para PCR, es posible que ya vengan incluidos los ingredientes necesarios. Deben consultarse y seguirse las instrucciones del fabricante.

Las PCR (modificado de Dobbelaere *et al.*, 2001b) se ajustan teniendo en cuenta que se utilizan mezclas de 50 µl que contienen:

- i) 1–5 µl de ADN molde (véase la preparación de la muestra);
- ii) 50 pmol de cebador directo (AFB-F) e inverso (AFB-R);
- iii) 10 nmol de cada dNTP;
- iv) MgCl<sub>2</sub> 2 mM;
- v) 1–2,5 U de polimerasa Taq en el tampón correspondiente de PCR que contenga MgCl<sub>2</sub> 2 mM

Si es posible, se reduce el volumen de las mezclas de PCR a 25 µl.

Se utilizan las siguientes condiciones de PCR: un paso de 95°C (1–15 minutos); 30 ciclos de 93°C (1 minuto), 55°C (30 segundos) y 72°C (1 minuto); y un ciclo final de 72°C (5 minutos).

Las PCR en las que se utilizan los cebadores PL1 y PL2 (Govan *et al.*, 1999) se ajustan teniendo en cuenta que se utilizan mezclas de 50 µl que contienen

- i) 1–5 µl de ADN molde (véase la preparación de la muestra);
- ii) MgCl<sub>2</sub> 2 mM;
- iii) 50 pmol de cebador directo (PL1) e inverso (PL2);
- iv) cada dNTP a una concentración de 25 mM;
- v) 1 U de polimerasa Taq por ml.

Si es posible, se reduce el volumen de las mezclas de PCR a 25 µl.

Se utilizan las siguientes condiciones de PCR: un paso de 95°C (1 minuto); 30 ciclos de 93°C (1 minuto), 55°C (33 segundos) y 72°C (1 minuto); y un ciclo final de 72°C (5 minutos). Los pesos moleculares de los productos de la PCR se determinan sometiéndolos a una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y tiñéndolos con una tinción de ADN adecuada.

Ref.	Denominación	Secuencia	Tamaño del producto de la PCR	Nivel de especificidad
(Dobbelaere et al., 2001b)	AFB-F AFB-R	5'-CTT-GTG-TTT-CTT-TCG-GGA-GAC-GCC-A-3' 5'-TCT-TAG-AGT-GCC-CAC-CTC-TGC-G-3'	1106 pb	Especie
(Govan et al., 1999)	PL1 PL 2	5'-AAG-TCG-AGC-GGA-CCT-TGT-GTT-TC-3' 5'-TCT-ATC-TCA-AAA-CCG-GTC-AGA-GG-3'	973 pb	Especie

## 2. Pruebas serológicas

No se dispone de pruebas serológicas.

## C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

No se dispone de vacunas.

## 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, Gante (Bélgica) y se han publicado con el amable permiso de Ruth Waite y Frans J. Jacobs, respectivamente. Las Figuras 3, 4 y 5 se han reproducido con el amable permiso del Dr. A.M. Alippi, Universidad Nacional de La Plata (Argentina).

Se halla disponible de forma gratuita la publicación de la FAO *Honey bee diseases and pests: a practical guide*, W. Ritter & P. Akatanakul (eds). Agricultural and Food Engineering Technical Report No. 4. FAO, Roma, Italia, 42 pp. ISSN 1814-1137 TC/D/A0849/E en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/a0849e/a0849e00.pdf>

## BIBLIOGRAFÍA

ALIPPI A.M. (1992). Characterization of *Bacillus larvae* White, the causative agent of American foulbrood of honeybees. First record of its occurrence in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.*, **24**, 67–72.

ALIPPI A.M. (1995). Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium. *Microbiologia SEM*, **11**, 343–350.

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**, 1504–1510.

BRØDSGAARD C.J., HANSEN H. & RITTER W. (2000). Progress of *Paenibacillus larvae larvae* infection in individually inoculated honey bee larvae reared single *in vitro*, in micro colonies, or in full-size colonies. *J. Apicult. Res.*, **39**, 19–27.

BZDIL J. (2007): Detection of *Paenibacillus larvae* spores in the debris and wax of honey bee by the Tween 80 method. *Acta Vet. Brno*, **76**, 643–648.

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.

DE GRAAF D.C., ALIPPI A.M., ANTÚNEZ K., ARONSTEIN K.A., BUDGE G., DE KOKER D., DE SMET L., DINGMAN D.W., EVANS J.D., FOSTER L.J., FÜNFAUS A., GARCIA-GONZALEZ E., GREGORC A., HUMAN H., MURRAY K.D., NGUYEN B.K., POPPINGA L., SPIVAK M., VAN ENGELSDORP D., WILKINS S. & GENERSCH E. (2013). Review Article: Standard methods for American foulbrood research. *J. Apicult. Res.*, **52**, DOI 10.3896/IBRA.1.52.1.11.



- DE GRAAF D.C., ALIPPI A.M., BROWN M., EVANS J.D., FELDLAUER M., GREGOR A., HORNITZKY M., PERNAL S.F., SCHUCH D.M.T., TITÉRA D., TOMKIES V. & RITTER W. (2006). Under the microscope. Diagnosis of American foulbrood disease in honeybees: A synthesis and proposed analytical protocols. *Let. Appl. Microbiol.*, **43**, 583–590.
- DINGMANN D.W. (2015). Comparative analysis of *Paenibacillus larvae* genotypes isolated in Connecticut. *Arch. Microbiol.*, DOI 10.1007/s00203-015-1113-4.
- DINGMANN D.W. & STAHLY D.P. (1983). Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 860–869.
- DJUKIC M., BRZUSZKIEWICZ E., FÜNFHAUS A, VOSS J., GOLLNOW K., POPPINGA L., LIESEGANG H., GARCIA-GONZALEZ E., GENERSCH E. & ROLF D. (2014). How to kill the honey bee larva: Genomic potential and virulence mechanisms of *Paenibacillus larvae*. *PLoS One*, **9** (3): e90914. Doi: 10.1371/journal.pone.0090914.
- DOBBELAERE W., DE GRAAF D.C., PEETERS J.E & JACOBS F.J. (2001a). Comparison of two commercial kits for the biochemical characterization of *Paenibacillus larvae larvae* in the diagnosis of AFB. *J. Apic. Res.*, **40**, 37–40.
- DOBBELAERE W., DE GRAAF D.C., PEETERS J.E & JACOBS F.J. (2001b). 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.
- FORSGREN E., STEVANOVIC J. & FRIES I. (2008). Variability in germination and in temperature and storage resistance among *Paenibacillus larvae* genotypes. *Vet. Microbiol.*, **129**, 342–349.
- GENERSCH E. (2010) American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J. Invert. Pathol.*, **103** (Suppl. 1), 10–19.
- GENERSCH E., ASHIRALIEVA A. & FRIES I. (2005). Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honey bees. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 7551–7555.
- GENERSCH E., FORSGREN E., PENTIKÄINEN J., ASHIRALIEVA A., RAUCH S., KILWINSKI J. & FRIES I. (2006). Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvificiens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **56**, 501–511.
- GOCHNAUER T.A. (1973). Growth, protease formation, and sporulation of *Bacillus larvae* in aerated broth culture. *J. Invertebr. Pathol.*, **22**, 251–257.
- GOCHNAUER T.A. & CORNER J. (1987). Detection and identification of *Bacillus larvae* in a commercial pollen sample. *J. Apic. Res.*, **13**, 264–267.
- GORDON R.E., HAYNES W.C. & PANG C.H.N. (1973). The genus *Bacillus*. Agriculture Handbook N° 427, USDA, Washington D.C.
- GOVAN V.A., ALLSOPP M.H. & DAVIDSON S. (1999). A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. *Appl. Environm. Microbiol.*, **65**, 2243–2245.
- HANSEN H. & BRØDSGAARD C.J. (1999). American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World*, **80**, 5–23.
- HASEMAN L. (1961). How long can spores of American Foulbrood live? *Amer. Bee J.*, **101**, 298–299.
- HAYNES W.C. (1972). The catalase test. An aid in the identification of *Bacillus larvae*. *Am. Bee J.*, **112**, 130–131.
- 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*) *pulvificiens* (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. *pulvificiens*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 270–279.
- HORNITZKY M.A.Z. & CLARK S. (1991). Culture of *Bacillus larvae* from bulk honey samples for the detection of American foulbrood. *J. Apicult. Res.*, **30**, 13–16.

- HORNITZKY M.A.Z. & KARLOVSKIS S. (1989). A culture technique for the detection of *Bacillus larvae* in honeybees. *J. Apicult. Res.* **28**, 118–120.
- HORNITZKY M.A.Z. & WILSON S.C. (1989). A system for the diagnosis of the major bacterial brood diseases of honeybees. *J. Apicult. Res.*, **28**, 191–195.
- KOSTECKI R. (1969). Studies on improvement of control of American foulbrood of the honey bee (in Polish). *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, **13**, 97–135.
- 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.
- LINDSTRÖM A. & FRIES I. (2005). Sampling of adult bees for detection of American foulbrood (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) spores in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *J. Apicult. Res.*, **44**, 82–86.
- MORRISSEY B.J., HELGASON T., POPPINGA L., FÜNFHAUS A., GENERSCH E. & BUDGE G.E. (2015). Biogeography of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood using a new multilocus sequence typing scheme. *Environ. Microbiol.*, **17**, 1414–1424.
- NEUENDORF S., HEDTKE K., TANGEN G. & GENERSCH E. (2004) Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen. *Microbiology SGM*, **150**, 2381–2390.
- 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.
- 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**, 331–339.
- 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.
- 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.
- RAUCH S., ASHIRALIEVA A., HEDTKE K. & GENERSCH E. (2009). Negative correlation between individual-insect-level virulence and colony-level virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American Foulbrood of honey bees. *Appl. Environm. Microbiol.*, **75**, 3344–3347.
- RIEG S., BAUER T.M., PEYERL-HOFFMANN G., HELD J., RITTER W., WAGNER D., KERN W.V. & SERR A. (2010). *Paenibacillus larvae* bacteremia in injection drug users. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 487–489.
- RITTER W. (2003). Early detection of American foulbrood by honey and wax analysis. *Apiacta*, **38**, 125–130.
- RITTER W. & KIEFER M.B. (1995). A method for diagnosing *Bacillus larvae* in honey samples. *Animal Res. Dev.*, **42**, 7–13.
- RUDENKO E.V. (1987). Manuscript. Dissertation for Doctorate of Veterinary Science American foulbrood of honey bees and its vaccine prophylaxis (in Russia), Minsk, Belarus.
- SCHÄFER M.O., GENERSCH E., FÜNFHAUS A., POPPINGA L., FORMELLA N., BETTIN B. & KARGER A. (2014). Rapid identification of differentially virulent genotypes of *Paenibacillus larvae*, the causative organism of American foulbrood of honey bees, by whole cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Vet. Microbiol.*, **170**, 291–297.
- SCHAEFFER A.B. & FULTON M. (1933). A simplified method of staining endospores. *Science*, **77**, 194, New York.
- SCHUCH D.M.T., MADDEN R.H. & SATTLER A. (2001). An improved method for the detection and presumptive identification of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in honey. *J. Apicult. Res.*, **40**, 59–64.
- TITERA D & HAKLOVA M. (2003). Detection method of *Paenibacillus larvae larvae* from beehive winter debris. *Apiacta*, **38**, 131–133.

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**, 603–606.

WOODROW A.W. (1941). Susceptibility of honey bee larvae to American foulbrood. *Gleanings Bee Cult.*, **69**, 148–151.

\*  
\* \*

**NB:** Existen los Laboratorios de Referencia de la OIE para la enfermedad de loque americana (Infección de las abejas melíferas por *Paenibacillus larvae*) puede consultarse en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE: <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>. Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE si desea más información sobre las pruebas de diagnóstico y los reactivos para las enfermedades de las abejas.

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989 COMO ENFERMEDAD DE LOQUE AMERICANA;  
ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2016.