

CARACTERIZACIÓN DE *PAENIBACILLUS LARVAE* MEDIANTE TEST BIOQUÍMICO Y PRUEBAS DE SENSIBILIDAD.

Autores: Ana R. González Guerra, José Manuel Martínez Cruz, Roberto Bernal Méndez.

Laboratorio de referencia para Investigaciones y Salud Apícola. Cuba.

Teléfono: 41 23652, Telefax: 41 26893 email: larisa@enet.cu

Introducción:

La loque americana, causada por *Paenibacillus larvae*, es la enfermedad más peligrosa que afecta las crías (larvas, prepupas y pupas) de las abejas (*Apis mellífera* L.) (Bailey, 1991).

Es una enfermedad infectocontagiosa, temida por los apicultores por ser muy insidiosa y tenaz en su curso (Grobov, 1986). Se encuentra difundida en todo el mundo, ocasionando grandes pérdidas económicas.

Desde el punto de vista taxonómico antiguamente se distinguieron 2 especies bacterianas, una causante de la clásica escama de loque americana – *Bacillus larvae*-(White, 1906) y otro menos frecuente, que causa la escama pulverulenta o *Bacillus pulvifasciens* (Kazenelson, 1950).

Actualmente, estas dos especies bacterianas se agrupan o clasifican dentro de la misma especie *Paenibacillus larvae*, en la cual se conocen dos subespecies (*larvae* y *pulvifasciens*) (Chacana et al., 2004).

Los objetivos del presente trabajo fueron estudiar las cepas de este agente patógeno y lograr su caracterización mediante su comportamiento bioquímico y la sensibilidad frente a tetraciclina y oxitetraciclina, antibióticos ampliamente utilizados en nuestras condiciones para el tratamiento de la loque americana.

Materiales y Métodos:

Se seleccionaron 136 cepas de *Paenibacillus larvae* obtenidas de panales con clínica manifiesta de loque americana (125 procedentes de diferentes provincias de Cuba y 11 de otros países). El origen de cada una de las cepas estudiadas fue el siguiente: Las 125 cepas cubanas fueron aisladas para este estudio en el Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola de Sancti Spiritus, Cuba. Las restantes 11 cepas corresponden: al Instituto Experimental de Jarco, Ucrania (2); Instituto Experimental de Veterinaria de San Petersburgo, Rusia (2); Instituto Experimental de Veterinaria, categoría abejas y peces de Moscú, Rusia (4); Apicultural Research, Dr. D.L. Anderson, Nueva Zelanda (2) y Colección de Culturas Tropicales, Fundación Andre Torello, Campinas, S.P., Brazil (1).

El cultivo, aislamiento y clasificación de las mismas se realizó según Instructivas técnicas del IMV (1980), Trilenko (1980) y Gordon et al. (1973). Su clasificación final y la caracterización por tipo bioquímico se efectuó según Jelinski (1985), Sneath (1986), Heyndrickx et al. (1996) y OIE (2004).

Para el estudio de sensibilidad *in vitro* frente a tetraciclina y oxitetraciclina se utilizaron dos variantes, primero, el empleo de discos de antibiograma de 6 mm de diámetro, preparados con una concentración final de tetraciclina y oxitetraciclina de 5 µg/disco respectivamente, según la técnica de Shimanuki y Knox (1994). Se utilizaron suspensiones de células vegetativas (cultivos puros) de *Paenibacillus larvae* en agua bidestilada estéril y mediante hisopos de algodón estériles se dispersaron alícuotas de 180 µl por placa Petri del medio J. Las lecturas se efectuaron midiendo el diámetro del halo de inhibición, formado al cabo de 72 horas de incubación a 37° C ± 1, empleando como base el medio J (Gordon et al., 1973) y el medio MYPGP (Dingman y Stahly, 1983), efectuándose tres réplicas por cepa.

Para los casos que manifestaron resistencia (sin formación de halo) se utilizó la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), empleando los medios J y agar MYPGP para lo cual se estudiaron concentraciones crecientes de tetraciclina y oxitetraciclina de 5, 10, 15 y 20 µg/ml,

incorporados al medio fundido a 45° C (Alippi, 1996). Las suspensiones bacterianas se estandarizaron y se incorporaron sobre las superficies de las placas bien secas a razón de 15 gotas de 5 µl cada una para cada placa Petri de medio. Se efectuaron dos réplicas de cada cepa y concentración y un control (medio J sin el agregado de antibiótico). Las placas se incubaron a 37° C ± 1 durante 72 horas, al cabo de las cuales se realizaron lecturas para la observación del desarrollo bacteriano, determinándose las CMI (concentración más baja necesaria para impedir el crecimiento bacteriano).

Para la diferenciación de *Paenibacillus larvae larvae* y *Paenibacillus larvae pulvifaciens* se utilizaron pruebas bioquímicas (Katzenelzon, 1950; Sneath, 1986; González, 1986 y Henydrickx et al., 1996) (Tabla).

Resultados y Discusión:

Las 136 cepas estudiadas y clasificadas como *Paenibacillus larvae* resultaron bastoncitos gram + agrupados en cadenas cortas, con formación de esporas elipsoidales en posición central-terminal, que manifestaron incapacidad para el desarrollo en medios de cultivo simples y buen crecimiento en agar sangre de carnero y agar sangre equino al 10 % (González, 1986; Nordstrom, 1995); Medio J y Muller Hinton agar (Dingman & Stahly, 1983) en los que forma colonias blanquecinas levemente brillosas y transparentes, coincidiendo con las afirmaciones de Bailey (1984).

Los resultados de las investigaciones bioquímicas mostraron hidrólisis de almidón y catalasa negativos, no producen Indol, ni H₂S (hidrógeno sulfurado) y no sobreviven en transferencias seriadas en caldo nutriente (Gordon et al., 1973; González, 1984; Alippi, 1992); producen coágulo y peptonizan la leche tornasolada, licuan la gelatina de Clark y producen ácido de trehalosa, pero no de sacarosa y xilosa.

Tabla No: 1 Línea bioquímica para clasificación de *Paenibacillus larvae*.

Línea bioquímica	<i>Paenibacillus Larvae larvae</i>	
	TIPO II	TIPO V
Manitol	--	--
Salicina	--	+
Sacarosa	--	--
Trehalosa	+	+
Xilosa	--	+
Catalasa	--	--
H. de almidón	--	--
Producción de Indol	--	--
KNO ₃	+	+
H ₂ S	--	--
Gelatina de Clark	+	+
Leche tornasolada C y P	C y P	C y P
Transferencia en caldo nutriente	--	--

Crecimiento a 20°C	--	--
--------------------	----	----

En relación al tipo bioquímico, el 79 % de las cepas se clasificó como tipo bioquímico II, con reducción de nitratos a nitritos, sin producir ácido a partir de manitol y salicina, y el 21 % se clasificó como tipo bioquímico V, con reducción de nitratos a nitritos y producción de ácido de salicina, pero no de manitol, obteniendo resultados similares a los reportados por Alippi (1996).

Las pruebas bioquímicas (dependencia de tiamina -1 µg/ml- para su crecimiento, desarrollo a 20° C, fermentación de manitol y salicina, hidrólisis de arginina y transferencia en caldo nutriente) desarrolladas para la diferenciación de *Paenibacillus larvae larvae* y *Paenibacillus larvae pulvifaciens* se pueden observar en la Tabla No 1.

Tabla No. 2 Pruebas bioquímicas para la diferenciación de *P. larvae subssp larvae* y *pulvifaciens*.

Paenibacillus Larvae subssp	Dependencia de tiamina	Crecimiento a 20° C	Manitol	Salicina	Indol	Arginina	Catalasa	Transf. Caldo Nutriente
larvae	+	-	-	+	-	-	-	-
pulvifaciens	-	+	+	-	+	+	+	+

Estos resultados se corresponden con los obtenidos por Katzenelzon (1950); Sneath (1986); González (1986) y Heyndrickx (1996).

En el estudio de sensibilidad frente a los antibióticos oxitetraciclina y tetraciclina se pudo evidenciar que el 26 % (19 cepas) fue resistente a oxitetraciclina y el 32 % (23 cepas) se comportó resistente a tetraciclina, mientras que el 14 % (10 cepas) mostró resistencia a los dos antibióticos ensayados.

Considerando de forma individual las cepas cubanas aisladas en diferentes zonas geográficas (125) se observa que las que manifestaron resistencia representan el 50 %. Este comportamiento de *Paenibacillus larvae* frente a tetraciclina y oxitetraciclina sustenta la teoría de que muchos apicultores utilizaron por algún tiempo la aplicación de antibióticos en forma preventiva y/o tratamientos indiscriminados en dosis inadecuadas con la consiguiente aparición de formas de resistencia, lo que está en correspondencia con las aseveraciones de González (1985); González (1986) y Alippi (1996).

Los resultados de la MCI realizada a las cepas que mostraron resistencia en el método del antibiograma por discos se comportaron en el rango de 10 µg/ml y 15 µg/ml.

Conclusiones.

1. La totalidad de las cepas estudiadas fueron clasificadas como *Paenibacillus larvae*, de ellas 123 cepas Sub- especie Larvae.
2. El 79 % de las cepas de *Paenibacillus larvae* correspondió al tipo bioquímico II y el 21 % al tipo bioquímico V.
3. De las 11 cepas extranjeras estudiadas, nueve resultaron *Paenibacillus larvae larvae* y el resto correspondió a la Subespecie *pulvifasciens*.
4. El 9 % del total de las cepas cubanas investigadas fue clasificada como *Paenibacillus larvae pulvifasciens*.
5. El 50 % de las cepas cubanas investigadas mostró resistencia a alguno de los antibióticos probados (tetraciclina - 32 % - y oxitetraciclina – 26 %) y el 14 % mostró resistencia a los dos antibióticos.

Bibliografía consultada:

- Alippi, A. M. (1992). Detección de *Bacillus larvae* en poblaciones mixtas de esporas bacterianas a partir de restos larvales. *Microbiología SEM* 8, 115-118.
- Alippi, A.M. (1996). Loque Americana de las abejas. Técnicas de laboratorio para la detección de *Paenibacillus larvae*. Protocolos de Laboratorio, Curso Internacional de Post-Grado, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, 18 pp.
- Bailey, L.(1984). Patología de las abejas, Ed. Acribia. Pp. 139.
- Bailey, L.(1991). Honey Bee Pathology. 2 nd Ed. Ac. Press, London, UK & New York. USA. pp.193.
- Chacana, P.; Borracci, S.; Audisio, Marcela. (2004). Loque americana de las abejas: Tratamiento y prevención. Inst. Nac. de Tec. Agrop. Estación Experimental Agropecuaria Balcarce. Argentina.
- Dingman, D. W.; Stahly, D. P. (1983). Medium Promoting Sporulation of *Bacillus larvae* and Metabolism of Medium Components. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 860-869.
- González, Ana; Verde, Maida; Silveira, E. (1980). Enfermedades de las abejas y sus crías. Ed. Veterinaria. La Habana, Cuba.
- González, Ana; González, Victoria; Hernández, Cecilia. (1985). Estudio de la sensibilidad *in vitro* de los agentes patógeno de la abeja melífera *Apis mellífera L* frente a varios antibióticos. XXX Congreso Internacional de Apicultura de Apimondia, Japón. Ed. Apimondia, Bucarest, Rumanía, pp. 235-238.
- González, Ana. (1986). Forma mixta de loque benigna, loque ácida y ascosferosis de la abeja en Cuba. Tesis de Dr. en Ciencias Biológicas. Ed. Academia de Ciencias Agrícolas. Moscú.
- Gordon, R.E.; Haynes, W.C.; Pang, C. H-N. (1973). *The genus Bacillus*. Agriculture Handbook No. 427, ARS-USDA, Washington.
- Grobov, A. F. (1986). Instituto Experimental de Veterinaria. Moscú. Rusia.
- Heyndrickx, M.; Vandenmeulebroecke, K.; Hoste, B. (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 (1): 270-279.
- IMV (1980). Instructivas Técnicas para el diagnóstico de las enfermedades de las abejas.
- Jelinski, M. (1985). Some biochemical properties of *Bacillus larvae* White. *Apidologie* 16:69-76.
- Katznelson, H. (1950). *Bacillus pulvifaciens* (n. sp.), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae. *J. Bacteriol.* 59:153-155.
- Nordstrom, S.; Fries, I. (1995). A comparison of media and cultural conditions for identification of *Bacillus larvae* in honey. *Journal Apic. Res.* 34(2): 97-103.
- OIE. (2004). Técnicas para el diagnóstico de las principales enfermedades de las abejas. Organización Internacional de Epizootias.
- Sneath, P. H. A. (1986). Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2. Ed. Williams & Wilkins, Baltimore. p. 1104-1139.
- Trilenko, Valentina (1980). Diagnóstico de enfermedades de las abejas. Manual No1. pp. 13-17. Instituto de Veterinaria, Leningrado.
- White, G. F. (1906). The bacteria of the apiary, with special reference to bee diseases. Technical Series of United States Bureau of Entomology 14: 1-50.