

CAPÍTULO 3.2.3.

LOQUE EUROPEA DE LAS ABEJAS MELÍFERAS (INFECCIÓN DE LAS ABEJAS MELÍFERAS POR *MELISSOCOCCUS PLUTONIUS*)

RESUMEN

Descripción de la enfermedad: El microorganismo causante de la loque europea (LE) de las abejas melíferas es la bacteria *Melissococcus plutonius*. La observación de los síntomas de la enfermedad en condiciones de campo no resulta fiable para detectar su presencia si no se dispone de formación específica. El signo más claro y frecuente es la muerte de las larvas poco antes de ser operculadas en sus celdas, pero la muerte también puede deberse a otras causas distintas a la loque europea. La mayoría de las colonias infectadas presentan pocos signos visibles. La infección sigue siendo enzoótica dentro de las colonias individuales debido a la contaminación mecánica de los panales de miel por microorganismos resistentes. Por lo tanto, pueden esperarse repeticiones de la enfermedad en años posteriores. Esta enfermedad está extensamente distribuida por todo el mundo y en algunos lugares es un problema cada vez más importante.

Detección del agente: El examen de preparaciones adecuadas de restos de larvas por medio de un microscopio de gran potencia para detectar la presencia de numerosos cocos lanceolados es suficiente en muchos casos, especialmente cuando lo realizan personas experimentadas.

El medio tradicional para realizar un diagnóstico de la loque europea es el aislamiento e identificación del microorganismo causal. Este puede distinguirse fácilmente de todas las demás bacterias asociadas con las abejas por sus exigentes condiciones de cultivo. No obstante, recientemente también se han descrito cepas atípicas no exigentes.

La bacteria aislada puede ser identificada y diferenciada por medio de simples pruebas de aglutinación en tubo. También existe una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional de un solo paso. Asimismo, se han desarrollado varias PCR en tiempo real. Estos métodos permiten un análisis directo de las larvas, las abejas adultas y los productos de las abejas melíferas.

Pruebas Serológicas: No existen pruebas disponibles para la detección de anticuerpos en las abejas.

Requisitos para las vacunas: No se dispone de vacunas.

A. INTRODUCCIÓN

Las larvas de las abejas afectadas por esta enfermedad normalmente mueren 1-2 días antes de ser operculadas en sus celdas, o poco tiempo después, y siempre antes de transformarse en crisálidas. La enfermedad está causada por la bacteria *Melissococcus plutonius* y ocurre la mayoría de las veces durante el período en el que las colonias crecen rápidamente. La mayoría de las larvas enfermas salen de su posición de enroscamiento en el fondo de sus celdas antes de morir. Muchas son detectadas rápidamente y retiradas por las abejas nodrizas, dejando celdas vacías diseminadas al azar entre las crías restantes. Algunas larvas infectadas sobreviven, alcanzan la fase de pupa y se convierten en adultos. Estas larvas que sobreviven son capaces de defecar y sus heces infectadas contribuyen a la propagación constante de la enfermedad (Bailey, 1960).

Las larvas infectadas que escapan a la detección de las abejas adultas y mueren, primero se vuelven flácidas y su color se torna amarillo claro, que se vuelve marrón progresivamente, convirtiéndose al mismo tiempo en una masa semilíquida. Después se secan y forman escamas de color marrón oscuro que pueden extraerse fácilmente de las celdas. Las colonias gravemente afectadas pueden tener un olor muy rancio o agrio, algunas veces ácido como el vinagre, pero a menudo no hay olor.

Los signos de la enfermedad pueden desaparecer de forma espontánea de las colonias infectadas antes de finalizar la temporada activa, pero es probable que vuelva a repetirse la enfermedad en los años siguientes (Bailey & Ball, 1991; Forsgren et al., 2013). Esta enfermedad parece presentar variaciones en cuanto a la gravedad en función de la zona geográfica, de modo que puede ser relativamente benigna en algunos lugares, pero presentar una gravedad creciente en otros (Forsgren et al., 2013).

En general, siempre se ha considerado que la LE es menos grave que la loque americana (LA) porque las tasas de recuperación de la LE son más altas que las de la LA, y a menudo puede desaparecer con poca intervención o incluso sin ninguna. No obstante, sigue siendo una enfermedad preocupante a escala nacional y mundial. De hecho, se han descrito formas más agresivas de la bacteria en diferentes países (Arai et al., 2012; de Leon-Door et al., 2018; Nakamura et al., 2020). Además, con frecuencia se notifican casos de la denominada LE atípica (Gaggia et al., 2015; Roy & Franco, 2021). La LE atípica está descrita como responsable de brotes recurrentes más graves y difíciles de eliminar.

1. Epizootiología y signos clínicos

Los signos clínicos generales que se observan en una colonia son una operculación irregular de las crías, y la presencia de celdas operculadas y celdas no operculadas distribuidas de manera irregular por el marco de la cámara de cría (Figura 1). La loque europea suele afectar a larvas jóvenes, que mueren cuando todavía están enrolladas antes de ser selladas. Las larvas afectadas más jóvenes cubren el fondo de la celda y son casi transparentes, con tráqueas visibles. El color de las larvas pasa de blanco perla a amarillo, y a continuación, a marrón (Figura 2). Las larvas mueren a la edad de 4–5 días y casi nunca en celdas operculadas. Las larvas infectadas adoptan posturas poco naturales en las celdas, retorcidas contra las paredes. Las larvas terminan descomponiéndose hasta tal punto que forman unas escamas correosas secas que pueden desprenderse fácilmente de las celdas. Las crías gravemente afectadas pueden generar un olor viciado o agrio, a veces ácido, parecido al del vinagre, pero es posible que no huelan a nada, según si hay o no saprófitos. Una infestación tardía por *Varroa*, antes del colapso de la colonia, puede conducir a un aspecto similar de las crías y es un diagnóstico diferencial importante.



Fig. 1. Loque europea: operculación irregular de la cría.



Fig. 2. Las larvas infectadas se vuelven flácidas y pasan de ser amarillas a marrones, y finalmente se transforman en una escama oscura. Fotografía de A. M. Alippi.

Los signos de la enfermedad suelen aparecer por primera vez en primavera y verano, y su incidencia puede ser mayor cuando las colonias sufren estrés. Sin embargo, los casos atípicos de LE difieren de las descripciones clásicas de la enfermedad: signos recurrentes más graves de un año para otro que persisten en el tiempo, lo que atestigua una virulencia particular. Estos casos podrían complicar el diagnóstico en condiciones de campo en cuanto al resultado de la colonia y los signos visuales (Milbrath et al., 2021; informe de la SVA, 2020), sobre todo porque pueden confundirse con la LA cuando la cría operculada se ve afectada y las larvas muertas adquieren una consistencia “pegajosa” que puede parecerse al estado de “cuerda” viscosa de las larvas muertas por LA (Roy y Franco, 2021). En general, esto pone de relieve el valor del diagnóstico de laboratorio y el establecimiento de la vigilancia para prevenir futuras epidemias y nuevas cepas emergentes.

En Japón se describieron cepas atípicas de *M. plutonius* que mostraban características fenotípicas, bioquímicas y moleculares diferentes (Arai et al., 2012). A diferencia de las cepas típicas, las cepas atípicas mostraron ser no exigentes, capaces de crecer en condiciones aeróbicas y en medios sin suplementos de sal de potasio. Primero se consideró que estaban restringidas a Japón, pero se ha descrito su amplia distribución en Europa y América (de Leon-Door et al., 2018; Wood et al., 2020). Hasta la fecha, las cepas de *M. plutonius* se han agrupado en tres complejos clonales (CC3, CC12 y CC13) mediante tipificación de secuencias multilocus (MLST) (a fecha de enero de 2022 [https://pubmlst.org/mplutonius/]). Las cepas típicas exigentes en cuanto al cultivo pertenecían a CC3 y CC13, mientras que las cepas atípicas no exigentes pertenecían a CC12 (de Leon-Door et al., 2018; Takamatsu et al., 2014). Además, los análisis de secuenciación del genoma completo (WGS) sugieren que los factores de virulencia difieren entre cepas típicas y atípicas, pero también dentro de las cepas típicas (ya que las cepas pertenecientes a CC13 carecen de algunos factores de virulencia putativos). Las cepas atípicas también pueden tener la ventaja de combinar un consumo de nutrientes más rápido (mayores capacidades metabólicas con respecto al uso de diferentes fuentes de nutrientes) junto con la presencia de factores de virulencia para provocar una muerte acelerada de las larvas de abejas melíferas (Djukic et al., 2018). Sin embargo, se necesitan más estudios para conocer plenamente las propiedades de virulencia de las cepas de *M. plutonius* y mejorar nuestro conocimiento de la patogenia de la LE típica y la atípica.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la loque europea de las abejas melíferas y su finalidad

Método	Finalidad					
	Demostrar ausencia de infección 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
Detección e identificación del agente^(a)						
Aislamiento bacteriano	+++	+++	++	+++	+++	–
Detección de antígeno	++	++	++	++	++	–
Microscopía	++	++	++	+++	+++	–
PCR	+++	+++	+++	+++	+++	–

Clave: +++ = método recomendado para esta finalidad; ++ = método recomendado, pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para esta finalidad.

PCR = reacción en cadena de la polimerasa.

^(a)Se recomienda aplicar una combinación de métodos de identificación del agente a una misma muestra clínica.

1. Detección e identificación del agente

El diagnóstico de la loque europea se basa en la identificación del agente patógeno y en la presencia de signos clínicos. En este capítulo se ofrece una revisión inicial de los signos clínicos de la enfermedad, así como de los

métodos de identificación que requieren un paso de cultivo previo y los que pueden realizarse directamente con las muestras obtenidas. Las técnicas en cuestión son la caracterización microbiológica, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnicas basadas en anticuerpos y la microscopía. El técnico debe conocer las diferencias de sensibilidad entre los sistemas que aquí se describen y debe escoger el más adecuado para cada situación.

1.1. Microscopía

Las larvas recién muertas son las de elección para el diagnóstico. Preferiblemente, antes de que tenga lugar la descomposición, se hace un frotis de las larvas muertas en el porta o se separan apretando la cutícula por el centro del cuerpo con unas pinzas que luego se retiran. El contenido del intestino medio se deja expuesto sobre el porta, dentro de la membrana peritrófica transparente y gelatinosa. Esta está parcial o casi totalmente llena de bacterias que pueden verse fácilmente formando montones de color tiza opaco. El contenido del intestino medio de las larvas sanas, que son de más difícil disección, tiene un color marrón dorado. Las larvas aparentemente sanas pueden contener una mezcla de bacterias y de polen. El intestino medio de las larvas sanas, que contiene mucho polen de color brillante, puede parecerse a los intestinos llenos de bacterias.

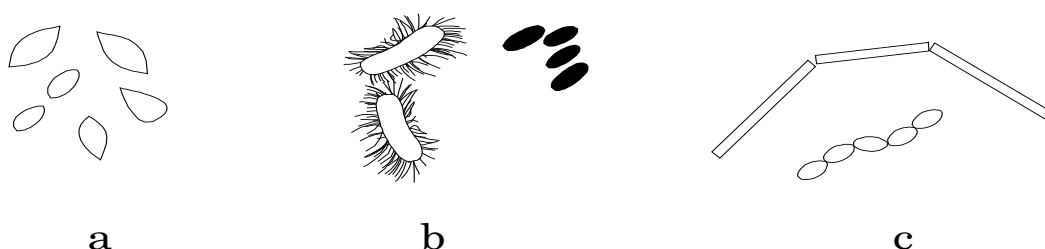


Fig. 3. Bacterias asociadas a la loque europea.

- (a) *Melissococcus plutonius*:** La causante de la loque europea. Se presenta individualmente, en cadenas longitudinales o en grupos. Morfológicamente se parece al *Enterococcus faecalis*, un invasor secundario frecuente.
- (b) *Paenibacillus alvei*:** Bacilos vegetativos $2,0-7,0 \times 0,8-1,2 \mu\text{m}$ con flagelos; esporulación con esporas adyacentes. Los bacilos y las esporas son más largos que los de *Paenibacillus larvae* (véase la loque americana).
- (c) *Achromobacter eurydice*:** Bacilos delgados y rectangulares in vivo que pueden formar cadenas de estafilococos in vitro en algunos medios.

Para realizar una investigación bacteriológica, se transfiere la cantidad correspondiente a un asa de siembra llena de suspensión acuosa del contenido del intestino medio a un porta limpio, y se mezcla con una pequeña cantidad de nigrosina acuosa al 5%. Esto se extiende sobre uno o dos centímetros cuadrados, se seca poco a poco sobre una llama y se examina directamente con un microscopio de gran potencia. La presencia de numerosos estafilococos lanceolados, de aproximadamente $0,5-1,0 \mu\text{m}$ de tamaño, que se presentan individualmente o en grupos, dispuestos en pares o en cadenas cortas, es suficiente para dar un diagnóstico casi seguro de la loque europea. Con frecuencia hay también bacterias parecidas a los bacilos, delgadas y con extremos rectos (Figura 3). Es probable que preparaciones similares, a partir de suspensiones acuosas de larvas enteras muertas o en descomposición, presenten una población variada de bacterias, entre las que *M. plutonius* será difícil de distinguir. Como alternativa, se puede preparar un frotis de larvas enfermas y enviarse al laboratorio (Hornitzky y Wilson, 1989). Estos frotis se fijan por calor de llama de mechero pasándolos dos o tres veces y se sumergen en carbol fucsina al 0,2% durante 30 segundos. La tinción se enjuaga y se dejan secar al aire o sobre un papel absorbente para proceder al examen microscópico a $\times 1\ 000$ (Forsgren et al., 2013; Hornitzky y Wilson, 1989). Los microorganismos se consideran *M. plutonius* si son cocos lanceolados, de alrededor de $0,5 \times 1,0 \mu\text{m}$, captan la tinción de manera uniforme y no se detecta ninguna zona del microorganismo sin teñir (Figura 4). Se considera que las esporas las produce el invasor secundario *Paenibacillus alvei* si miden alrededor de $0,8 \times 2,0 \mu\text{m}$, y si al aplicar carbol fucsina al 0,2% solo se tiñen las paredes de dichas esporas (Hornitzky y Wilson, 1989) (Figura 5). Como alternativa, puede utilizarse la técnica de tinción de Gram en frotis preparados a partir de crías enfermas. Permite verificar que *M. plutonius* es grampositivo; este microorganismo adquiere aspecto de bacteria de forma cocoide que forma parejas o incluso cadenas (Forsgren et al., 2013). Es importante realizar un muestreo correcto de las crías porque incluso en el mismo marco de cría, *M. plutonius* se halla principalmente en larvas con signos visuales de enfermedad (Forsgren et al., 2013).

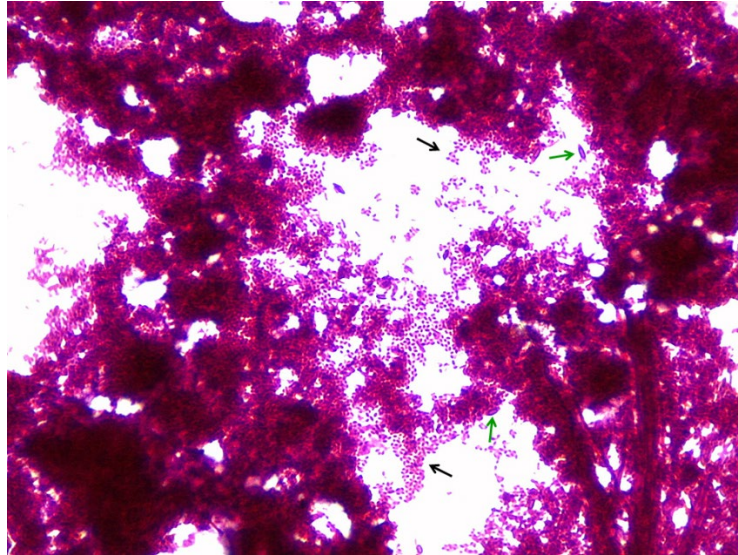


Fig. 4. Frotis preparado a partir de crías enfermas teñidas con carbol fucsina. Las flechas negras indican una masa del microorganismo *Melissococcus plutonius* cocoide/lanceolado. Las flechas verdes indican la presencia de esporas del invasor secundario *Paenibacillus alvei*. Fotografía de A. M. Alippi.

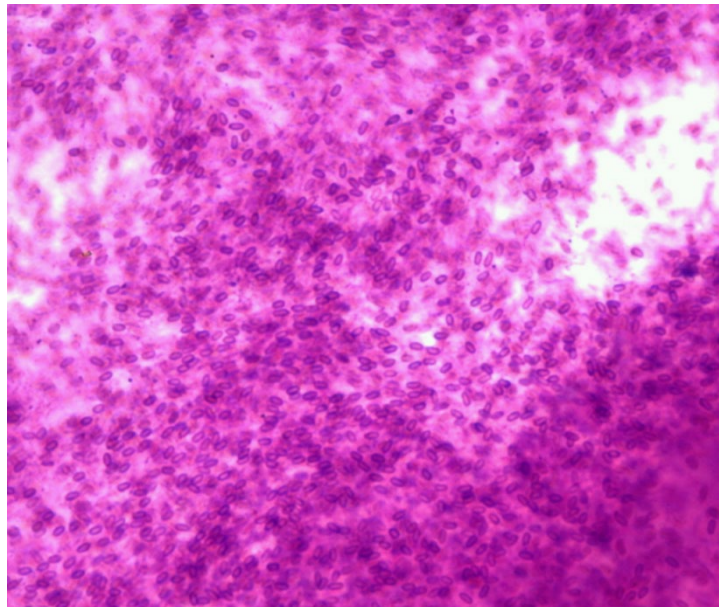


Fig. 5. Esporas de *Paenibacillus alvei* en un frotis preparado a partir de crías enfermas teñido con carbol fucsina. Fotografía de A. M. Alippi.

1.2. Métodos de cultivo

Durante las primeras fases de una infección, *Melissococcus plutonius* (cepa tipo NCIMB 702443) es la bacteria más abundante y suele observarse antes de la aparición de la variada microflora asociada a esta enfermedad (Bailey y Collins, 1982a, 1982b). Aunque *M. plutonius* puede aislarse de la cría enferma y de la miel mediante cultivo, los métodos de cultivo bacteriano parecen ser muy poco sensibles, ya que detectan menos del 0,2% de las células bacterianas (Djordjevic et al., 1998).

1.2.1. Medios de cultivo

Melissococcus plutonius puede cultivarse en un medio basal (modificado de Bailey, 1957) compuesto de (por litro):

- i) 10 g de extracto de levadura
- ii) 1 g de L-cisteína o 1,5 g de clorhidrato de L-cisteína monohidrato,

- iii) 10 g de glucosa,
- iv) 10 g de almidón soluble,
- v) 100 ml de KH_2PO_4 1 M a pH 6,6
- vi) 20 g de agar

El agar M110 (Forsgren *et al.*, 2013) y el agar KSBHI (Arai *et al.*, 2012) también pueden utilizarse para el aislamiento y cultivo de *M. plutonius*. El medio se esteriliza preferentemente en autoclave en lotes de 100 ml en frascos con tapón de rosca a 115 °C durante 15 minutos y se vierte en placas de Petri inmediatamente antes de su uso. Opcional: para evitar el crecimiento de bacterias secundarias, puede añadirse ácido nalidíxico esterilizado por filtración (disuelto en NaOH 0,1 M) hasta una concentración final de 3 µg por ml después del autoclavado (Forsgren *et al.*, 2013).

Nota: en el caso de los cultivos líquidos, la sustitución del almidón por sacarosa hará que el medio sea más transparente. Esto ayuda a comprobar la turbidez o el enturbiamiento de la suspensión celular, por ejemplo, para ver si hay crecimiento bacteriano.

Todos los medios de cultivo deben someterse a un control de calidad y deben permitir el crecimiento de *M. plutonius* a partir de pequeños inóculos. También debe cultivarse una cepa de referencia en paralelo con las muestras sospechosas para garantizar que las pruebas funcionan correctamente. Las placas preparadas se cubren con suspensiones acuosas diluidas de larvas enfermas o, idealmente, de intestino medio de larvas enfermas. Estas últimas pueden prepararse de antemano dejándolas secar en un portaobjetos, que puede conservarse hasta 18 meses a 4°C o -20°C.

La preparación y conservación de frotis secos también elimina la mayoría de los microorganismos secundarios después de unas pocas semanas, sin afectar la viabilidad de *M. plutonius*. La forma más eficiente de aislar este microorganismo es mediante la inoculación de diluciones decimales de la suspensión acuosa en agar que se haya mantenido líquido a 45°C y que a continuación se vierte en las placas. Las placas deben incubarse anaeróticamente, por ejemplo, en jarras McIntosh o Fildes, en una atmósfera con aproximadamente un 5-10% de dióxido de carbono (CO_2) a 35°C durante alrededor de 1 semana. Generalmente aparecen pequeñas colonias de *M. plutonius* de un color blanco opaco a los 4 días. Esta bacteria es en cierto modo pleomórfica *in vitro*, apareciendo con frecuencia en forma de bacilo. El pH final del medio puede llegar a ser de 5,5. Las cepas cada vez menos exigentes empiezan a seleccionarse *in vitro*. A continuación, las formulaciones simplificadas o modificadas del medio permiten la multiplicación, especialmente de un grupo de *M. plutonius* de Brasil (Allen y Ball, 1993) serológicamente diferente, que se multiplica en medios químicamente definidos (Bailey, 1984). El CO_2 es esencial. Los tubos de agar inclinado inoculados deben sellarse cuando se aprecia el crecimiento bacteriano y entonces pueden conservarse a 4°C durante 6 meses. Alternativamente, los cultivos pueden suspenderse en un medio de sacarosa al 10%, extracto de levadura al 5% y KH_2PO_4 0,1 M, a pH 6,6, y a continuación liofilizarse. Las cepas de *M. plutonius* aisladas también se pueden conservar mediante suspensión en medios líquidos que contengan un 10-30% de glicerol a -80 °C.

Un cierto número de otras bacterias se asocian con frecuencia a *M. plutonius* y pueden confundirse con ella. *Achromobacter eurydice* habita en el tracto alimentario de las abejas adultas y se presenta frecuentemente en pequeñas cantidades en el intestino de las larvas sanas. Dicha bacteria es más numerosa en las larvas infectadas por *M. plutonius*. La incidencia de *A. eurydice* en abejas sanas es muy baja en invierno y a comienzos de primavera, pero aumenta en verano. Tiene forma de bacilo rectangular delgado y puede presentarse individualmente o en cadena. Cuando se cultiva en cierto medio, a veces parece un estreptococo y se confunde con *M. plutonius*. Sin embargo, sus características de cultivo se parecen mucho a las de *Corynebacterium pyogenes* (Jones, 1975), y es muy pobre su multiplicación en forma de bacilos delgados en las condiciones necesarias para el cultivo de *M. plutonius*. La posición taxonómica de *A. eurydice* sigue sin conocerse.

Morfológicamente, *Enterococcus faecalis* se parece mucho a *M. plutonius* y a menudo se confunde con este, aunque son cultural y serológicamente distintos. A diferencia de *M. plutonius*, *Enterococcus* permanece viable durante mucho tiempo cuando está seco, o persiste como

contaminación mecánica dentro de las colonias de abejas. Es probable que sea llevado a las colmenas por la incursión de las abejas adultas, y es responsable del olor ácido que algunas veces se encuentra en la loque europea.

Enterococcus faecalis crece bien *in vitro* en las mismas condiciones que *M. plutonius*, pero puede diferenciarse rápidamente por su habilidad para crecer aeróbicamente. Forma pequeñas colonias transparentes en 24 horas y es un anaerobio facultativo. Se multiplica en una variedad de los medios más comunes, con o sin carbohidratos o CO₂. El pH final en presencia de glucosa es 4,0. *Enterococcus faecalis* rara vez sobrepasa en número al *M. plutonius* en las larvas de abeja y puede diluirse normalmente. Cuando no se diluye, produce ácido suficiente para prevenir la multiplicación *in-vitro* de *M. plutonius*.

Enterococcus faecalis no se multiplica en las larvas de las abejas en ausencia de *M. plutonius*, así que su presencia en gran número puede considerarse un presunto indicio de la presencia de loque europea.

Paenibacillus alvei es generalmente más común que *E. faecalis* en las colonias afectadas por la loque europea, pero no está invariablemente asociado a la enfermedad y no puede actuar como un indicador fiable de la misma; de hecho, *P. alvei* se ha hallado en colonias afectadas por loque americana en forma de poblaciones de esporas bacterianas mixtas sobre restos de larvas. En las colonias de abejas, *P. alvei* solo se multiplica en los restos de larvas en descomposición, y entonces sus esporas a menudo predominan sobre todas las demás bacterias, pudiendo estas quedar aparentemente excluidas. *Paenibacillus alvei* forma esporas muy resistentes y empieza a estar bien establecido en las colonias de abejas con loque europea enzoótica. Esta bacteria produce un característico olor a rancio. *Paenibacillus alvei* se multiplica de forma muy pobre en las condiciones necesarias para el crecimiento *in-vitro* de *M. plutonius*. Crece dando lugar a colonias transparentes, algunas de las cuales son móviles y forman arcos sobre la superficie del agar. Los cultivos tienen un olor ácido característico que se asocia con la loque europea cuando el bacilo está presente. Se forman esporas rápidamente.

1.3. Métodos inmunológicos

Para la identificación del *M. plutonius*, el antisuero puede prepararse en conejos por inoculación intravenosa de cultivos lavados de *M. plutonius* (Bailey y Gibbs, 1962) o a partir de una sola inoculación intramuscular de 1 ml de suspensión de antígeno mezclada con un volumen igual de adyuvante incompleto de Freund.

Los ensayos se llevan a cabo mediante pruebas de aglutinación en tubos que contienen suspensiones de las bacterias equivalentes a 0,25 mg de peso seco por mililitro. Los títulos finales son leídos una vez que los tubos han sido incubados durante 24 horas a 37°C.

Se ha desarrollado un enzoinmunoanálisis (ELISA) para confirmar la presencia de *M. plutonius* (Pinnock y Featherstone, 1984).

Recientemente, se ha creado y está ya a la venta un dispositivo de flujo lateral para la detección de la loque europea en el que se emplean anticuerpos monoclonales. Proporciona un diagnóstico confirmativo rápido de la infección en las larvas de abeja por la loque europea en cuestión de 10 minutos y sin necesidad de equipamiento especial.

1.4. Reacción en cadena de la polimerasa

Puede aplicarse la PCR convencional a las colonias bacterianas sospechosas una vez transferidas a medio líquido y que hayan crecido en él (Govan *et al.*, 1998). Se prepara ADN genómico de acuerdo con los procedimientos estándar (Wilson, 1990). También es adecuado realizar una extracción de ADN con kits comerciales, siguiendo las instrucciones del fabricante. Paralelamente a las muestras problema, siempre deberán analizarse controles negativos y positivos.

Se resuspende el precipitado de ADN en 50 µl de tampón TE 1 × (Tris/HCl 10 mM, pH 7,5; ácido EDTA [etilendiaminotetraacético] 1 mM). Se amplifican aproximadamente de 1 a 3 µg de ADN genómico en una reacción de 50 µl. También se puede realizar la reacción de la PCR con larvas. Se incuba cada larva de

forma individual en medio líquido toda la noche a 30°C en un recipiente anaeróbico que contenga hidrógeno más un 10% de CO₂. A continuación, se centrifugan dos mililitros de cada muestra a 1 000 *g* durante 2 minutos, y el sobrenadante se centrifuga a 10 000 *g* durante 5 minutos. Se resuspende el precipitado resultante en 100 µl de H₂O esterilizada y calentada a 95°C durante 15 minutos. Se amplifica 1 µl en 50 µl de mezcla para PCR. Esta mezcla contiene, además de ADN molde, MgCl₂ 2 mM, 50 pmoles de cebador directo (EFB-F) e inverso (EFB-R; más adelante se ofrecen las secuencias de los cebadores) por µl, desoxinucleósido trifosfato (cada uno a una concentración de 25 mM) y 1 U de polimerasa *Taq*. La amplificación del fragmento de ADN específico tiene lugar en un termociclador en las siguientes condiciones de PCR: un pase de 95°C (1 minuto); 3 ciclos de 93°C (1 minuto), 55°C (30 segundos), y 72°C (1 minuto); y un ciclo final de 72°C (5 minutos).

Al trabajar con abejas adultas y/o muestras de miel, se recomienda recurrir a los kits comerciales de extracción de ADN (Govan *et al.*, 1998).

Los primeros en elaborar una PCR semianidada fueron Djordjevic *et al.* (1998), y a partir de entonces ha mejorado la sensibilidad de la detección de *M. plutonius* en la miel, el polen, las larvas enteras y las abejas adultas (McKee *et al.*, 2003). En esta prueba, la primera mezcla de reacción de 50 µl contiene entre 5 y 30 ng de ADN genómico, MgCl₂ 3 mM, desoxirribonucleótido trifosfato (cada uno a una concentración de 200 µM), 100 ng de los cebadores MP1 y MP2, 5 µl de tampón para PCR 10 × (Tris/HCl 100 mM, pH 8,3; MgCl₂ 15 mM, KCl 500 mM) y 1 U de polimerasa *Taq*. Las condiciones de amplificación consisten en un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización (de 95°C durante 30 segundos), hibridación de los cebadores (61°C, 15 segundos), extensión de los cebadores (72°C, 1 minuto) seguido de una fase de extensión adicional de extensión de 5 minutos a 72°C. El tercer cebador MP3 se utiliza conjuntamente con el MP1 para amplificar un fragmento de ADN de 1 µl del producto primario de la PCR obtenido en la reacción previa. Las condiciones de la PCR para la PCR semianidada son exactamente las mismas que se describieron anteriormente, excepto que la concentración de MgCl₂ se reduce a 1,5 mM y la temperatura de hibridación se reduce hasta 56°C.

Los pesos moleculares de los productos de la PCR se determinan mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1–1,5 % con una tinción para ADN adecuada. Los productos de la PCR también se pueden analizar empleando dispositivos de electroforesis microfluidica o capilar.

Arai *et al.* (2014). desarrollaron una PCR doble muy específica que permite detectar *M. plutonius* directamente a partir de larvas enfermas. Permite diferenciar entre las cepas que crecen fácilmente en el cultivo y las que tienen requisitos de cultivo exigentes.

También se han desarrollado y validado PCR en tiempo real (Forsgren *et al.*, 2013; Roetschi *et al.*, 2008). Ofrecen una mejora tanto de la sensibilidad como de la especificidad.

Ref.	Nombre	Secuencia (5' → 3')	Tamaño del producto de la PCR
Govan <i>et al.</i> , 1998	Primer 1 Primer 2	5'-GAA-GAG-GAG-TTA-AAA-GGC-GC-3' 5'-TTA-TCT-CTA-AGG-CGT-TCA-AAG-G-3'	832 bp
Djordjevic <i>et al.</i> , 1998; McKee <i>et al.</i> , 2003	MP1 MP2 MP3	5'-CTT-TGA-ACG-CCT-TAG-AGA-3' 5'-ATC-ATC-TGT-CCC-ACC-TTA-3' 5'-TTA-ACC-TCG-CGG-TCT-TGC-GTC-TCT-C-3'	485 bp 276 bp
Roetschi <i>et al.</i> , 2008	MelissoF MelissoR Sonda	5'-CAG-CTA-GTC-GGT-TTG-GTT-CC-3' 5'-TTG-GCT-GTA-GAT-AGA-ATT-GAC-AAT-3' 6'-FAM-CTT-GGT-TGG-TCG-TTG-ACMBGNFQ-3'	79 bp
Budge <i>et al.</i> , 2010	EFBFor EFBRev2 Sonda	5'-TGT-TGT-TAG-AGA-AGA-ATA-GGG-GAA-3' 5'-CGT-GGC-TTT-CTG-GTT-AGA-3' 5'-FAM-AGA-GTA-ACT-GTT-TTC-CTC-GTG-ACG-GT-TAMRA-3'	69 bp

En los últimos años, se han creado muchos métodos de PCR en tiempo real, como métodos independientes del cultivo para detectar tanto *M. plutonius* como *P. larvae* a partir de diversas muestras de miel y colmenas, incluidas larvas y abejas adultas. En comparación con la PCR convencional, estos métodos ofrecen la posibilidad de detectar un molde diana con su cuantificación (si es necesario) de una manera robusta, altamente reproducible, sensible y sin pasos de análisis posteriores a la PCR, que consumen mucho tiempo y son propensos a la contaminación (revisado por Dainat et al., 2018; Okamoto et al., 2022; Riviere et al., 2013).

Al igual que en la PCR convencional, es muy importante realizar controles adecuados en paralelo a las muestras problema. También se pueden usar kits comerciales de extracción de ADN (que deben utilizarse siguiendo las instrucciones del fabricante).

En cuanto a la elección de una prueba PCR para la detección de *M. plutonius*, los usuarios deben considerar la idoneidad para la finalidad definida y la interpretación de los datos adquiridos antes de adoptar tales métodos. Puede obtenerse más asesoramiento de los Laboratorios de Referencia¹ de la OMSA.

2. Pruebas serológicas

No existen pruebas para la detección de anticuerpos en las abejas.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

No se dispone de ninguna vacuna.

AGRADECIMIENTOS

Ilustraciones de Karl Weiss, tomadas de Bienen-Pathologie, 1984. Reproducidas con el amable permiso del autor y de Ehrenwirth-Verlag, Munich (Alemania).

BIBLIOGRAFÍA

ALLEN M.F. & BALL B.V. (1993). The cultural characteristics and serological relationships of isolates of *Melissococcus pluton*. *J. Apic. Res.*, **32**, 80–88.

ARAI R., MIYOSHI-AKIYAMA T., OKUMURA K., MORINAGA Y., WU M., SUGIMURA Y., YOSHIYAMA M., OKURA M., KIRIKAE T. & TAKAMATSU D. (2014). Development of duplex PCR assay for detection and differentiation of typical and atypical *Melissococcus plutonius* strains. *J. Vet. Med. Sci.*, **76**, 491–498.

ARAI R., TOMINAGA K., WU M., OKURA M., ITO K., OKAMURA N., ONISHI H., OSAKI M., SUGIMURA Y., YOSHIYAMA M. & TAKAMATSU D. (2012). Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates. *PLoS One*, **7**, 1–10.

BAILEY L. (1960). The epizootiology of European foulbrood of the larval honey bee, *Apis mellifera* Linnaeus. *J. Insect Pathol.*, **2**, 67–83.

BAILEY L. (1984). A strain of *Melissococcus pluton* cultivable on chemically defined media. *FEMS Microbiol. Lett.*, **25**, 139–141.

BAILEY L. & BALL B.V. (1991). *Honey Bee Pathology*. Academic Press, London, UK, and New York, USA.

BAILEY L. & COLLINS M.D. (1982a). Taxonomic studies on *Streptococcus pluton*. *J. Appl. Bacteriol.*, **53**, 209–213.

1 [Laboratorios de Referencia - OMSA - Organización Mundial de Sanidad Animal \(woah.org\)](https://www.woah.org/)

- BAILEY L. & COLLINS M.D. (1982b). Reclassification of *Streptococcus pluton* (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton* nom. rev.; Comb. nov. *J. Appl. Bacteriol.*, **53**, 215–217.
- BAILEY L. & GIBBS A.J. (1962). Cultural characters of *Streptococcus pluton* and its differentiation from associated enterococci. *J. Gen. Microbiol.*, **28**, 385–391.
- BUDGE G.E., BARRETT B., JONES B., PIETRAVALLE S., MARRIS G., CHANTAWANNAKUL P., THWAITES R., HALL J., CUTHBERTSON A.G.S. & BROWN M.A. (2010). The occurrence of *Melissococcus plutonius* in healthy colonies of *Apis mellifera* and the efficacy of European foulbrood control measures. *J. Invertebr. Pathol.*, **105**, 164–170. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2010.06.004>
- DAINAT B., GROSSAR D., ECOFFEY B. & HALDEMANN C. (2018). Triplex real-time PCR method for the qualitative detection of European and American foulbrood in honeybee. *J. Microbiol. Methods*, **146**, 61–63. doi:10.1016/j.mimet.2018.01.018
- DE LEON-DOOR A.P., ROMO-CHACÓN A., RIOS-VELASCO C., ZAMUDIO-FLORES P.B., ORNELAS-PAZ J.J. & ACOSTA-MUÑOZ & C.H. (2018). Prevalence, typing and phylogenetic analysis of *Melissococcus plutonius* strains from bee colonies of the state of Chihuahua, Mexico. *J. Invertebr. Pathol.*, **159**, 71–77.
- DJORDJEVIC S.P., NOONE K., SMITH L. & HORNITZKY M.A.Z. (1998). Development of a semi-nested PCR assay for the specific detection of *Melissococcus pluton*. *J. Apic. Res.*, **37**, 165–174.
- DJUKIC M., ERLER S., LEIMBACH A., GROSSAR D., CHARRIÈRE J.D., GAUTHIER L., HARTKEN D., DIETRICH S., NACKE H., DANIEL R. & POEHLIN A. (2018). Comparative genomics and description of putative virulence factors of *Melissococcus plutonius*, the causative agent of European foulbrood disease in honey bees. *Genes (Basel)*, **9**, 1–20.
- FORSGRÉN E., BUDGE G.E., CHARRIÈRE J.-D. & HORNITZKY M.A.Z. (2013). Standard methods for European foulbrood research. *J. Apic. Res.*, **52**, 1–14. doi 10.3896/IBRA.152.1.12.
- GAGGIA F., BAFFONI L., STENICO V., ALBERONI D., BUGLIONE E., LILLI A., DI GIOIA D. & PORRINI C. (2015). Microbial investigation on honey bee larvae showing atypical symptoms of European foulbrood. *Bull. Insectol.*, **68**, 321–327.
- GOVAN V.A., BROZEL V., ALLSOPP M.H. & DAVISON S. (1998). A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1983–1985.
- HORNITZKY M.A.Z. & WILSON S.C. (1989). A system for the diagnosis of the major bacterial brood diseases of honeybees. *J. Apic. Res.*, **28**, 191–195.
- JONES D. (1975). A numerical taxonomic study of Coryneform and related bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **87**, 52–96.
- MCKEE B.A., DJORDJEVIC S.P., GOODMAN R.D. & HORNITZKY M.A. (2003). The detection of *Melissococcus pluton* in honey bees (*Apis mellifera*) and their products using a hemi-nested PCR. *Apidologie*, **34**, 19–27.
- MILBRATH M.O., FOWLER P.D., ABBAN S.K., LOPEZ D. & EVANS J.D. (2021). Validation of Diagnostic Methods for European Foulbrood on Commercial Honey Bee Colonies in the United States. *J. Insect Sci.*, **21**, 1–6, <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieab075>.
- NAKAMURA K., OKUMURA K., HARADA M., OKAMOTO M., OKURA M. & TAKAMATSU D. (2020). Different impacts of pMP19 on the virulence of *Melissococcus plutonius* strains with different genetic backgrounds. *Environ. Microbiol.* **22**, 2756–2770.
- OKAMOTO M., FURUYA H., SUGIMOTO I., KUSUMOTO M. & TAKAMATSU D. (2022). A novel multiplex PCR assay to detect and distinguish between different types of *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius*, and a survey of foulbrood pathogen contamination in Japanese honey. *J. Vet. Med. Sci.*, **84**, 390–399. doi: 10.1292/jvms.21-0629.
- PINNOCK D.E. & FEATHERSTONE N.E. (1984). Detection and quantification of *Melissococcus pluton* infection in honeybee colonies by means of enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Apic. Res.*, **23**, 168–170.
- ROETSCHI A., BERTHOUD H., KUHN R. & IMDORF A. (2008). Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation. *Apidologie*, **39**, 362–371.

RIVIERE M.P., RIBIERE M. & CHAUZAT M.P. (2013). Recent molecular biology methods for foulbrood and noseosis diagnosis. *Rev. Sci. Tech.*, **32**, 885–892. doi: 10.20506/rst.32.2.2207.

ROY C. & FRANCO S. (2021). Investigation of an atypical case of European foulbrood in France. *Vet. Rec. Case Rep.*, **9**:E45. <https://doi.org/10.1002/vrc2.45>.

SVA Report. (2020). Surveillance of infectious diseases in animals and humans in Sweden 2020, National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden. SVA:s rapportserie, **68**, 1654–7098.

TAKAMATSU D., MORINISHI K., ARAI R., SAKAMOTO A., OKURA M. & OSAKI M. (2014). Typing of *Melissococcus plutonius* isolated from European and Japanese honeybees suggests spread of sequence types across borders and between different *Apis* species. *Vet. Microbiol.*, **171**, 221–226.

WILSON K. (1990). Preparation of genomic DNA from bacteria. *In: Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Smith J.A., Seidman J.G. & Struhl K., eds. Greene Publishing Association and Wiley Interscience, New York, USA, 241–245.

WOOD S.C., CHALIFOUR J.C., KOZII I.V., MEDICI DE MATTOS I., KLEIN C.D., ZABRODSKI M.W., MOSHYNKY I., GUARNA M.M., WOLF VEIGA P., EPP T. & SIMKO E. (2020). *In Vitro* Effects of Pesticides on European Foulbrood in Honeybee Larvae. *Insects*, **11**, 252. <https://doi.org/10.3390/insects11040252>.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OMSA para la enfermedad de loque europea (infección de las abejas melíferas por *Melissococcus plutonius*) (puede consultarse la página web de la OMSA: <https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>).

Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OMSA 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 EUROPEA.
ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2023.