

LOQUE AMERICANA - VERIFICACIÓN DE DOS MÉTODOS DE ANÁLISIS EN CERA DE ABEJAS

A.J. Dell'Orco⁽¹⁾, M.A. Álvarez⁽¹⁾

adellorco@inti.gob.ar

⁽¹⁾ Dto. Microbiología-DT Servicios Analíticos-SOA-GOSI-INTI

Palabras Clave: cera de abejas, Loque Americana, *Paenibacillus larvae*, enfermedad, patógeno, método analítico, verificación.

INTRODUCCIÓN

Loque Americana es una de las enfermedades de las abejas listada en OIE - Código Sanitario para los Animales Terrestres (2011). [4] La bacteria *Paenibacillus larvae*, uno de los principales patógenos de *Apis mellifera* es el agente causal de la enfermedad. Es un bacilo Gram positivo, recto o curvo. Aparece solo y/o en cadenas. Las esporas elipsoidales, centrales a subterminales son extremadamente resistentes al calor y a los agentes químicos. Sólo las esporas son capaces de inducir la infección. Se produce la muerte de las larvas, falta de progenie y la muerte de las colonias. Las esporas de *P. larvae* pueden sobrevivir en la miel, en la cera, y en las larvas muertas entre 3 y 10 años, en escamas secas de las larvas por 35 años, y en las esporas purificadas más de 70 años. El intercambio de colmenas conteniendo restos de cría enferma es la vía más común para diseminar la enfermedad. La cera contaminada de esporas, utilizada en el inicio de la colmena, puede, también, diseminar la enfermedad. [1]

OBJETIVOS

Comparar un método alternativo para el recuento de *P. larvae* en cera de abejas, con el método Tween 80 propuesto en OIE – Manual Terrestre 2022. Realizar la verificación de ambas metodologías analíticas en el laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esporulación

La cepa *P. larvae* PL 92, de la colección UB-CIDEFI, fue adquirida en la UNLP. Se utilizó el protocolo descrito por Graaf et al. [4]



Figura 1: Esporulación de *P. Larvae*, en microaerofilia a 37 °C 7 días.

Se realizaron series de diluciones decimales en caldo MYPGP y se sembraron placas de agar MYPGP, las cuales fueron incubadas a 37 °C ± 1 °C 7 días, en condiciones de microaerofilia. [4] Se removieron las esporas de la superficie y se concentró la suspensión por centrifugación (10.000 x g, 15 min, 4 °C). El pellet resultante se suspendió en agua destilada estéril. El recuento de esporas se obtuvo realizando diluciones decimales en agua destilada estéril, shock térmico a 90 °C ± 1 °C durante 10 min, y sembrando placas de agar MYPGP, las cuales fueron incubadas a 37 °C ± 1 °C 7 días, en condiciones de microaerofilia. [4]

Método alternativo [3]

Se pesó 1 g de pequeñas escamas de cera en frascos, al que se les agregó 20 ml de agua destilada estéril. Los frascos se incubaron en baño de agua a 80 °C ± 1 °C durante 15 min con agitación, se enfriaron a temperatura ambiente y se inocularon tubos, conteniendo 8 ml de caldo nutritivo, con 2 ml del líquido que se separa en el fondo de los frascos. Los tubos se incubaron en aerobiosis a 37 °C ± 1 °C durante 24 h. Se realizó shock térmico en baño de agua a 85 °C ± 1 °C, durante 15 minutos y se sembró 0,1 ml de esta solución en placas de agar MYPGP con ácido nalidíxico. Las placas se incubaron invertidas en microaerofilia a 37 °C ± 1 °C durante 4 días.

Método Tween 80 (OIE) [1]

Se pesó 1 g de pequeñas escamas de cera en tubos de ensayo, al que se les agregaron 8,5 ml de agua destilada estéril y 0,5 ml de Tween 80. Los tubos se incubaron en baño de agua a 70 °C ± 1 °C durante 30 min con agitación, se enfriaron a temperatura ambiente por 2 h y se inocularon tubos conteniendo 5 ml de agua destilada estéril, con 5 ml del líquido que se separa en el fondo de los tubos. Se homogeneizaron en vortex durante 2 min. Se realizó shock térmico, en baño de agua a 90 °C ± 1 °C, durante 10 minutos y se sembraron

0,2 ml de esta solución en placas de agar MYPGP con ácido nalidíxico. Las placas se incubaron invertidas en microaerofilia a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 7 días.

Pruebas de confirmación

Se seleccionaron 3 colonias por replicado.

Verificación de los métodos en el laboratorio [ISO 16140-3]

Paso 1: Verificación de la implementación

Los métodos no se encuentran validados, por lo que no es posible comparar el desempeño en el laboratorio con el de la validación.

Paso 2: Verificación en el ítem de ensayo

Selección del ítem de ensayo

Se seleccionaron cinco muestras de cera de abejas, de diferente tipo: (1) cera fundida sin estampar A, (2) panal extraído de la colmena, (3) cera fundida sin estampar B, (4) cera estampada, y (5) cera de recuperó.

Inoculación artificial

Se prepararon los niveles de inoculación, según el límite de detección de cada método.

Niveles de inoculación (esporas viables/g)	
Método Tween 80	Método alternativo
$3,6 \times 10^5$	
$3,6 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$
$3,6 \times 10^7$	$3,6 \times 10^7$
	$3,6 \times 10^8$

Tabla 1. Niveles de inoculación

Realización del ensayo

Se prepararon:

- dos replicados de la muestra de cera sin inóculo.
- dos replicados de la muestra cera inoculada, según el nivel a analizar.
- un blanco de muestra realizando el inóculo en el medio de cultivo.

Se analizó la muestra (1) **cera fundida sin estampar A**, en cada nivel de inoculación, por ambos métodos.

RESULTADOS

(1) Cera fundida sin estampar A

Nivel (esporas viables/g)	Recuento Log (esporas viables/g)	Nivel de Inóculo Log (esporas viables/g)	Diferencia absoluta Log (esporas viables/g)	Límite de aceptación Log (esporas viables/g)
$3,6 \times 10^5$	3,39	3,59	0,20	< 0,5
$3,6 \times 10^6$	4,28	4,11	0,17	
$3,6 \times 10^7$	5,33	5,50	0,17	

Tabla 2. Resultados del método Tween 80

Nivel (esporas viables/g)	Recuento Log (esporas viables/g)	Nivel de Inóculo Log (esporas viables/g)	Diferencia absoluta Log (esporas viables/g)	Límite de aceptación Log (esporas viables/g)
$3,6 \times 10^5$	4,72	4,85	0,13	< 0,5
$3,6 \times 10^7$	5,78	5,73	0,06	

Tabla 3. Resultados del método alternativo.

Pruebas bioquímicas	
Crecimiento	(+)
Tinción de Gram	Bacilos Gram (+) largos y finitos, solos o en cadena, en disposición "como letra china"
Reacción de la catalasa	(-)
Reacción de la oxidasa	(-)

Tabla 4. Pruebas de confirmación.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

P. larvae no desarrolla ni esporula en los medios de cultivo estándar [2]. Los métodos seleccionados permiten aislar esporas viables del microorganismo, presentes en cera de abejas. Se observa que en el medio MYPGP, con y sin agregado de ácido nalidíxico, la germinación de esporas de *P. larvae* es inferior al 6%. La incorporación de este antibiótico al medio basal, permite el aislamiento semi-selectivo de *P. larvae* a partir de la cera que presente otras especies esporuladas aeróbicas y/o microaerofílicas. [2]

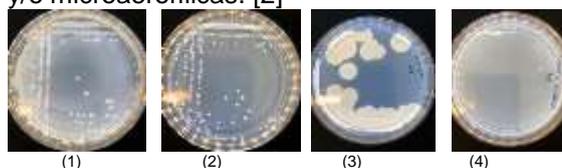


Figura 2: *P. larvae* en MYPGP sin agregado de ácido nalidíxico (1) y con agregado de de ácido nalidíxico (2). *B. cereus* en MYPGP sin agregado de ácido nalidíxico (3) y con agregado de de ácido nalidíxico (4).

El **método de Tween 80** tiene un límite de detección un orden menor que el **método alternativo**.

Si se considera un mismo nivel de inóculo, la diferencia absoluta entre ambos métodos es menor que el límite de aceptación.

Verificación de los métodos en el laboratorio [ISO 16140-3]

Para cada nivel estudiado en ambos métodos, la diferencia absoluta entre la cera inoculada fundida sin estampar y el inóculo de referencia, fue menor que el límite de aceptación. Actualmente, se continúa con la verificación en los cuatro ítems de ensayo restantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Alippi A. "American Foulbrood of honey bees (Infection of honey bees with Paenibacillus larvae)". En "OIE Terrestrial Manual". OIE, Paris, 2022, 1-17.
- [2] Alippi A. "Tesis doctoral: Evaluación de la diversidad fenotípica y genotípica de cepas de larvas patógenas de abejas melíferas". UNLP – Fac. de Cs. Agrarias y Forestales - CIDEFI, 2015.
- [3] Del Hoyo M. "Protocolos de la Red de Laboratorios de Sanidad PROAPI-INTA". INTA.
- [4] Graaf D.C., et al. "Standard methods for American foulbrood Research". J. of Apicultural Research, 52, 1, 2013, 1-27.