

# ESTUDIO BACTERIOLOGICO DE LA «LOQUE EUROPEA»

GRAVE ENFERMEDAD  
DE LAS LARVAS DE ABEJAS EN LA ARGENTINA <sup>1</sup>

POR EDGARDO N. CAMUGLI <sup>2</sup>

## I. INTRODUCCION

En la primavera y verano de 1959 se presentó en nuestro país una grave enfermedad de las larvas de abejas, que al principio desconcertó a los apicultores y que con síntomas desconocidos, hasta entonces causaba mortandad en los cuadros de cría, disminuyendo la población de las colonias.

La enfermedad se manifestó con carácter de epizootia en el centro apícola de la provincia de Buenos Aires, causando cuantiosas pérdidas.

Los panales estudiados presentaban larvas infectadas y muertas, en celdas no operculadas y en el primer estado de desarrollo. Al iniciarse el ataque la segmentación de las larvas se hacía más marcada, perdiendo la rigidez, el brillo y el color perláceo. El color de blanco azulado en las larvas sanas, se hacía amarillento en las atacadas, llegando a amarillento-moreno o moreno en las muertas. Según el período de ataque, la consistencia variaba de seca a semi-fluida y hasta normal en larvas recientemente muertas; el tegumento

<sup>1</sup> Trabajo realizado en el Departamento Laboratorios de la Dirección de Agricultura del Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires y en el Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Facultad de Agronomía de La Plata. Presentado y aprobado en el Primer Congreso de Apicultura realizado en Junín, en junio de 1961.

<sup>2</sup> Ing. Agrón. Jefe del Departamento Laboratorios de la Dirección de Agricultura del Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires. Profesor Adjunto de Microbiología Agrícola de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Plata.

se rompía con facilidad y dejaba salir un líquido ligeramente viscoso. Las larvas muertas al secarse tomaban el aspecto de escamas, no se adherían a las paredes de la celda y caían al invertir el panal y golpearlo. El olor era desagradable, agrio y a veces nauseabundo, variando de acuerdo a la predominancia de los microorganismos saprófitos asociados a la enfermedad.

En el presente informe resumimos las tareas de carácter bacteriológico que permitieron diagnosticar, en febrero de 1960 y por primera vez en nuestro país, la enfermedad de las larvas de abejas denominada "Loque europea". Destacamos que se arribó a esta conclusión de acuerdo con los trabajos de White y que las observaciones y tareas que estamos realizando de conformidad con los últimos resultados obtenidos por Bailey (3), sobre la etiología de la enfermedad, motivará un informe posterior.

## II. MATERIAL Y METODOS

Los aislamientos para obtener cultivos puros de los microorganismos acompañantes de la enfermedad, los realizamos por el método de las estrías o de las diluciones sucesivas en cajas de Petri. Las determinaciones rápidas para establecer la dominancia de determinadas especies microbianas, las efectuamos en tubos de agar estría, sembrando el material con un ansa estéril luego de humedecerlo en el agua de condensación. Con este procedimiento hemos obtenido en muchas oportunidades cultivos prácticamente puros de *Bacillus alvei*, *Streptococcus apis* y *Bacillus orpheus*; no obstante, para tener la absoluta seguridad de la pureza de los cultivos empleamos el método arriba mencionado.

El aislamiento de las especies bacterianas esporuladas, tales como el *B. alvei* y *B. orpheus*, fue facilitado sometiendo las larvas muertas a un calentamiento previo a 80° C durante 10 a 15 minutos.

Para los aislamientos empleamos, primitivamente, el siguiente medio de cultivo:

|                                 |                |
|---------------------------------|----------------|
| Glucosa .....                   | 10 gramos      |
| Bacto neopectona.....           | 10 »           |
| Bacto extracto de levadura..... | 10 »           |
| Extracto de zanahoria.....      | 200 mililitros |
| Cistefina.....                  | 80 »           |
| Agua destilada.....             | 800 »          |
| Agar.....                       | 15 gramos      |
| pH 6,8-7,0                      |                |

En este medio de cultivo desarrolla el *Bacillus larvae*, causante de la "Loque americana"; originariamente lo utilizamos, puesto que al iniciar los estudios no habíamos descartado la posibilidad de que la epizootia fuera producida por ese germen. Debemos destacar que en este medio de cultivo desarrollaron bien dos de las especies microbianas señaladas más arriba, el *B. alvei* y el *B. orpheus*.

También empleamos con óptimos resultados el agar nutritivo para aislamientos y repiques.

No detallamos otros medios de cultivo, reactivos y procedimientos, puesto que todos ellos constituyen los elementos y técnicas comunes para cumplir con las exigencias de la planilla bacteriológica.

Las observaciones de los gérmenes bajo el microscopio las efectuamos con material proveniente de larvas enfermas o muertas. De las larvas enfermas o recientemente muertas extrajimos con sumo cuidado, por medio de pinzas histológicas estériles, el intestino medio, lugar de localización del agente patógeno. Con este material efectuamos los frotis que fueron coloreados con violeta de genciana, azul de metileno y fucsina fenicada de Ziehl. Las observaciones de especies esporuladas las realizamos empleando el verde de malaquita y el campo oscuro con nigrosina.

La infección artificial de las colmenas sanas la efectuamos con intestinos de larvas enfermas que presentaban síntomas característicos de la enfermedad. Dichos intestinos fueron machacados en un mortero con agua estéril, a razón de 20 intestinos por litro de jarabe. En algunas ocasiones pulverizamos los cuadros de cría y las abejas con el jarabe infectante.

Para la infección artificial elegimos colmenas con una población de abejas sanas y activas, cuyos cuadros de cría no mostraban ningún síntoma macroscópico de la enfermedad. De dichos cuadros retiramos algunas larvas, cuyos intestinos fueron cuidadosamente observados al microscopio, con el fin de descartar la presencia del *Streptococcus pluton*.

### III. RESULTADOS

Los preparados microscópicos de los intestinos de larvas enfermas o recientemente muertas mostraron la morfología característica del *Streptococcus pluton* (*Bacillus pluton* White). Las for-

mas variaban según el período de ataque, al principio de la enfermedad eran casi esféricas, parecidas a cocos, libres, de a dos y hasta en cadenas, de aproximadamente  $1\mu$ . de diámetro; en otros casos eran lanceoladas. Es de destacar que algunos campos del microscopio estaban cubiertos por estas formas, presentándose como un cultivo puro. A veces las formas redondeadas o lanceoladas se entremezclaban con formas alargadas, bastones similares a los descritos como *Bacterium eurydice* (fig. 7).

A pesar de no haber observado en los preparados microscópicos formas similares a *Bacillus larvae*, nos propusimos, no obstante esta circunstancia, intentar el aislamiento de este germen. Para ello empleamos el medio de cultivo especial para su desarrollo, el agar extracto de levadura y zanahoria con cisteína. Ninguna de las formas aisladas coincidió con las características de *B. larvae*, con lo cual eliminamos la posibilidad de la presencia de la "Loque americana". Por el contrario, en él desarrollaron bien, colonias que luego identificamos como pertenecientes a *B. alvei* y *B. orpheus*. Consideramos que el medio empleado facilita el aislamiento del primero de dichos gérmenes, el *B. alvei*, dado que en el agar extracto de carne las colonias son extendidas y móviles, cubriendo por completo las cajas de Petri, lo que dificulta su separación y purificación.

En el agar extracto de carne aislamos las colonias pertenecientes a *Streptococcus apis*.

El *B. alvei* fue encontrado casi permanentemente en las muestras analizadas; podemos considerar que su presencia ha sido prácticamente constante, como también el *S. apis* y *B. orpheus*, este último con un grado de frecuencia algo menor. En un mismo material hemos identificado las tres especies, pero en general predominaba el *B. alvei* y *S. apis* o uno de los dos exclusivamente.

En algunas oportunidades hemos aislado otros gérmenes que no pertenecían a ninguna de las tres especies citadas. La aparición de estas colonias fue ocasional.

Las principales características de los microorganismos, cuya presencia en larvas afectadas coadyuvan en el diagnóstico de la enfermedad y que fueron observadas por nosotros, en coincidencia con las descripciones de autores extranjeros, son las que detallamos a continuación:

*Bacillus alvei* (Cheshire y Chayne). — En agar extracto de carne, en cajas de Petri, produce un desarrollo rápido, al principio transparente, extendido, húmedo, con bordes irregulares que parecen olas de un mar encrespado. Esta última característica ha sido señalada por Harrinson (8), quien sostiene que esta observación por sí sola sirve para realizar un rápido diagnóstico de la presencia del bacilo. Por tratarse de colonias móviles que continúan el crecimiento, se unen unas con otras cubriendo por completo las cajas, haciéndose más opacas y formando un enduido blanco-amarillento.

En agar estría el crecimiento al principio es delgado, transparente; luego se hace extendido, cubre toda la superficie del agar y toma color blanco-amarillento.

En el caldo nutritivo produce enturbiamiento uniforme con una película superficial, que luego se deposita en el fondo del tubo.

Desarrolla moderadamente en papa, a lo largo de la estría, con una superficie brillante de color crema a moreno muy claro.

Licúa lentamente la gelatina en punción.

No produce nitritos de nitratos, ni hidroliza el almidón.

Produce la coagulación de la leche, la que toma una coloración amarillenta. A las tres o cuatro semanas produce la redisolución del coágulo.

En agar extracto de levadura y zanahoria con cisteína presenta colonias grandes, irregulares de color amarillento-moreno claro, húmedas.

Las formas vegetativas están constituidas por bastones delgados, ligeramente curvos, de 0,7-0,9 por 3 a 5,5  $\mu$ , tamaño que varía según el medio de cultivo empleado, con extremos suavemente redondeados, muy móviles. Las células se presentan libres, de a dos y a veces en cadena; frecuentemente se disponen una al lado de la otra, en forma de empalizada (fig. 1). La coloración de Gram es variable; al principio del crecimiento, menos de 18 horas a 37° C, las células retienen el cristal violeta, pero en los cultivos más viejos pierden esa característica para presentarse como Gram negativos.

Las esporas son ovals elipsoidales, de diámetro algo mayor que las células que las contienen, situadas en la parte central del esporangio, de 1 por 2  $\mu$ : estas endosporas tienen una disposición muy característica, al disponerse una al lado de la otra en forma de empalizada. El esporangio se hace definitivamente más puntiagudo

que las células vegetativas. Estas últimas características del germen facilitaron su identificación (fig. 2).

*Streptococcus liquefaciens* Sternberg (S. apis Maassen). — Presenta formas esféricas, a veces ovales, en pares o cortas cadenas, de aproximadamente  $1\ \mu$  de diámetro. Desarrolla en el caldo nutritivo formando un enturbiamiento, que luego se deposita en el fondo del tubo de ensayo. Acidifica la leche coagulándola y luego peptonizándola. Desarrolla en gelatina en punción, licuándola.

Fermenta sucrosa, maltosa, manita, glucosa, lactosa y glicerina, formando ácidos volátiles. El olor agrio o avinagrado de ciertas formas de "Loque europea", es atribuido a esta característica del germen de producir ácidos, como bien lo señala Toumanoff. Produce amoníaco a partir de la peptona. Se multiplica en los medios de cultivo entre los 12 y 45° C, pero lo hace mejor alrededor de los 38° C. Desarrolla en presencia de hasta 6% de sal común y prospera en pH altos, hasta 9.5.

*Bacillus laterosporus* Laubach. (*B. orpheus* White). — En el agar extracto de levadura y zanahoria con cisteína, en cajas de Petri, desarrolla bien formando colonias circulares, brillantes, de color amarillento-moreno claro, húmedas, de bordes enteros; al envejecer se hacen más oscuras, rugosas y pulverulentas.

En agar extracto de carne en cajas de Petri, las colonias son más pequeñas y redondeadas, no extendidas, generalmente rugosas, de color amarillento moreno. Debemos destacar que las colonias aisladas por nosotros eran del tipo rugoso.

Coagula la leche. Licúa muy lentamente la gelatina. Desarrolla en papa, con un crecimiento poco extendido, rugoso, de color blanco-grisáceo.

En agar estría, el crecimiento es poco extendido, rugoso y moreno rosado. Produce nitritos de nitratos. No obtuvimos resultados definitivos sobre fermentación de azúcares, pero hemos constatado que produce gas a partir de glicerina. No hidroliza el almidón.

Las formas vegetativas están constituidas por bastones generalmente más cortos que los de *B. alvei*, alrededor de 1 por  $3\ \mu$ , aerobios, móviles, simples o de a pares, de extremos suavemente redondeados, Gram variables (fig. 3).

Forma endosporas muy características, que se sitúan en la parte media del esporangio y a un costado, de forma elipsoidal, de 1,2

por 1,5  $\mu$ . También en este caso la disposición de la endospora facilita la identificación de la especie.

La infección artificial de colmenas sanas con intestinos de larvas enfermas, reprodujo en todas las oportunidades la enfermedad. Los primeros síntomas aparecieron entre el cuarto y octavo día de efectuada la infección. En ese período se observó la aparición de algunas pocas larvas afectadas; a partir del octavo día la infección se generalizó invadiendo prácticamente los cuadros de cría.

La sintomatología macroscópica de estos cuadros, coincidió con la observada en las colmenas afectadas naturalmente por el mal. De los intestinos de las larvas enfermas infectadas artificialmente, se realizaron observaciones microscópicas, constatando permanentemente la presencia de las formas pluton y se identificaron a los microorganismos acompañantes del mal, ya sea *B. alvei*, *S. apis* o *B. orpheus*.

#### CONCLUSIONES

El fin propuesto al iniciar el estudio del material proveniente de colmenares atacados por una grave enfermedad, que por primera vez se observaba en nuestro país, era establecer qué agente o agentes patógenos actuaban en las larvas afectadas.

Nuestras observaciones, de acuerdo con los trabajos realizados por White y por lo postulado por Toumanoff, nos permiten establecer que la enfermedad estudiada es la "Loque europea". Debemos significar que nuestros trabajos fueron efectuados siguiendo los procedimientos clásicos, que hasta antes de Bailey, se emplearon y se emplean aún hoy en diversos países de Europa y Norte América, para diagnóstico de la enfermedad. Esto es señalado por la circunstancia de que la etiología es complicada y no siempre los autores se han puesto de acuerdo sobre la verdadera acción que cumplen los microorganismos encontrados en larvas enfermas o muertas.

Dice el Dr. Toumanoff: "La loque européenne, d'après les recherches de White, est causée par *Bacillus pluton* accompagné d'autres microbes saprophytes.

"Parmi les microbes trouvés dans les larves mortes de la loque européenne, à part le *B. pluton*, il faut citer: *B. alvei*, *Streptococcus apis*, *B. orpheus*, *B. eurydice*" y agrega: "La chose la plus surprenante dans les manifestations de cette maladie est la presence, pres-

que constante, dans les larves a la fin de leur infection, ou après leur mort, de *B. alvei*, de *Streptococcus apis* ou de ces deux microbes a la fois".

De acuerdo a lo expresado, hemos llegado a la conclusión antedicha por los siguientes motivos:

1º Por la sintomatología macroscópica de la enfermedad, coincidente con la descripta por los autores clásicos y en conocimiento de que los síntomas no son todos enteramente idénticos.

2º Por tratarse de una enfermedad infecciosa, atestiguado por los resultados siempre positivos, al infectar cuadros de cría sanos con material infeccioso proveniente de intestinos de larvas enfermas.

3º Por la persistencia de observar formas similares a las de *Streptococcus pluton* Bailey (*Bacillus pluton* White), en los intestinos de larvas enfermas, constatación que se ha hecho a través de miles de observaciones microscópicas, con material proveniente de colmenares afectados de varios partidos de la provincia de Buenos Aires.

4º Por el aislamiento e identificación de los gérmenes que normalmente acompañan a la enfermedad, tales como *B. alvei*, *S. apis* y *B. orpheus*.

RESUMEN.— En el presente trabajo se describen en forma sumaria, las tareas de carácter bacteriológico que permitieron diagnosticar, en febrero de 1969, y por primera vez en la Argentina, la enfermedad de las larvas de abejas "Loque europea".

En los síntomas macroscópicos de la enfermedad se destaca que el ataque se produjo en celdas no operculadas y en el primer estado de desarrollo de las larvas. Las larvas enfermas presentaban color amarillento a amarillento-moreno, de consistencia semi-fluida, nunca gomosa. Las larvas muertas al secarse tomaban el aspecto de escamas, no se adherían a las paredes de la celda. El olor era agrio y a veces nauseabundo.

Al describir los materiales y métodos empleados se señala que el medio de cultivo agar extracto de zanahoria y levadura con cisteína facilitó el aislamiento de *Bacillus alvei* y *Bacillus orpheus*. Las infecciones artificiales se efectuaron con intestinos de larvas enfermas, de acuerdo con lo señalado por White.

Las observaciones microscópicas del intestino medio de las larvas enfermas o recientemente muertas muestran la morfología característica del *Streptococcus pluton* Bailey (*Bacillus pluton* White), tratándose de formas que variaban entre casi esféricas y lanceoladas, libres, de a dos y hasta en cadenas.

Se intentó aislar el *Bacillus larvae*, con resultados negativos. Se detallan las principales características de los tres gérmenes aislados, *B. alvei*, *B. orpheus* y *Streptococcus apis*, que permitieron la identificación.



La infección artificial de colmenas sanas con intestinos de larvas enfermas, reprodujo en todas las oportunidades la enfermedad.

Finalmente se señalan los fundamentos que permitieron diagnosticar la enfermedad.

**RÉSUMÉ.** — Étude bactériologique de la loque européenne, maladie grave des larves d'abeilles dans la République Argentine, par EDGARDO N. CAMUGLI. Dans ce travail on décrit brièvement les études bactériologiques qui ont permis de diagnostiquer en février 1960 et pour la première fois dans l'Argentine, la maladie des larves d'abeilles: "Loque européenne".

Dans les syntômes macroscopiques de la maladie, on remarque que l'attaque se produit dans des alvéoles non operculés et dans le premier état de développement des larves; ceux-ci étaient d'une couleur jaunâtre à jaunâtre brun et d'une consistance semi-fluide, mais jamais gommeuse. A mesure que les larves se séchaient, elles prenaient l'aspect d'écaillés et ne s'adhéraient, pas aux parois de l'alvéole. Dans les rayons, l'odeur était aigre et parfois nauséabond.

Quand on fait la description des matériaux et des méthodes employés, on signale que le milieu de culture gélose extrait de carotte, et levain avec cystéine rendit facile l'isolement du *Bacillus alvei* et du *B. orpheus*.

On a réalisé les infections artificielles avec des intestins de larves malades, d'après ce que White a signalé.

Les observations microscopiques de l'intestin moyen des larves malades ou mortes depuis peu, montrent la morphologie caractéristique de l'*Streptococcus pluton* Bailey (*Bacillus pluton* White). Il s'agit des formes qui varient, à savoir: quasi sphériques, lancéolées, libres, de deux et même en chaîne.

On a essayé d'isoler le *Bacillus larvae* avec des résultats négatifs.

On donne les détails des principales caractéristiques des trois germes isolés: *B. alvei*, *B. orpheus* et *Streptococcus apis*, qui ont permis leur identification.

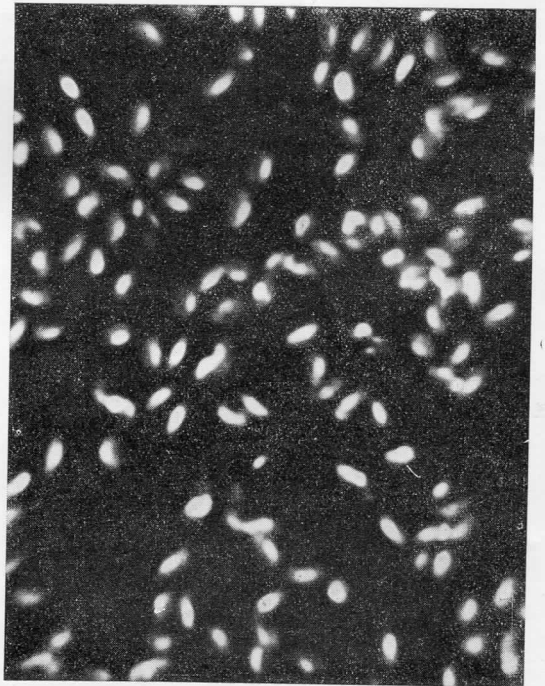
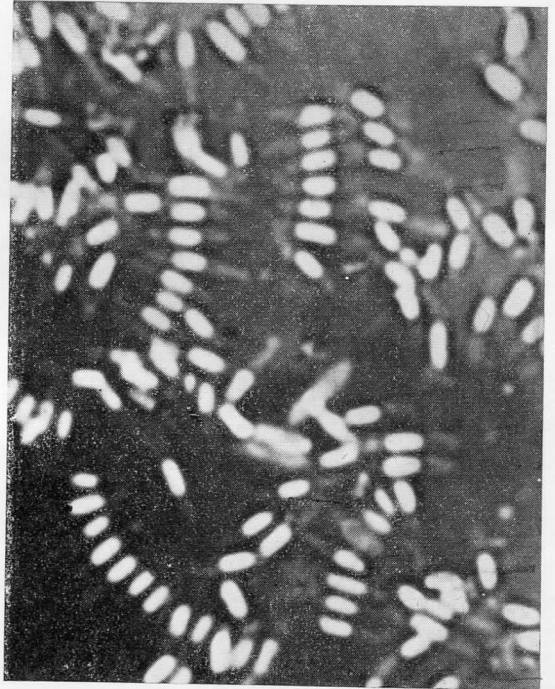
L'infection artificielle de colonies saines faite avec intestins de larves malades, a reproduit la maladie dans tous les cas.

Finalement on signale les fondements qui ont permis de diagnostiquer la maladie.

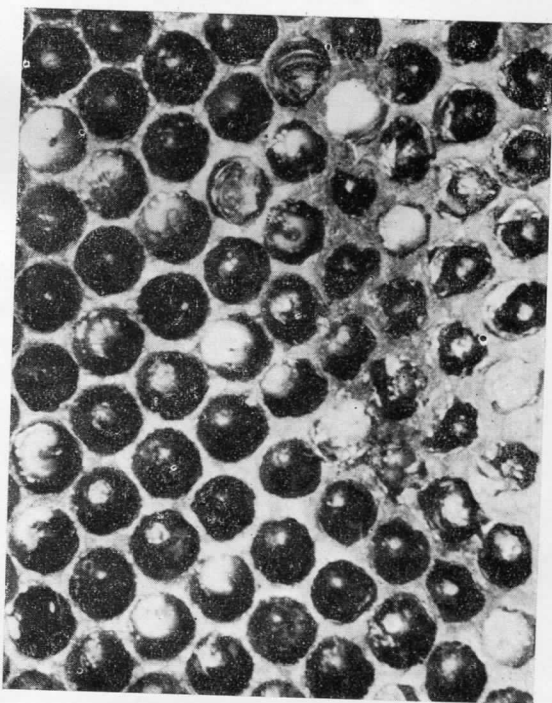
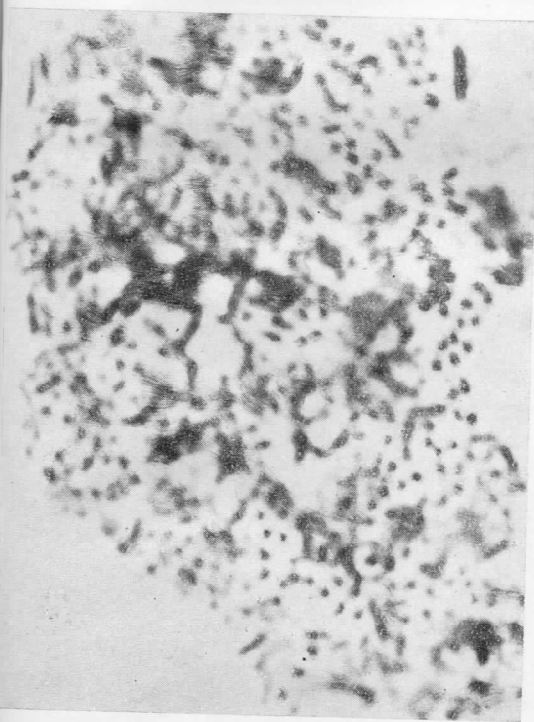
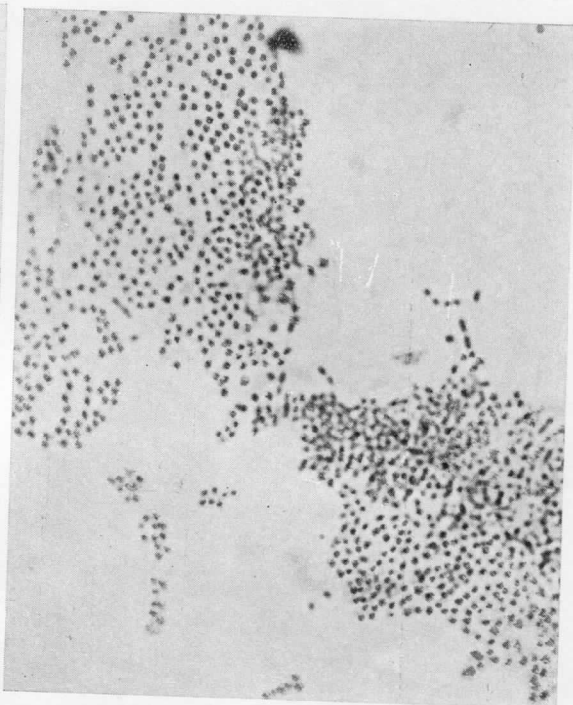
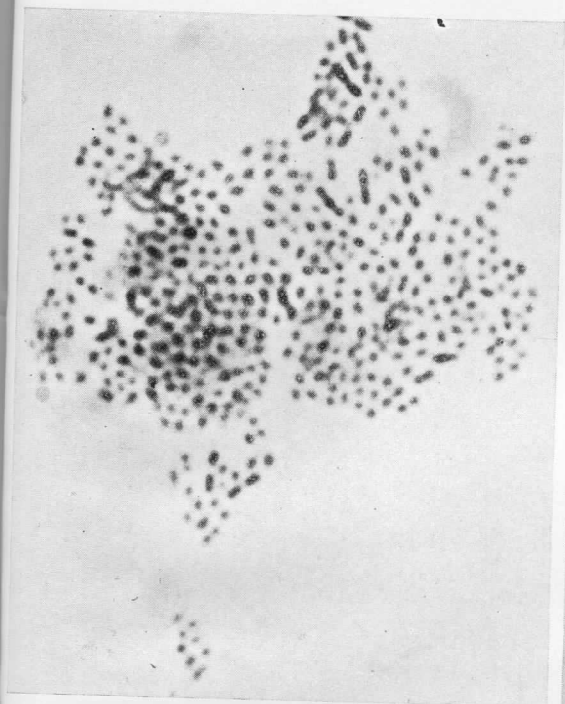
#### BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. ALEKSANDROVA, L. V. Growing the causative organism. of E. F. B. (*B. pluton*) in pure culture. (Abstract). — Bee World 38 (11): 296. 1957.
2. BAILEY, L. The isolation and cultural characteristics of *Streptococcus pluton* and further observations on *Bacterium eurydice*. — J. Gen. Microbiol. 17: 39-48. 1957.
3. — An improved method for the isolation of *Streptococcus pluton* and observations on its distribution and ecology. — Journal of Insect Pathology, 1: 80-85. 1959.
4. — Recent research on the natural history of European Foul Brood disease. — Bee World 40 (3): 66-70. 1959.
5. — La Loque Européenne des abeilles. — Bull. Office Internat. des Epizooties. 53 (3-4): 338-347. 1960.

6. BERGEY's. *Manual of Determinative Bacteriology*. — 6th ed., p. 724. 1948.
7. BURNSIDE, C. E., STURTEVANT, A. P. and E. C. HOLTS. *Diagnosing Bee Diseases in the Apiary*. — United States Department of Agriculture. Circular n° 392, 31 p., 1936, revised 1949.
8. HARRISON, F. C. *The foul brood of bees. Bacillus alvei* (CHESHIRE and CHEYNE). — *Centralb. für Bakteriöl. Parasitenk.* 6: 421-427; 457-469; 481-496; 512-517. 1900.
9. HOLST, E. C. and STURTEVANT, A. P. *Relation of proteolytic enzymes to phase of life cycle of Bacillus larvae, and two new culture media for this organism*. — *Jour. of Bact.* 40: 723-731. 1940.
10. KATZNELSON, H. *Nutritional requirements of Streptococcus apis*. — *Jour. of Bact.* 53 (1): 125. 1947. Canadá.
11. KATZNELSON, H. and A. G. LOCHHEAD. *Rapid Field tests for the diagnosis of American foul brood of bees*. — *Scientif. Agric.* 53 (1): 67-71. 1947. Canadá.
12. — *Nutritional requirements of Bacillus alvei and Bacillus para-alvei*. — *Jour. of Bact.* 53 (1): 83-88. 1947. Canadá.
13. POLIEV, V. I. *Nature de la Loque Européenne et lutte contre cette affection*. — *Bull. Office Internat. des Epizooties.* 53 (3-4): 364-366. 1960.
14. SCHULZ LANGNER, E. A. *New conception of A. F. B.* (Abstract). — *Bee World* 38 (10): 275. 1957.
15. TARR, H. L. A. *Bacillus alvei and Bacillus para-alvei*. — *Centralb. für Bakteriöl. Parasitenk.* 5 (94): 509-511. 1936.
16. TOMASEC, L. *On pluton forms in the microscopical picture of E. F. B.* (Abstract). — *Bee World.* 38 (4): 108. 1957.
17. — *Loque Européenne. (Résultats des expériences effectuées en Yugoslavie)*. — *Bull. Office Internat. des Epizooties.* 53 (3-4): 374-381. 1960.
18. TOUMANOFF, C. *Les maladies des Abeilles*. — *La Revue Française d'Apiculture.* París. 1951.



Figs. 1-4. — 1, *Bacillus alvei* (Cheshire y Chayne). Cultivo puro en agar extracto de levadura y zanahoria con cisteína. Bastones ligeramente curvos y algunos en empalizada. Aprox.  $\times 2.000$ ; 2, *Bacillus alvei* (Cheshire y Chayne). Cultivo puro en agar extracto de levadura y zanahoria con cisteína; formas esporuladas, en empalizada, esporangios puntiagudos. Aprox.  $\times 2.000$ ; 3, *Bacillus laterosporus* Laubach (*Bacillus orpheus* White). Cultivo puro en agar extracto de levadura y zanahoria con cisteína; formas vegetativas. Aprox.  $\times 2.000$ ; 4, *Bacillus laterosporus* Laubach (*Bacillus orpheus* White). Cultivo puro en agar extracto de levadura y zanahoria con cisteína; formas esporuladas. Obsérvese la disposición central y al costado de la espora. Aprox.  $\times 2.000$ ,



Figs. 5-8. — 5, Microfotografía del intestino medio de una larva recientemente muerta. Imagen de *Streptococcus pluton* (*Bacillus pluton* White). Aprox.  $\times 2.000$ ; 6, *Streptococcus pluton* Bailey (*Bacillus pluton* White) del intestino medio de una larva enferma. Obsérvese las formas casi esféricas y de lancetas. Aprox.  $\times 1.000$ ; 7, *Streptococcus pluton* Bailey (*Bacillus pluton* White), y *Bacterium eurydice* del intestino medio de una larva enferma. Aprox.  $\times 2.000$ ; 8, Cuadro de cría atacado. Larvas sanas enfermas y muertas. Opérculos no cribados.