



**Agentes patógenos que afectan la cría de abejas melíferas (*Apis mellifera*): *Ascosphaera apis*,
Paenibacillus larvae, *Melissococcus plutonius***

Andres Felipe Guerrero Cardenas

Ivonne Catherine Rosas Martínez

Universidad Antonio Nariño

Programa de Medicina Veterinaria

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Popayán

2022

**Agentes patógenos que afectan la cría de abejas melíferas (*Apis mellifera*): *Ascosphaera apis*,
Paenibacillus larvae, *Melissococcus plutonius***

Andres Felipe Guerrero Cardenas

Ivonne Catherine Rosas Martínez

Trabajo presentado como requisito para optar al título de:

Médico Veterinario

Director (a):

Fredy Javier Angarita Alonso

Médico Veterinario y Zootecnista Esp, MV, PhD))

Línea de investigación:

Salud pública, bienestar animal

Universidad Antonio Nariño

Programa de Medicina Veterinaria

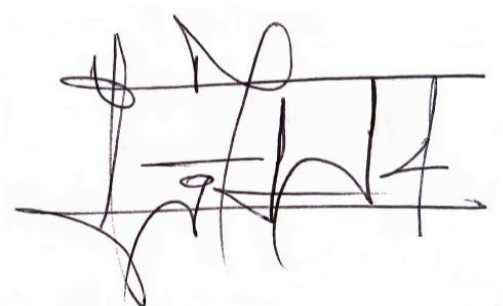
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Popayán

2022

Nota de aceptación:

La presente monografía ha sido aceptada por el Comité de Trabajo de Grado de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Antonio Nariño, sede Popayán, como uno de los requisitos para optar el título de Médico Veterinario.



Fredy Javier Angarita Alonso
Director Trabajo de Grado



Lida Waldina Mamian Ruiz
Jurado

Resumen

Las infecciones por *A. apis*, *P.larvae* y *M. plutonium* tienen un impacto importante en las comunidades de *Apis mellifera* tanto del punto de vista ambiental como económico. *Ascosphaera apis*, difundido globalmente, provoca la ascosferosis, también conocida como enfermedad de la tiza, una micosis invasiva que afecta a las larvas en desarrollo. Las condiciones ambientales como humedad y temperatura influyen en la diseminación de la infección. La virulencia está asociada al tipo de apareamiento y a factores genéticos tanto del hongo como de la abeja hospedera. *P. larvae* y *M. plutonium* infectan las larvas de las abejas siendo la actividad patogénica de estas bacterias muy intensa conduciendo a la destrucción de las colonias. La diseminación de la infección está influenciada por el comportamiento de las abejas dentro de la colmena. Si bien los mecanismos por medio de los cuales estos agentes patógenos ejercen su acción están bien establecidos, los procedimientos de diagnóstico adecuado a nivel de los apiarios todavía no están bien implementados. Es necesario establecer protocolos de rutina de diagnóstico temprano basados en técnicas de biología molecular para evitar que estas infecciones se desarrollen. Los avances de la biología molecular permitirán a corto plazo la identificación y distribución tanto de cepas de hongos como bacterias lo que permitirá un mejor control sanitario de los apiario y brindarán más información sobre el comportamiento de estas bacterias en términos de adaptación a distintos hábitats, así como de resistencia y susceptibilidad a los antibióticos.

Palabras claves: Abejas, Agar, Agente Patógenos, PCR

Abstract

Infections by *A. apis*, *P. larvae* and *M. plutonium* have a significant impact on *Apis mellifera* communities from both an environmental and economic point of view. *Ascospaera apis*, widespread globally, causes ascospherosis, also known as chalk disease, an invasive mycosis that affects developing larvae. Environmental conditions such as humidity and temperature influence the spread of infection. Virulence is associated with the type of mating and genetic factors of both the fungus and the host bee. *P. larvae* and *M. plutonium* infect bee larvae, and the pathogenic activity of these bacteria is very intense, leading to the destruction of the colonies. The spread of the infection is influenced by the behavior of the bees within the hive. Although the mechanisms through which these pathogenic agents exert their action are well established, adequate diagnostic procedures at the apiary level are not yet well implemented. It is necessary to establish routine protocols for early diagnosis based on molecular biology techniques to prevent these infections from developing. Advances in molecular biology will allow the identification and distribution of both fungal and bacterial strains in the short term, which will allow better sanitary control of apiaries and will provide more information on the behavior of these bacteria in terms of adaptation to different habitats as well as resistance and susceptibility to antibiotics.

Keywords: bees, agar, pathogens, PCR

Contenido

Introducción	7
<i>Ascospaera apis</i>	13
Transmisión de la infección	13
Factores que influyen en el desarrollo e la infección.....	15
Virulencia.....	17
<i>Paenibacillus larvae</i>	20
Fisiopatología de la infección	21
Identificación de cepas y diagnóstico	23
<i>Melissococcus plutonius</i>	28
Fisiopatología de la infección	28
Identificación de cepas y diagnóstico	29
Discusión	32
Conclusiones.	34

Introducción

En la actualidad hay alrededor 50 millones de colonias de abejas, en su mayoría de *Apis mellifera* que mantienen en todo el mundo una producción anual de miel de más de 600.000 toneladas. Es la especie mejor distribuida, encontrándose en Europa, Asia occidental y toda África, excepto en las zonas desérticas. Esta especie de abeja es superior a otras debido a que mantiene una reina prolífica, menos tendencia a enjambrar, temperamento suave, buena calidad de recolección de miel y protección contra enemigos excepto las avispas.

Las abejas melíferas no sólo son importantes por la miel que producen, sino que también son vitales como polinizadoras de cultivos agrícolas y hortícolas. De hecho, *Apis mellifera* se considera uno de los polinizadores más importantes de muchos cultivos agrícolas, así como plantas herbáceas. Las colonias de abejas además están asociadas con una gran diversidad de microorganismos importantes para los ecosistemas (Chand & Srivastava, 2019).

En los últimos años se han reportado graves pérdidas de colmenas de abejas y una disminución notable de la población de abejas melíferas en todo el mundo (Barrientos Calle & Agudelo Valencia, 2016; Cabañes, 2018; Ziegler et al., 2021). La disminución en la vitalidad y viabilidad de las colonias de abejas es multifactorial e incluye por una parte la aplicación de acaricidas, fungicidas, antibióticos y agroquímicos (He et al., 2021; Krainer et al., 2016; Suchail et al., 2000), pero también la desnutrición relacionada a alteraciones en la microbiota (Maes et al., 2016), los cambios ambientales (Becsi et al., 2021; Brodschneider et al., 2019) y la exposición a agentes patógenos (Hýbl et al., 2021; Tejerina & Benitez-Ahrendts, 2021; Zinatullina et al., 2018).

En este trabajo se realizó una revisión bibliográfica, sobre las características de la infección de las abejas por patógenos fúngicos, particularmente *Ascosphaera apis*, así como de patógenos bacterianos importantes como *Paenibacillus larvae* y *Melissococcus plutonius* los cuales afectan

particularmente las abejas melíferas que constituyen un valor ecológico y comercial importante en todo el mundo.

La revisión de la bibliografía se realizó con el apoyo de “bases de datos científicas internacionales y regionales como: <https://scihub.org/search/>; doarj.org; redalyc.org; scopus.com; researchgate.net; [google scholar.com](https://google.com/scholar/); scielo.org”.

Justificación

Resulta significativo analizar información orientada a establecer e identificar los agentes patógenos como *Ascosphaerae apis* (Asocosferosis), *Paenibacillus larvae* (Loque americana), *Melissococcus plotunius* (Loque europea). Teniendo en cuenta que las abejas desempeñan un papel importante en la polinización de plantas con flores determinando que es el principal polinizador en este tipo de sistemas es importante acotar que un tercio de la alimentación de la humanidad depende de la polinización de estos insectos, generando la conservación y preservación de este material vegetal por lo tanto las abejas juegan un rol importante para la protección ambiental, la biodiversidad y regeneración del planeta.

Los agentes patógenos causantes de enfermedades en las abejas *Apis mellifera*, reportan influencias negativas en la productividad de las colonias y en la supervivencia de las poblaciones de estos insectos.

Por otra parte, los resultados de esta investigación aportaran a reconocer de manera más eficiente estos patógenos en la comunidad apiaria y tener claridad de un mejor tratamiento.

Objetivos

Objetivo General

Realizar una revisión literaria de los agentes bacterianos y micóticos que se presentan en la abeja *Apis mellifera* en Colombia para determinar su tratamiento.

Objetivos Específicos

- Identificar las condiciones y comportamientos que pueden diseminar la enfermedad por *Ascosphaera Apis*.
- Reconocer los signos clínicos de la enfermedad causada por agentes bacterianos (*P.larvae* y *M plutonium*)
- Reconocer los diferentes cultivos de diagnóstico y determinar el más apropiado para obtener diagnósticos tempranos para Loque Americana (*P.larvae*)
- Identificar los posibles tratamientos teniendo en cuenta los agentes infecciosos causantes de las enfermedades de Loque Americana, Loque Europea y Cria enyesada.

Metodología

Para la presente monografía se toma como punto de partida la información que se puede recopilar para identificar las características de agentes infecciosos (*Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae* y *Melissococcus plutonius*) por lo cual la presente revisión bibliográfica fue sustentada en artículos de revistas científicas indexadas, tesis de universidades, revisión bibliográfica de base de datos de artículos científicos disponibles en la red usando como buscador Google Académico y base datos de universidades extranjeras.

Como método para la búsqueda y selección de las respectivas referencias bibliográficas se efectuó una búsqueda sistemática y objetiva en las bases de datos mencionadas utilizando términos como: Virus, Virulencia, Abejas melíferas, *Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*. Los artículos arrojados fueron seleccionados por el título tomando en cuenta la pregunta de investigación, para posterior a esto realizar un filtro mediante la información suministrada en el abstract teniendo en cuenta el direccionamiento de la investigación bibliográfica realizada.

	CyberLeninka es una biblioteca electrónica científica construida sobre el paradigma de la ciencia abierta, cuyas principales tareas son popularizar la ciencia y la actividad científica, el control público sobre la calidad de las publicaciones científicas, desarrollar la investigación interdisciplinaria, un instituto moderno de revisión científica, aumentar la cita de la ciencia rusa y construir una infraestructura de conocimiento.
	Pionero en la publicación académica de acceso abierto, MDPI ha apoyado a las comunidades académicas desde 1996. Con sede en Basilea, Suiza, MDPI tiene la misión de fomentar el intercambio científico abierto en todas sus formas, en todas las disciplinas.
	Taylor & Francis Group es una empresa británica que publica libros y revistas académicas. Es una división de Informa plc, una compañía editorial y organizadora profesional de conferencias radicada en el Reino Unido.
	La Sociedad de Química y Toxicología Ambiental (SETAC) es una organización profesional y global sin fines de lucro, que está compuesta por alrededor de seis mil miembros e instituciones dedicadas al estudio, análisis y resolución de problemas ambientales, gestión y regulación de los recursos naturales, y educación, investigación y desarrollo sobre problemáticas ambientales.
	J-STAGE es una plataforma para publicaciones académicas en Japón. Es desarrollado y administrado por la Agencia Japonesa de Ciencia y Tecnología (JST).
	Elsevier, Science Direct, en el cual se clasificaron y seleccionaron para la revisión. Elsevier es una empresa de análisis de información global que asiste a instituciones y profesionales en el progreso de la ciencia, cuidados avanzados en materia de salud, así como mejorar la ejecución de los mismos para el beneficio de la humanidad.
	SciELO Data es un repositorio multidisciplinario para depositar, preservar y difundir datos de investigación de artículos enviados, aprobados para publicación o ya publicados en revistas de la Red SciELO o depositados en SciELO Preprints.
	Semantic Scholar es una herramienta de investigación gratuita impulsada por LA para la literatura científica, con sede en el instituto Allen para la IA.
	Proporcionar a los investigadores acceso a millones de documentos científicos de revistas, libros, series, protocolos, obras de referencia y actas.
	Universidad nacional de la plata
	Cabi La Base de Datos de Ciencia Animal es una fuente organizada de información que se actualiza regularmente y de fácil acceso y gestión. Actualizada semanalmente, la base de datos proporciona información bibliográfica y resúmenes para todos los aspectos de la ciencia animal y la medicina veterinaria, incluida la nutrición, la cría, la genética, la ciencia y tecnología lácteas, la biotecnología y la producción animal.
	Universidad nacional abierta y a distancia UAND
	Royal Society Open Science es una revista abierta que publica investigaciones originales de alta calidad en toda la gama de la ciencia sobre la base de una revisión objetiva por pares. La revista cubre toda la gama de ciencias y matemáticas y permite a la Sociedad publicar todo el trabajo de alta calidad que recibe sin las restricciones habituales sobre el alcance, la duración o el impacto.
	UAB universidad autónoma de Barcelona

Fuente: propia del autor

Ascospaera Apis

Entre los principales agentes patogénicos que afectan las colonias de abejas se encuentra el hongo *Ascospaera apis*, difundido en los últimos años en varios países en todo el mundo, provocando ascosferosis, también conocida como enfermedad de la tiza. La infección por *Ascospaera apis* se caracteriza por ser una micosis invasiva que afecta a las larvas en desarrollo. Se genera cuando las larvas ingieren las esporas del hongo con su alimento. Las hifas se desarrollan en el intestino medio, alcanzando la superficie después del sellado de las células, generando una condición de microaerofilia, que permite el crecimiento de hongos, produciendo más tarde cadáveres momificados con la apariencia de tiza (Castagnino et al., 2020; Tejerina & Benitez-Ahrendts, 2021).

Transmisión De La Infección

En el curso del tiempo, *Ascospaera apis* se ha adaptado estrechamente a las abejas melíferas aunque solo puede invadir la cría y no abejas adultas. Las esporas de *A. apis* no pueden germinar en la cutícula de la larva, por lo tanto, la infección comienza cuando las larvas ingieren las esporas con el alimento (Castagnino et al., 2020). Los modos de infección larvaria distinguen a esta especie de otros hongos entomopatógenos que si son capaces de penetrar la cutícula del insecto sin la necesidad de ingestión (Evison, 2015). Por esta razón, no es posible utilizar los métodos conocidos para estudiar hongos entomopatógenos comunes (Evison, 2015; Evison & Jensen, 2018). Después de la ingestión, las esporas de *A. apis* necesitan elevadas concentraciones de CO₂ para comenzar la germinación (Heath & Gaze, 1987). El ambiente anaeróbico del intestino de las larvas en donde los tejidos son una fuente de CO₂ es vital para este proceso, siendo la temperatura óptima para la germinación de

35°C (Mráz et al., 2021). Después de su activación, las esporas se hinchan y crean tubos germinales que se convierten en hifas dicotómicas. El micelio luego penetra a través de la membrana peritrófica de las larvas a la cavidad del cuerpo y crece hasta el extremo posterior, donde rompe la barrera. Posteriormente se generan quistes de esporas (ascomas). Las ascosporas que son las únicas unidades infecciosas que causan la enfermedad de la tiza, se forman en bolas de esporas que se localizan en quistes resistentes. Las esporas contienen dos núcleos; el más grande se encuentra en el centro y el segundo más pequeño está situado cerca del extremo de la espora (Mráz et al., 2021). La pared de las esporas está formada por tres capas y contiene quitina como componente principal, lo que ayuda a que las ascosporas permanezcan viable durante muchos años (Evison, 2015; Mráz et al., 2021).

Entre los primeros signos clínicos de la enfermedad se encuentra la presencia de larvas muertas que se encuentran cubiertas por una pelusa blanca de moho y por lo general se encuentran hinchadas (Mráz et al., 2021). Después de un tiempo, se encogen y se vuelven negras/grises o blancas, dependiendo de la presencia de estructuras reproductivas (Heath, 2015). Al final del ciclo de desarrollo del hongo, las larvas se momifican (Heath, 2015). La tiza es reconocida fácilmente por la detección visual de las crías de abejas momificadas, conocidas como crías de yeso o momias de yeso, en el tablero inferior de las colmenas, así como en celdas destapadas (Mráz et al., 2021). Sin embargo, un bajo nivel de infestación de esta enfermedad (menos del 12% de infección) no es reconocible porque las abejas obreras eliminan la cría de abejas infectadas (Jong, 2015).

Factores Que Influyen En El Desarrollo Y La Infección

La enfermedad de la tiza se considera una enfermedad relacionada con el estrés, lo que podría estar influenciando su mayor incidencia en los últimos años (Evison, 2015; Mráz et al., 2021). Las abejas melíferas se estresan por muchos factores ambientales que aún deben ser identificados (Mráz et al., 2021). La tiza es considerada una enfermedad crónica porque persiste en las colmenas durante mucho tiempo y puede brotar en cualquier momento, dependiendo de las condiciones, lo que hace que esta enfermedad sea más peligrosa (Vojvodic et al., 2011). También se ha observado que la enfermedad de la tiza es más frecuente en condiciones climáticas húmedas, bajo temperaturas fluctuantes, o cuando las colonias de abejas se alimentan en exceso con jarabe de azúcar (Mráz et al., 2021; Vojvodic et al., 2011). Esta situación puede ocurrir cuando hay una gran cantidad de larvas en los panales y un número relativamente pequeño de obreras abejas cuidando de la cría, las cuales calientan el espacio hasta una temperatura cercana a la temperatura óptima de germinación de las esporas de 35 °C (Mráz et al., 2021).

Hay algunos indicios de que la prevalencia de este hongo, que es uno de los más contagiosos y patógenos destructivos de la cría de abejas, está aumentando (Evison & Jensen, 2018). Por ejemplo, en algunos lugares, como el norte de Tailandia y China, en donde predominan las especies de *Apis cerana*, que son poco susceptibles a patógenos fúngicos, hay una mayor incidencia de *A. apis* (Chen et al., 2018). Este hecho contribuye a la prevalencia mundial de y se suma a la importancia de la enfermedad. Aunque este hongo es fatal para los criaderos de las larvas abejas, el crecimiento de larvas en colonias individuales rara vez causa pérdidas. Sin embargo, desde el punto de vista comercial, provoca importantes pérdidas en el número de abejas y la productividad de las colonias lo que lo convierte en una enfermedad importante (Evison & Jensen, 2018).

No existe un agente terapéutico registrado contra la enfermedad de la tiza y es difícil involucrar o encontrar un agente de control efectivo a pesar de los resultados prometedores con aceites esenciales de plantas que se han reportado recientemente (Hýbl et al., 2021). Así, por estas razones, es necesario entender el ciclo de vida y la patogenia de *A. apis*. Desde este punto de vista, la optimización de métodos de cultivo y el establecimiento de cultivos *in vitro* estables y eficaces con un alto rendimiento de ascosporas son cruciales. Los avances de la biología molecular también pueden aportar evidencias importantes sobre la filogenia y las características patogénicas de estos hongos que faciliten la identificación de blancos terapéuticos.

Es importante considerar que los hongos han desarrollado varias estrategias especializadas para superar los mecanismos de defensa de los insectos y alcanzar los nutrientes. Cuando invaden un tipo apropiado de insecto, el huésped les proporciona todo el espectro de nutrientes que necesitan.

El tipo de alimento de las abejas influye significativamente en la germinación, crecimiento, la producción de enzimas y por lo tanto también en la virulencia de los hongos entomopatógenos. Trabajos experimentales han determinado que *A. apis* crece más rápido en medios ricos en azúcar como SDA, YGPSA, MEA, PDA-Y o PDA-BB. Mientras que muestran un crecimiento más lento en medios sin azúcar como CDA y Oxoid ISA (Mráz et al., 2021). La dependencia del crecimiento del tipo de azúcares de *A. apis* se debe a que puede utilizar fácilmente arabinosa, dextrosa, manosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, trehalosa, glucosa, fructosa e incluso dextrina y almidón. Por el contrario, los medios ricos en grasas y nitrógeno no son adecuados para el crecimiento de *A. apis* (Huber, 1958).

La determinación de la temperatura óptima para el crecimiento de *A. apis* ha arrojado resultados diferentes. Algunos trabajos han determinado que la temperatura óptima para el cultivo de *A. apis* en medios artificiales de uso común es de 30 °C (Mráz et al., 2021). Esta podría ser una de las razones por

las que *A. apis* se propaga más rápido en colonias de abejas débiles, que no pueden mantener una temperatura alta y estable en las colmenas. Sin embargo, otros autores han reportado tasas más altas de infección en crías de abejas mantenidas *in vitro* a 25 °C (77,62 %) que a 30 °C (15,31 %), siendo observada la tasa más baja a 35 °C (2,22 %) (Flores et al., 1996). Estas diferencias entre el crecimiento de *A. apis* en medios artificiales y en condiciones naturales probablemente se deban a la baja temperatura para el desarrollo de la cría de abejas. La temperatura inferior a la óptima reduce la actividad de los procesos fisiológicos y contribuye a un metabolismo más lento de la cría de abejas, lo que hace que la cría de abejas sea más susceptible a los patógenos (Medrzycki et al., 2010). Sin embargo, debido a que en condiciones naturales *A. apis* puede crecer en un amplio rango de temperatura, desde 22 °C hasta 45 °C (Mráz et al., 2021), las condiciones óptimas de crecimiento parecen depender de una cepa en particular y del área de su ocurrencia.

Virulencia

Otro factor importante a considerar es la virulencia de distintas cepas de este hongo. Se ha reportado que la tasa de crecimiento según los tipos de apareamiento de *A. apis*, determina el grado de virulencia. Su importancia se explica por el modelo de evolución de super-infección en el que las cepas no cooperan sino que compiten entre sí (Evison, 2015). Si solo hay un parásito que invade un hospedador, puede explotar completamente los nutrientes del hospedador debido a la ausencia de competencia. Sin embargo, si el hospedador es atacado por más parásitos, lo cual es muy común en la naturaleza, incluso con *A. apis*, es muy probable que los parásitos menos virulentos sean superados o suprimidos por los de crecimiento más rápido (Evison, 2015). Eso conduce a la selección de cepas más virulentas (Samuel Alizon et al., 2013), asumiendo una alta capacidad de

transmisión (S Alizon et al., 2009). Se ha reportado que las cepas de *A. apis* más virulentas pueden tener una ventaja evolutiva. De hecho, se ha observado un aumento de la virulencia tras la co-infección artificial por varias cepas en tres generaciones (Evison, 2015). Algunas de las líneas replicadas del parásito incluso desaparecieron. El modelo de super-infección por *A. apis* también ha sido confirmado por Klinger et al.,(2015) que probó la virulencia de tres especies en una infección mixta. El aumento de la virulencia a menudo conduce a una disminución de la aptitud del parásito debido a una muerte más rápida del hospedador y a una menor cantidad de nutrientes (Alizon et al., 2009). Es probable que, después de algún tiempo, solo permanezcan en un área las cepas más adaptadas al hospedador .y en ese caso las cepas de muy alta o baja virulencia desaparecerían. Una excepción sería, por ejemplo, una especie heterotálica, donde se necesitan dos tipos de apareamiento opuestos para asegurar la reproducción. En este caso, incluso puede haber una ventaja para un tipo de apareamiento menos virulento y menos abundante (Buckling & Brockhurst, 2008). La ventaja evolutiva de los tipos de apareamiento de crecimiento más lento es una mayor competitividad en situaciones específicas; por ejemplo, pueden explotar mejor las fuentes de nutrientes deficientes debido a su lento crecimiento. Por el contrario, un tipo de apareamiento más virulento necesita más nutrientes para sustentar su crecimiento más rápido. De hecho, la evidencia indica que solo en medios pobres en nutrientes (CDA y Oxoid ISA) el tipo de apareamiento (+) crece más rápido que el tipo de apareamiento (-) (Mráz et al., 2021). Otra ventaja radica en la baja limitación de reproducción porque un tipo de apareamiento de crecimiento más rápido probablemente sea más abundante. Eso significa que es más fácil aparearse y sobrevivir en un área determinada.

Otro factor que influye en la virulencia-resistencia a esta infección es la variabilidad genética. En este sentido algunos trabajos han demostrado la variación en la virulencia entre distintas cepas de *A.*

apis. Más aun, diferentes cepas del hongo interactúan de manera diferente con el hospedador determinando la ausencia o presencia de la enfermedad de la tiza así como su propagación (Lee et al., 2013). Sin embargo trabajos recientes llevados a cabo en apiarios australianos para investigar la variación genética de *A. apis* y las condiciones a nivel de colonia y apiario, para identificar si una cepa emergente más virulenta es responsable de la prevalencia y de la enfermedad, reportaron resultados diferentes. En este trabajo se identificaron seis cepas genéticamente distintas de *A. apis*, cuatro reportadas en otros lugares y dos exclusivas de Australia. Se encontró que las colonias y las larvas individuales estaban infectadas con múltiples cepas de *A. apis*. No se observó que las cepas individuales, las combinaciones de cepas o las características obvias de la colonia o del apiario tuviesen un valor predictivo de los niveles de infección de la colmena. Estos resultados sugieren que el genotipo del hospedador que le confiere la capacidad de resistencia juega un papel importante, lo cual debe ser estudiado con mayor profundidad (Gerdtts et al., 2021).

Tratamiento

Paenibacillus Larvae

La “Loque Americana” está considerada como una de las enfermedades bacterianas más graves que se han observado en las larvas de *A. mellifera*, presentando además una amplia distribución en el mundo (Arrivillaga, 2021). Esta patología es causada por la bacteria *Paenibacillus larvae* (*P. larvae*). Se caracteriza por ser una bacteria Gram positiva flagelada. La forma infectante de este patógeno es por endosporas altamente resistentes. Los signos clínicos de la afección se presentan en la etapa de pupa aunque la bacteria en realidad infecta las larvas (Fünfhaus et al., 2018). La actividad patogénica de esta bacteria es muy intensa conduciendo a la destrucción de las colonias de abejas (Fünfhaus et al., 2018). La fase infectante comienza cuando las esporas son ingeridas con el alimento, particularmente miel, polen y jalea real los cuales son proporcionados constantemente por las abejas nodrizas a las larvas (Gillard et al., 2008). Ha sido reportado que las primeras 36 horas después de la eclosión del huevo son cruciales para la susceptibilidad de las larvas de las abejas melíferas (Arrivillaga, 2021). Esta susceptibilidad a la infección disminuye en las larvas de mayor edad requiriéndose elevadas dosis de bacterias para el desarrollo de la infección mientras que las abejas adultas no son afectadas. Así, evidencias experimentales han mostrado que la dosis letal media es significativamente menor para larvas de 24-48 horas de edad comparada con la dosis que se necesita para matar larvas de más de 2 días (Arrivillaga, 2021) Entre los factores que influyen la relación dosis/mortalidad, se encuentran la virulencia de la cepa bacteriana y factores intrínsecos de origen genético en las abejas infectadas.

Dentro del hospedador, en el intestino de las larvas, ocurre la germinación de las esporas infectantes, que posteriormente penetran la “membrana peritrófica” hasta alcanzar la hemolinfa en donde ocurre el proceso de multiplicación (Fünfhaus et al., 2018). La causa de la muerte de las larvas es una

infección generalizada. Posteriormente, despojos larvarios son digeridos por las bacterianas vegetativas. después del proceso de esporulación las bacterias transforman el material de origen larvario en una estructura gomosa que se transforma a su vez en escamas secas que constituyen un reservorio de esporas de *P. larvae* (Fünfhaus et al., 2018) .

La infección por esta bacteria causa grandes pérdidas económicas a la industria de la apicultura por lo que ha sido considerada como una enfermedad de interés comercial por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Con excepción de la región central africana y de la india en donde no hay reportes de la enfermedad, este patógeno se encuentra distribuido en todo el mundo. En particular en América latina se ha reportado en varios países incluyendo Uruguay, Colombia, Ecuador, Perú, México, Cuba, Belice, Haití, Bermudas, Jamaica, Bahamas, Costa Rica, Guatemala, Nicaragua, Panamá, Chile y Argentina (Arrivillaga, 2021).

Fisiopatología De La Infección

Las evidencias más resaltantes de la presencia de este patógeno es la forma en que se presentan en las colonias, generalmente celdas vacías alternadas con celdas con crías que pueden estar “operculadas o desoperculadas” (Arrivillaga, 2021). “Los opérculos se presentan oscuros, hundidos, a menudo perforados y, al introducir un palillo en el interior de las celdas, se observa que la pupa se ha transformado en un “material pegajoso”, que se estira más de 2,5”(Arrivillaga, 2021, p.14). Consecuentemente, las pupas que son infectadas por las bacterias se transformarán en escamas que se disponen extendidas y firmemente adheridas en toda la celda. Una característica relevante es el olor a pegamento de carpintero que despiden las colonias afectadas. Estas características

constituyen el diagnóstico inicial de la presencia de la infección (Gillard et al., 2008). Posteriormente se debe realizar el diagnóstico bacteriológico que incluye el aislamiento e identificación de las bacterias en el material proveniente de las colonias infectadas. Hoy en día se utilizan técnicas de biología molecular como el PCR en tiempo real para la identificación de las cepas de bacterias infectantes (Andrade et al., 2019; Martínez et al., 2010).

Las esporas de *P. larvae* son extremadamente resistentes, con una viabilidad de hasta mayor de 20 años tanto en el campo como en la miel y en el material apícola, favoreciendo la diseminación de la infección lo que constituye un problema para el control de la misma (Jeliński, 2003). La resistencia de las esporas está relacionada con su estructura la cual les permite resistir al efecto de agentes desinfectantes (Arrivillaga, 2021).

La dinámica de la actividad de las colmenas es un punto crucial para la diseminación de la infección. Dentro de sus actividades, las abejas limpiadoras utilizan sus mandíbulas y maxilas para eliminar tanto el material viscoso como el escamoso de las celdas de la colmena. Esa acción se traduce en la infección con esporas de la bacteria de las estructuras bucales de las abejas. El proceso de socialización de las abejas que requiere una serie de actividades entre ellas las de servir de nodrizas para la alimentación de las larvas. El alimento para las larvas de mayor tamaño está compuesto por una mezcla de miel, polen y saliva y el de las larvas más pequeñas de jalea real producida en las abejas por las glándulas hipo faríngeas. Por otra parte, las abejas recolectoras suplen las colmenas con néctar o polen, el cual es recolectado por las abejas obreras que lo depositan en las celdas. Cuando hay una infección con *P. larvae* estos procesos diseminan la infección desde las abejas limpiadoras que se infectan con las esporas de las escamas, que luego al ejercer de nodrizas, distribuyen las esporas en el alimento de las larvas (Mutinelli, 2011).

Una vez que las colonias están infectadas con la bacteria, las esporas se pueden diseminar también en los enjambres debido al tráfico normal de las abejas dentro del enjambre. Así el intercambio las sustancias alimenticias y otros materiales dentro de la colmena determinan la multiplicación y diseminación de la infección. Si bien, una colonia enferma se puede diagnosticar con la presencia de signos clínicos, una gran cantidad de colonias pueden albergar la bacteria de forma asintomática. De ahí la importancia de la utilización de técnicas de biología molecular para su diagnóstico (Andrade et al., 2019).

Identificación De Cepas Y Diagnóstico

En la última década, se ha logrado un progreso considerable en la comprensión y reclasificación taxonómica del agente causal, así como en el diagnóstico de esta infección. Los métodos tradicionales, como el reconocimiento de los síntomas clínicos típicos de la infección, el cultivo de larvas de *P. larvae* a partir de crías enfermas así como la microscopía, han proporcionado medios eficaces y económicos para diagnosticar la enfermedad. Además, en los últimos años ha habido un gran avance en la detección de larvas infectadas, utilizando técnicas moleculares, técnicas de inmunoensayo así como técnicas avanzadas de cultivo lo que ha proporcionado una gama más amplia de metodologías para un diagnóstico eficiente.

En 100 años de esfuerzos para cultivar *P. larvae*, se ha logrado un progreso considerable en el desarrollo de medios que promuevan la germinación y el crecimiento de esporas (De Graaf et al., 2006). Con el tiempo, se desarrollaron o adaptaron nuevos medios de cultivo para su uso en el diagnóstico: agar J (o medio J), agar de infusión de cerebro y corazón suplementado con tiamina, caldo Mueller-

Hinton, extracto de levadura, agar fosfato de potasio, glucosa y piruvato (MYPGP), agar sangre Columbia, agar sangre de carnero y agar larvae *Paenibacillus* (PLA) Este medio ofrece la ventaja adicional de que se inhiben la mayoría de los microorganismos normalmente presentes en la colmena y en los productos apícolas. Además, permite la incubación en aire, mientras que los medios prescritos anteriormente a menudo requerían incubación bajo CO₂ (De Graaf et al., 2006).

El primer ensayo de PCR para la identificación de *P. larvae* fue desarrollado en 1999 y se basó en el gen 16S rRNA. Este gen de las bacterias se utiliza para estudios filogenéticos y de detección de bacterias ya que su secuencia está altamente conservada entre especies tanto de bacterias como de arqueas (Martínez et al., 2010). Posteriormente se mejoró la especificidad de la técnica y se proporcionó un protocolo simplificado para el análisis inmediato de restos larvarios. Hoy en día se utilizan técnicas de PCR en tiempo real para el análisis directo de muestras de miel y colmena (Martínez et al., 2010). Esta prueba es extremadamente sensible puede identificar niveles de *P. larvae* que están por debajo de los que probablemente sean importantes para la enfermedad.

La utilización de la técnica de PCR de elemento repetitivo (rep-PCR) y los cebadores ERIC1R-ERIC2 (Eric: consenso intergénico repetitivo enterobacteriano) han permitido diferenciar cuatro genotipos distintos en estas bacterias (ERIC I, II, III and IV) (Fünfhaus et al., 2018). Estos genotipos se relacionan con diferencias fenotípicas en cuanto a morfología de la colonia y de las esporas, diferencias en la forma de metabolizar las fuentes de carbono y también en cuanto a patrones de virulencia (Fünfhaus et al., 2018). En experimentos de exposición se ha podido detectar que las cepas correspondientes a los genotipos de ERIC II, III y IV son muy virulentas contra las larvas causando rápidamente la muerte. De hecho la muerte de estas larvas ocurre a lo máximo en un plazo de 7 días (De Graaf et al., 2013). Solo una proporción pequeña de las larvas fenece tras la operculación de la celda, lo que se relaciona con los signos clínicos descritos para esta enfermedad

tales como la fase pegajosa y la aparición de escamas. En cambio, aquellas larvas que presentan el genotipo ERIC I mueren alrededor de los 12 días por lo que este genotipo se considera menos virulento. Estudios epidemiológicos han reportado con frecuencia que solo cepas relacionadas a los genotipos ERIC I y ERIC II se aíslan de colonias infectadas con *P.larvae*. El más frecuente es el genotipo ERIC I mientras que la ocurrencia del genotipo ERIC II es mucho menor, aunque ambos se distribuyen de forma global. En el campo en las últimas décadas no se han identificado cepas asociadas a los genotipos ERIC III y IV. Sólo se cuenta con algunas cepas de colección en cultivos de laboratorio (De Graaf et al., 2013). Es importante saber que los perfiles de huella genética obtenidos mediante electroforesis del ADN amplificado por rep-PCR no son reproducibles entre laboratorios, por lo que siempre es necesario contar con cepas de referencia que estén debidamente tipificadas para potenciar la discriminación entre cepas. Para este propósito se necesita, complementar el análisis de ERIC con el uso de otros cebadores (Graaf et al., 2013). En este sentido hoy en día se dispone de varias técnicas de huellas dactilares de ADN con fines epidemiológicos o taxonómicos entre ellas RFLP (Fragmentos de restricción de Longitud Polimórfica) ARDRA (análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado), RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar), AFLP (Análisis de longitud de fragmentos amplificados), PFGE (electroforesis en gel de campo pulsado y genotipado basado en PCR usando cebadores correspondientes a motivos conservados en REP (secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas) aparte de ERIC ((De Graaf et al., 2006; De Graaf et al., 2013). El uso estas técnicas ha permitido diferenciar cuatro patrones distintivos de *P. Larvae* denominados A, B, C, D (De Graaf et al., 2013).

Un ejemplo de estos avances tecnológicos en el diagnóstico y tipificación de estas bacterias en los apiarios lo constituye un trabajo reciente en donde se aplicaron técnicas de biología molecular avanzadas

para detectar la presencia de este patógeno en Sud África, en donde no se había confirmado la presencia de este patógeno ni de las cepas circulantes (Hristov et al., 2021). Para resolver el problema se realizaron estudios del genotipado de aislamientos de *P. larvae* utilizando marcadores de huellas dactilares de elementos repetitivos (rep-PCR) y tecnología de micro chips (Hristov et al., 2021). Un total de 71 muestras de cría, miel y cera fueron recolectadas de manera oportuna en diferentes localidades en Sudáfrica. Veintitrés muestras dieron positivo para *P. larvae* (32,4%). La toma de huellas dactilares de rep-PCR de diagnóstico con los cebadores ERIC, BOX A1R y MBO REP1 encontró que todos los aislamientos de *P. larvae* en Sudáfrica correspondían al genotipo ERIC I. Estos resultados concuerdan con la prevalencia mundial del genotipo ERIC I entre las colonias de abejas melíferas infectadas con *P. larvae* (Hristov et al., 2021).

Tratamiento

Durante décadas, el antibiótico de elección para el control de la Loque Americana ha sido la oxitetraciclina lo que generó la aparición de cepas del patógeno resistentes en distintas regiones geográficas de Argentina, EUA y Canadá (F. Reynaldi, 2009). La dosis recomendada para dicho medicamento debe ser administrada a razón de 50-80 mg/l de jarabe concentrado de sacarosa por colmena, otro tipo de medicamentos que actúan eficientemente son las sulfamidas. Dentro de estos tenemos las denominadas trisulfas (sulfacetamida, sulfadiazina, sulfatiazol) el sulfatiazol sódico y las sulfamidas potenciadas como sulfametoxazol + trimetoprina. El sulfatiazol sódico suprime eficazmente la Loque Americana cuando una colonia recibe 100 mg/l en jarabe concentrado de sacarosa el uso continuo e indiscriminado puede favorecer el desarrollo de resistencia. Para disminuir este problema se puede alternar antibióticos usando un año sulfamidas y al siguiente oxitetraciclina (Juan Carlos, 2016).

Distintos antibióticos han demostrado efectos positivos para el control de la Loque Americana, como la lincomicina, la tilosina recientemente aprobada para su uso en Argentina o la tilmicosina un macrólido sintetizado a partir de la tilosina y desarrollado para ser usado en medicina veterinaria, que presenta buena actividad contra microorganismos Gram positivos, incluso contra *P. larvae*. Entendiendo que la tilmicosina puede ser una alternativa para el control de la Loque Americana en campo (SENASA, 2008).

Melissococcus Plutonium

Otra enfermedad bacteriana importante que afecta la cría de abejas es la “Loque Europea”, la cual es ocasionada por la bacteria *Melissococcus plutonium*. Se trata de una bacteria Gram positiva que disminuye significativamente la tasa poblacional de las abejas. La severidad de la infección se debe a múltiples factores que varían desde las destrezas en la práctica de la apicultura, el uso inadecuado de pesticidas, el estado nutricional de las larvas y a la infección simultánea de las abejas con otros agentes patógenos (Mantilla Salazar, 2012).

Fisiopatología De La Infección

El proceso de infestación se inicia a través de la ingesta de alimentos contaminados por las abejas. La bacteria alcanza el intestino medio de la abeja en donde debido al proceso de multiplicación causa daño fisiológico a nivel de las células epiteliales así como de la matriz peritrófica (Mantilla Salazar, 2012). Se ha relacionado también además la desnutrición de las larvas con esta infección debido a que la bacteria compite por los nutrientes (Mantilla Salazar, 2012).

Dentro de las celdas, en las colonias, las larvas infectadas se distribuyen anormalmente, van paulatinamente cambiando de color que varía desde el blanco a amarillo y luego a marrón hasta alcanzar la fase de descomposición final. Desde el punto de vista de la mortalidad de las larvas la infección con *M. plutonium*, es bastante relevante. Sin embargo hay muy poca información sobre los mecanismos fisiopatológicos de esta y los factores de virulencia de este agente patógeno (Pérez-Ordóñez et al., 2021a). Se ha planteado que los factores de virulencia entre distintas cepas se deben

a diferencias en la estructura genotípica de las bacterias. Este factor es clave en el desarrollo y severidad de la patogenia. Por lo tanto la epidemiología molecular de la bacteria y su relación con la severidad de los procesos fisiopatológicos que produce podrían ser importantes para el diagnóstico oportuno de esta enfermedad y para el control en los apiarios (Pérez-Ordóñez et al., 2021a).

Identificación De Cepas Y Diagnóstico

Estudios de secuenciación de genomas facilitó el desarrollo de nuevos métodos para tipificar bacterias tales como “tipificación multilocus de secuencias [Multi Locus Sequence Typing (MLST)] y análisis multilocus de repeticiones en tándem de número variable [Multiple Locus Variable Number Tandem Repeats (VNTR) Analysis (MLVA)]” han demostrado que la virulencia entre distintas cepas de *M. plutonius* se debe a variaciones en el tipo de complejo clonal que determina el factor de virulencia (De Graaf et al., 2013). El primer estudio *in vitro* con larvas de *Apis mellifera* infectadas se realizó con una dieta artificial incluyendo los aislados atípicos y típicos de *M. plutonius* a una concentración final de 10⁶ UFC/ml. Estos experimentos mostraron aislados atípicos del complejo clonal 12 (CC12) que mostró ser altamente virulento produciendo una mortalidad larvaria superior al 94% a los seis días post-infección mientras que el complejo C3 típico, más expandido no indujo este efecto (Pérez-Ordóñez et al., 2021b). Por otro lado, se han llevado a cabo estudios histológicos de la patogenia de la infección intestinal de larvas de abejas melíferas con *M. plutonius* LMG20360, que contiene un complejo clonal poco virulento CC13 (Aupperle-Lellbach et al., 2019). Tres días después de la infección, se detectaron bacterias ingeridas en el intestino medio. Desde el día cinco después de la infección, la ingesta estuvo casi

completamente infiltrada por bacterias, pero la matriz peritrófica y el epitelio intestinal permanecieron intactos hasta el día 15 después de la infección. La evaluación del desarrollo de las larvas reveló que el crecimiento de las larvas no fue significativamente diferente en las larvas infectadas en comparación con los animales control no infectados hasta el día cinco después de la infección. Sin embargo, desde el día siete después de la infección, las larvas infectadas eran significativamente más pequeñas que las larvas control no infectadas pero presentaron una tasa de viabilidad alta (poca mortalidad)(Aupperle-Lellbach et al., 2019). Esto quiere decir que las larvas infectadas con la cepa de baja virulencia de *M. plutonius* probablemente solo sufrieron una falta de nutrientes que resultó en un crecimiento reducido una vez que la bacteria comenzó a proliferar masivamente. Sin embargo, la bacteria no atacó ni destruyó la pared intestinal, lo que confirma la opinión original sobre el carácter no invasivo de las infecciones más prevalentes por *M. plutonius*.

La virulencia y resistencia tanto de *Paenibacillus larvae* como de *Melissococcus plutonius* a los desinfectantes difiere según los genotipos/fenotipos de las cepas por lo que la discriminación de los tipos de cepas es importante para el control efectivo de estas enfermedades. Los métodos para detectar y diferenciar patógenos en la miel son útiles para evaluar el estado de contaminación de las colmenas. A continuación se presenta un estudio en donde se estudiaron genotipos de *P. larvae* correspondiente a (ERIC) II por medio de un ensayo de PCR múltiple que distingue con precisión entre cepas de *P larvae que difieren en su virulencia* (ERIC I y II) y *M. plutonius* típico y atípico en una sola reacción. Además, se pudo precisar que los kits disponibles comercialmente diseñados para la extracción de ADN de *Mycobacterium* en las heces también extrajeron eficientemente el ADN de *P.larvae* y *M plutonium* en la miel. Utilizando el ensayo de PCR multiplex y los kits de extracción de ADN, se detectaron los genotipos objetivo de *P. larvae* y *M. plutonius* en miel enriquecida con los patógenos a una concentración de 100 células bacterianas/cepa/ml. Además, el

94% de las muestras de miel en el presente estudio estaban contaminadas con uno o más tipos de patógenos causantes de la Loque. Estos resultados indican que los métodos recientemente desarrollados son útiles para detectar patógenos de Loque en la miel. La información epidemiológica obtenida por estos métodos contribuirá al control efectivo de estas infecciones en los colmenares (OKAMOTO et al., 2022)

Tratamiento

Para el tratamiento de la Loque Europea es aconsejable usar oxitetraciclina: 200mg/l en jarabe por colmena, o bien muy concentrado (1500-2000 mg/l de jarabe) rociando los panales del enjambre si el tiempo es caluroso o rociando los adyacentes al nido si el tiempo es frío. Esto es para que las abejas no lo consuman tan rápido y les resulte tóxico a la concentración citada. También se utiliza estreptomicina (300 mg/colmena). Tanto en el caso de la Loque Americana como en el de la Europea, la tendencia actual es suprimir los tratamientos con antibióticos, debido a los residuos en miel (Juan Carlos; 2016).

Según Reynaldi FJ durante décadas, el único antibiótico aprobado para el control de las enfermedades bacterianas en colmenas (Loque Americana (LA) y Loque Europea (LE) (*Melissococcus plutonius*)) fue el clorhidrato de oxitetraciclina (OTC), con la particularidad, que la dosis recomendada para LE es 0,54 gr de OTC / colmena, casi un tercio de la dosis recomendada para controlar LA (1,25 gr OTC / colmena).

Discusión

Como se explicó en la introducción la importancia de las abejas millíferas radica no solo en la producción de la miel sino en su actividad polinizadora. Existe consenso de que en los últimos años la disminución en la población global de estas abejas ha perjudicado notablemente la industria de la miel provocando grandes pérdidas económicas.

Aunque hay muchas causas que pueden influir en este fenómeno, uno de los factores lo constituyen los agentes patógenos que terminan destruyendo las colmenas. El impacto de los hongos patogénicos como *A. Apis*, aunque siempre es considerable tanto a nivel ecológico como económico, varía dependiendo de las características biológicas tanto de la abeja hospedadora como del hongo patógeno, las cuales influyen en el potencial de transmisión de la enfermedad. Por ejemplo, si la abeja tiene un estilo de vida solitario o social, y si el hongo es un obligado o patógeno oportunista. Por otra parte factores ambientales como el tipo de nutrientes disponibles y la temperatura son vitales para el óptimo crecimiento de hongos patógenos como *A. apis*. El ambiente anaeróbico del intestino de las larvas en donde los tejidos son una fuente de CO₂ es vital para este proceso, siendo la temperatura óptima para la germinación de 35°C. Por eso la vigilancia y condiciones de saneamiento de los apiarios son fundamentales para prevenir la infección.

La virulencia y patogenicidad del hongo depende de la tasa de crecimiento según los tipos de apareamiento.

Como se mencionó, su importancia se explica por el modelo de evolución de superinfección en el que las cepas no cooperan sino que compiten entre sí. El papel de la variabilidad genética en la virulencia de *A. Apis* ha sido discutido, ya que trabajos recientes indican que las colonias y las larvas individuales de abejas pueden infectarse con múltiples cepas de *A. apis* y no se han podido establecer relaciones claras entre la infección por una cepa determinada y la gravedad de la

infección, sugiriendo que el genotipo del hospedador que le confiere la capacidad de resistencia podría ser más importante en determinar la gravedad y extensión de la infección. Por otro lado no se ha aprovechado suficientemente la disponibilidad de técnicas moleculares para el diagnóstico temprano de la infección evitando así la contaminación total y pérdida de las colmenas.

El impacto desde el punto de vista ecológico y económico de infecciones bacterianas como la Loque Americana y Loque Europea, también es importante. Estas bacterias causan infecciones importantes en las abejas melíferas. Aunque las técnicas de biología molecular han permitido la tipificación de distintas cepas con distintos grados de virulencia que permiten su detección rápida en distintos lugares del mundo todavía se sabe muy poco de los aspectos funcionales de estas bacterias en relación con los distintos genotipos identificados. La expansión en el futuro de los diagnósticos basados en la genética podría incluir rasgos específicos de interés tales como resistencia a los antibióticos, virulencia y diferencias de comportamiento según el origen geográfico.

La atención de la comunidad científica hacia estos patógenos surge como una respuesta en cierta medida, el nivel de pérdidas económicas de la apicultura como resultado de la patogénesis. A medida que avance el conocimiento actual de los aspectos de la biología de estos patógenos, en especial de sus características moleculares, se podrán identificar blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevos medicamentos y mitigar los efectos de la enfermedad en las abejas para evitar incluso su posible extinción.

Conclusiones.

La expansión de la enfermedad de la tiza en las colmenas causada por *A. apis* depende de condiciones climáticas, temperatura y del modo de alimentación y comportamiento de las abejas hospedadoras.

La virulencia de *A. Apis* depende del modo de apareamiento, pero el rol de la diversidad genética ha sido controversial. Los resultados de distintos trabajos varían y no son concluyentes y se ha sugerido que la virulencia del hongo está influenciada por factores intrínsecos a las abejas hospederas tales como la estructura genética que les confiere resistencia.

Si bien los mecanismos patológicos de *A. apis* en las abejas están establecidos, es necesario establecer protocolos de diagnóstico temprano que impidan el desarrollo de la infección antes que aparezcan los signos clínicos.

La identificación de los diferentes métodos de diagnóstico han permitido el reconocimiento temprano de la enfermedad *P.larvae* por lo que se han probado diferentes medios de cultivo, de los cuales el más sensible para el crecimiento bacteriano es el agar larvae Paenibacillus (PLA) ya que en este medio se inhiben microorganismo no deseados. Los avances de la biología molecular permitirán a corto plazo la identificación y distribución de estas cepas según su virulencia lo que permitirá un mejor control sanitario de los apiarios.

Nuevas herramientas de biología molecular han permitido identificar factores de virulencia de estas bacterias asociados a la infección en distintas partes del mundo. Las aplicaciones de estas técnicas de biología molecular brindarán más información sobre el comportamiento de estas bacterias en términos de adaptación a distintos hábitats, así como de resistencia y susceptibilidad a los antibióticos permitiendo el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Los tratamientos más efectivos para loque americana y loque europea según lo afirma SENASA, es la tilosina a dosis de 1.000 mg/l y 1.200 mg/l debido a que inhibe el crecimiento bacteriano de bacterias gram positivas, gram negativas y algunos macrolidos siendo esta eficiente para las enfermedades antes mencionadas.

Referencias

- Alizon, S, Hurford, A., Mideo, N., & Van Baalen, M. (2009). Virulence evolution and the trade-off hypothesis: History, current state of affairs and the future. In *Journal of Evolutionary Biology* (Vol. 22, Issue 2, pp. 245–259). <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01658.x>
- Alizon, Samuel, de Roode, J. C., & Michalakis, Y. (2013). Multiple infections and the evolution of virulence. *Ecology Letters*, *16*(4), 556–567. <https://doi.org/10.1111/ELE.12076>
- Andrade, V. D. M., Flores, J. L. H., López, M. A. R., Hernández, A. C., Gómez, S. R., Calvillo, R. P. M., Martínez, A. G. E., Pérez, J. C., Hernández, I. A., Hidalgo, E. Á., Osuna, C. Á., Jones, G. H., & Guillén, J. C. (2019). Evaluation of the presence of *Paenibacillus* larvae in commercial bee pollen using PCR amplification of the gene for tRNACys. *Brazilian Journal of Microbiology*, *50*(2), 471–480. <https://doi.org/10.1007/S42770-019-00039-9>
- Arrivillaga, M. (2021). *Manejo de la loque americana en Argentina, desde su introducción a la actualidad*. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/122658>
- Aupperle-Lellbach, H., Müller, L., Fünfhaus, A., & Genersch, E. (2019). European foulbrood in honey bees (*Apis mellifera*): Histological insights into the pathogenesis of larval infections with the low virulent *Melissococcus plutonius* strain lmg20360t belonging to the clonal complex 13. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, *132*(1–2), 35–40. <https://doi.org/10.2376/0005-9366-18062>
- Barrientos Calle, Y. M., & Agudelo Valencia, J. Y. (2016). IDENTIFICACIÓN DE PATOGENOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES EN ABEJAS *Apis mellifera* EN APIARIOS PRODUCTORES DE MIEL DEL MUNICIPIO DE MARSELLA DEPARTAMENTO DE RISARALDA. In *Repository UNAD* (p. 116).

<https://repository.unad.edu.co/handle/10596/8378>

Becsi, B., Formayer, H., & Brodschneider, R. (2021). A biophysical approach to assess weather impacts on honey bee colony winter mortality. *Royal Society Open Science*, 8(9).

<https://doi.org/10.1098/rsos.210618>

Brodschneider, R., Brus, J., & Danihlík, J. (2019). Comparison of apiculture and winter mortality of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in Austria and Czechia. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 274, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.01.002>

Buckling, A., & Brockhurst, M. A. (2008). Kin selection and the evolution of virulence. *Heredity* 2008 100:5, 100(5), 484–488. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6801093>

Cabañes, F. J. (2018). Nosemosis y el colapso de las colmenas. *Perspective*, 20(1), 1302–1329. https://ddd.uab.cat/pub/blogmicani/blogmicani_a2019m5.pdf

Castagnino, G. L. B., Mateos, A., Meana, A., Montejo, L., Zamorano Iturralde, L. V., & Cutuli De Simón, M. T. (2020). Etiology, symptoms and prevention of chalkbrood disease: A literature review. In *Revista Brasileira de Saude e Producao Animal* (Vol. 21). <https://doi.org/10.1590/S1519-9940210332020>

Chand, D., & Srivastava, M. (2019). European foulbrood disease in *A. mellifera* as documented in some districts of Haryana, India. ~ 868 ~ *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 7(6), 868–872. <https://www.entomoljournal.com/archives/2019/vol7issue6/PartP/7-5-58-938.pdf>

Chen, D., Guo, R., Xiong, C., Zheng, Y., Hou, C., & Fu, Z. (2018). Morphological and molecular identification of chalkbrood disease pathogen *Ascosphaera apis* in *Apis cerana cerana*. *Journal of Apicultural Research*, 57(4), 516–521. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1475943>

- De Graaf, D. C., Alippi, A. M., Brown, M., Evans, J. D., Feldlaufer, M., Gregorc, A., Hornitzky, M., Pernal, S. F., Schuch, D. M. T., Titra, D., Tomkies, V., & Ritter, W. (2006). Diagnosis of American foulbrood in honey bees: A synthesis and proposed analytical protocols. *Letters in Applied Microbiology*, 43(6), 583–590. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02057.x>
- De Graaf, Dirk 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., Fünfhaus, A., Garcia-Gonzalez, E., Gregorc, A., Human, H., Murray, K. D., Nguyen, B. K., Poppinga, L., Spivak, M., Van Engelsdorp, D., ... Genersch, E. (2013). Standard methods for American foulbrood research. In *Journal of Apicultural Research* (Vol. 52, Issue 1, pp. 1–28). <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.11>
- Evison, S. E. (2015). Chalkbrood: Epidemiological perspectives from the host-parasite relationship. In *Current Opinion in Insect Science* (Vol. 10, pp. 65–70). <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.04.015>
- Evison, S. E., & Jensen, A. B. (2018). The biology and prevalence of fungal diseases in managed and wild bees. In *Current Opinion in Insect Science* (Vol. 26, pp. 105–113). <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.010>
- Flores, J. M., Ruiz, J. A., Ruz, J. M., Puerta, F., Bustos, M., Padilla, F., & Campano, F. (1996). Effect of temperature and humidity of sealed brood on chalkbrood development under controlled conditions. *Apidologie*, 27(4), 185–192. <https://doi.org/10.1051/APIDO:19960401>
- Fünfhaus, A., Ebeling, J., & Genersch, E. (2018). Bacterial pathogens of bees. In *Current Opinion in Insect Science* (Vol. 26, pp. 89–96). <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.008>

- Gerdt, J. R., Roberts, J. M. K., Simone-Finstrom, M., Ogbourne, S. M., & Tucci, J. (2021). Genetic variation of *Ascosphaera apis* and colony attributes do not explain chalkbrood disease outbreaks in Australian honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 180.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107540>
- Gillard, M., Charriere, J., Pathology, L. B.-J. of I., & 2008, undefined. (2008). Distribution of *Paenibacillus* larvae spores inside honey bee colonies and its relevance for diagnosis. *Elsevier*. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.05.010>
- He, B., Liu, Z., Wang, Y., Cheng, L., Qing, Q., Duan, J., Xu, J., Dang, X., Zhou, Z., & Li, Z. (2021). Imidacloprid activates ROS and causes mortality in honey bees (*Apis mellifera*) by inducing iron overload. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 228.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112709>
- Heath, L. A. F. (2015). Development of Chalk Brood in a Honeybee Colony: A Review. [Http://Dx.Doi.Org/10.1080/0005772X.1982.11097876](http://Dx.Doi.Org/10.1080/0005772X.1982.11097876), 63(3), 119–130.
<https://doi.org/10.1080/0005772X.1982.11097876>
- Heath, L. A. F., & Gaze, B. M. (1987). Carbon dioxide activation of spores of the chalkbrood fungus *Ascosphaera apis*. *Journal of Apicultural Research*, 26(4), 243–246.
<https://doi.org/10.1080/00218839.1987.11100768>
- graov, Y. V., Le Roux, J. J., Allsopp, M. H., & Wossler, T. C. (2021). Identity and distribution of American foulbrood (*Paenibacillus* larvae) in South Africa. *Journal of Apicultural Research*.
<https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1887635>
- Huber, J. (1958). Untersuchungen zur Physiologie insektentötender Pilze. *Archiv Für Mikrobiologie*, 29(3), 257–276. <https://doi.org/10.1007/BF00412319>

- Hýbl, M., Bohatá, A., Rádsetoulalová, I., Kopecký, M., Hoštičková, I., Vaníčková, A., & Mráz, P. (2021). Evaluating the Efficacy of 30 Different Essential Oils against *Varroa destructor* and Honey Bee Workers (*Apis mellifera*). *Insects*, *12*(11), 1045. <https://doi.org/10.3390/insects12111045>
- Jeliński, M. (2003). Survival of *Paenibacillus* larvae subsp. larvae endospores in honey substitute obtained from bee colonies affected with American foulbrood. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, *47*(1), 271–273. <https://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-article-ec337c82-e383-48e3-af7b-653907f0aee3>
- Jong, D. De. (2015). Experimental Enhancement of Chalk Brood Infections. <Http://Dx.Doi.Org/10.1080/0005772X.1976.11097606>, *57*(3), 114–115. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1976.11097606>
- Klinger, E. G., Vojvodic, S., DeGrandi-Hoffman, G., Welker, D. L., & James, R. R. (2015). Mixed infections reveal virulence differences between host-specific bee pathogens. *Journal of Invertebrate Pathology*, *129*, 28–35. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2015.05.003>
- Krainer, S., Brodschneider, R., Vollmann, J., Crailsheim, K., & Riessberger-Gallé, U. (2016). Effect of hydroxymethylfurfural (HMF) on mortality of artificially reared honey bee larvae (*Apis mellifera carnica*). *Ecotoxicology*, *25*(2), 320–328. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1590-x>
- Lee, G. M., McGee, P. A., & Oldroyd, B. P. (2013). Variable virulence among isolates of *Ascosphaera apis*: Testing the parasite-pathogen hypothesis for the evolution of polyandry in social insects. *Naturwissenschaften*, *100*(3), 229–234. <https://doi.org/10.1007/S00114->

013-1016-7

- Maes, P. W., Rodrigues, P. A. P., Oliver, R., Mott, B. M., & Anderson, K. E. (2016). Diet-related gut bacterial dysbiosis correlates with impaired development, increased mortality and Nosema disease in the honeybee (*Apis mellifera*). *Molecular Ecology*, 25(21), 5439–5450. <https://doi.org/10.1111/MEC.13862>
- Mantilla Salazar, J. (2012). *Caracterización de enfermedades apícolas (loque americana, loque europea, nosemosis y varroasis) en el Perú: Informe final*. <https://repositorio.senasa.gob.pe:8443/handle/SENASA/136>
- Martínez, J., Simon, V., Gonzalez, B., & Conget, P. (2010). A real-time PCR-based strategy for the detection of *Paenibacillus* larvae vegetative cells and spores to improve the diagnosis and the screening of American foulbrood. *Letters in Applied Microbiology*, 50(6), 603–610. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02840.x>
- Medrzycki, P., Sgolastra, F., Bortolotti, L., Bogo, G., Tosi, S., Padovani, E., Porrini, C., & Sabatini, A. G. (2010). Influence of brood rearing temperature on honey bee development and susceptibility to poisoning by pesticides. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 52–59. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.07>
- Mráz, P., Hýbl, M., Kopecký, M., Bohatá, A., Konopická, J., Hoštičková, I., Konvalina, P., Šipoš, J., Rost, M., & Čurn, V. (2021). The effect of artificial media and temperature on the growth and development of the honey bee brood pathogen *ascosphaera apis*. *Biology*, 10(5), 431. <https://doi.org/10.3390/biology10050431>
- Mutinelli, F. (2011). The spread of pathogens through trade in honey bees and their products (including queen bees and semen): Overview and recent developments. In *OIE Revue*

Scientifique et Technique (Vol. 30, Issue 1, pp. 257–271).

<https://doi.org/10.20506/rst.30.1.2033>

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. *Journal of Veterinary Medical Science*, 84(3), 390–399.

<https://doi.org/10.1292/jvms.21-0629>

Pérez-Ordóñez, G., Romo-Chacón, A., Rios-Velasco, C., Sepúlveda, D. R., de Jesús Ornelas-Paz,

J., & Acosta-Muñiz, C. H. (2021a). Virulence variations between clonal complexes of *Melissococcus plutonius* and the possible causes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 186.

<https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107686>

Pérez-Ordóñez, G., Romo-Chacón, A., Rios-Velasco, C., Sepúlveda, D. R., de Jesús Ornelas-Paz,

J., & Acosta-Muñiz, C. H. (2021b). Virulence variations between clonal complexes of *Melissococcus plutonius* and the possible causes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 186.

<https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107686>

Suchail, S., Guez, D., & Belzunces, L. P. (2000). Characteristics of imidacloprid toxicity in two

Apis mellifera subspecies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(7), 1901–1905.

<https://doi.org/10.1002/etc.5620190726>

Tejerina, M. R., & Benitez-Ahrendts, M. R. (2021). Pathogenicity bioassays of *Ascosphaera apis*

strains from Spanish provinces in bee larvae from Northern Argentina. *Journal of*

Apicultural Research. <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1889825>

Vojvodic, S., Jensen, A. B., James, R. R., Boomsma, J. J., & Eilenberg, J. (2011). Temperature

dependent virulence of obligate and facultative fungal pathogens of honeybee brood.

Veterinary Microbiology, 149(1–2), 200–205.

<https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2010.10.001>

Ziegler, C., Sinigaglia, T., Martins, M. E. S., & Souza, A. M. (2021). Technological advances to reduce *apis mellifera* mortality: A bibliometric analysis. *Sustainability (Switzerland)*,

13(15). <https://doi.org/10.3390/su13158305>

Zinatullina, Zy., Dolnikova, T., Domatskaya, T., & Domatsky, A. (2018). Monitoring diseases of honey bees (*Apis mellifera*) in Russia. *Ukrainian Journal of Ecology*, 8(3), 106–112.

[https://cyberleninka.ru/article/n/monitoring-diseases-of-honey-bees-apis-mellifera-in-russia-](https://cyberleninka.ru/article/n/monitoring-diseases-of-honey-bees-apis-mellifera-in-russia-1)

