

Tesis Doctoral: “Evaluación de antibióticos para el control de loque americana en colmenas de abejas melíferas”.

Autor: Lic. Francisco José Reynaldi

Director: Ing. Agr. Adriana M. Alippi

Codirector: Dr. Gustavo R. Spinelli.

Lugar de trabajo: Unidad de Bacteriología del CIDEFI, Fac. Cs. Agr. y Ftiles. UNLP.

**Facultad de Ciencias Naturales y Museo.
Universidad Nacional de La Plata.**

2006

***A mi hija Chiara,
quien a su corta edad supo mostrarme
cosas mágicas de la vida.***

Agradecimientos:

A mi señora, Soledad y a mi hija, Chiara que supieron estar siempre a mi lado apoyándome cuando fue necesario.

A la Ing. Adriana Alippi, mi directora, que supo guiarme y apoyarme adecuadamente para que pudiera empezar y terminar este trabajo de tesis.

Al Dr. Gustavo Spinelli, mi codirector, quien siempre tuvo palabras de aliento para mi, en especial cuando creía no saber donde estaba.

A mis padres que me dieron la posibilidad de poder elegir y estudiar libremente lo que quise; y a mis hermanos que siempre respaldaron lo que quise hacer.

A Katy, que siempre tuvo "la palabra" que resumía claramente mis largas y conflictivas explicaciones.

Al Dr. Roberto Rule y la Ing Graciela Albo, con quienes tuve el agrado de discutir ciertos temas. Asimismo supieron criticar feroz, pero constructivamente, diferentes etapas de esta tesis.

Al Sr. Alejandro Grattoni, el Sr. Pablo Hernández, la Sra. Mónica De Giusti y la Sra. Silvia Dimenna quienes hicieron más liviana mi tarea de campo.

Al Ing. Domingo Leveratto, el Ing. Raúl Pérez, el Ing. Agr. Ariel Guardia López, y al Sr. Néstor Pedretti quienes rápidamente me consideraron sus pares, permitiéndome de esta forma poder charlar y discutir diversos temas apícolas, y así poder comprender mejor esta fascinante actividad.

A todos los que me estoy olvidando pero seguramente dieron lo mejor de ellos para poder ayudarme, especialmente cuando los planes no salían como esperaba.

ÍNDICE GENERAL.

	Páginas
Capítulo 1. Introducción General y Objetivos.	12-20
Capítulo 2. Sensibilidad antimicrobiana <i>in vitro</i> .	21-54
1. Materiales y Métodos.	21
1.1. Antibiograma.	21
1.1.1. Preparación de las Placas de Petri con MYPGP.	23
1.1.2. Preparación de los discos.	23
1.1.3. Preparación de las soluciones de antibióticos.	24
1.1.4. Carga y almacenamiento de los discos con antibióticos.	25
1.1.5. Preparación del Inóculo bacteriano.	25
1.1.6. Inoculación de las Placas de con Agar.	26
1.1.7. Colocación de los discos con antibióticos en las Placas Inoculadas.	26
1.1.8. Incubación de las Placas.	26
1.1.9. Lecturas de las Placas e interpretación de los resultados.	27
1.1.10. Procedimiento para el Control de Calidad.	28
1.2. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) en medio sólido.	29
1.2.1. Preparación de las diluciones de trabajo.	31
1.2.2. Preparación de las Placas de Petri con MYPGP y las diferentes concentraciones de trabajo.	32
1.2.3. Control de Crecimiento.	33
1.2.4. Preparación del Inóculo.	33
1.2.5. Siembre de las Placas de Agar.	33
1.2.6. Incubación de las Placas.	34
1.2.7. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).	35
1.2.8. Procedimientos para el Control de Calidad.	35
2. Resultados y Discusión.	37
2.1. Antibiograma.	37
2.1.1. Control de Calidad.	37
2.1.2. Tetraciclina.	38
2.1.2.1. Tetraciclina con discos de 5 µg.	38
2.1.2.2. Tetraciclina con discos de 30 µg.	39
2.1.3. Tilosina.	39
2.1.4. Lincomicina.	40
2.1.5. Tilmicosina.	40
2.2. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).	40
2.2.1. Control de Calidad.	40
2.2.2. Tetraciclina.	41
2.2.3. Tilosina.	45
2.2.4. Lincomicina.	48
2.2.5. Tilmicosina.	50
3. Conclusiones.	52

Capítulo 3. Ensayos <i>in vitro</i> de toxicidad oral para abejas adultas.	54-60
1. Materiales y Métodos.	54
1.1. Material vivo.	55
1.2. Tratamiento y dosis probadas.	55
1.3. Análisis estadístico.	57
2. Resultados y Discusión.	58
3. Conclusiones.	59
Capítulo 4. Toxicidad larval a campo.	61-72
1. Materiales y Métodos.	61
1.1. Material vivo.	63
1.2. Tratamientos y modo de aplicación.	64
1.3. Metodología de campo.	66
1.4. Análisis estadístico.	67
2. Resultados y Discusión.	68
2.1. Análisis estadístico.	68
3. Conclusiones.	72
Capítulo 5. Efectividad a campo de los antibióticos para el control de loque americana.	73-85
1. Materiales y Métodos.	73
1.1. Material vivo.	73
1.2. Inoculación artificial.	74
1.3. Tratamientos, modo de aplicación y dosis usadas.	74
1.4. Relevamiento a campo de los datos.	77
1.5. Análisis estadístico.	78
2. Resultados y Discusión.	79
3. Conclusiones.	85
Capítulo 6. Consideraciones finales y Conclusiones.	86-92
Bibliografía	93-107
Anexos de gráficos LD₅₀	108-123

Resumen:

El objetivo central de este trabajo de tesis fue realizar una evaluación integral de los antibióticos oxitetraciclina, tilosina, tilmicosina y lincomicina para el control de la loque americana.

Se puso a punto una técnica para evaluar la sensibilidad *in vitro* de los cuatro antibióticos contra cepas de *Paenibacillus larvae* adaptando técnicas propuestas por la NCCLS pero empleando MYPGP como medio basal. Este medio resultó altamente efectivo para determinar la sensibilidad/resistencia de *P. larvae* frente a los antibióticos probados porque permitió el crecimiento óptimo de esta especie y los controles de calidad se ajustaron a los parámetros propuestos.

Se propusieron las siguientes cargas de discos: Tetraciclina: 5 µg; Tilosina: 15 µg; Tilmicosina: 15 µg; Lincomicina: 15 µg y, a partir de las mismas se elaboró un standard para interpretación de los discos: Tetraciclina: sensible ≥ 19 mm de diámetro de halo de inhibición; Intermedio 15-18 mm y resistente ≤ 14 mm; Tilosina: sensible ≥ 14 mm; Intermedio 11-13 mm y resistente ≤ 10 mm; Tilmicosina: sensible ≥ 14 mm; Intermedio 11-13 mm y resistente ≤ 10 mm; Lincomicina: sensible ≥ 21 mm; Intermedio 15-20 mm y resistente ≤ 14 mm.

Se determinaron los puntos de corte para la especie en estudio con respecto a los valores de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), y se propone el empleo de los siguientes puntos de corte epidemiológicos: Tetraciclina: sensible ≤ 4 µg/ml y resistente > 16 µg/ml; Tilosina: sensible ≤ 2 µg/ml y resistente > 8 µg/ml; Tilmicosina: sensible ≤ 2 µg/ml y resistente > 8 µg/ml; Lincomicina: sensible ≤ 4 µg/ml y resistente > 16 µg/ml.

Teniendo en cuenta que ya existen casos de resistencia hacia la oxitetraciclina, el uso de estos puntos de corte epidemiológicos permitirá denotar rápidamente pequeños cambios en la población salvaje de *Paenibacillus larvae*.

Ninguno de los ATB evaluados resultó tóxico para abejas adultas; tanto tilosina, como tilmicosina y lincomicina resultaron virtualmente atóxicos. En el caso

de oxitetraciclina los valores de LD50 obtenidos resultaron próximos al límite de compuestos tóxicos, de modo que un mínimo error en la dosificación a campo puede resultar en toxicidad para abejas adultas.

Se puso a punto una técnica para determinar la toxicidad larval de los ATB la cual resultó satisfactoria y permitió determinar claramente diferencias estadísticamente significativas. Sólo el tratamiento oxitetraciclina presentó una mortandad larval superior a la normal, lo cual demuestra que resulta tóxico. Tilmicosina, tilosina y lincomicina por el contrario no resultaron tóxicos para las larvas, aunque de los tres, la tilmicosina presentó un mayor porcentaje de toxicidad dentro de los parámetros normales y la lincomicina tuvo los niveles de mortandad más bajos.

Finalmente se pudo concluir que todos los antibióticos ensayados en esta tesis resultaron efectivos para el control de la enfermedad a campo a las dosis y en las formas de aplicación probadas.

Los resultados de todos los ensayos con tilmicosina para el control de *P. larvae*, tanto *in vitro* como a campo y de toxicidad para abejas y larvas, constituyen el primer registro a nivel mundial. En tanto que los resultados de todos los ensayos con lincomicina para el control de *P. larvae*, tanto *in vitro* como a campo y de toxicidad para abejas y larvas, son inéditos para la Argentina.

Summary:

The main objective of this Thesis was to evaluate the response of *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood disease (AFB) to oxytetracycline, tylosin, tilmicosin and lyncomycin.

MYPGP medium proved adequate for growth and interpretation of sensibility / resistance values obtained by the agar diffusion procedure and also by MICs determination of *P. larvae* against all the antibiotics tested.

The NCCLS does not provide a standard method for determining MIC values for *P. larvae*, nor have breakpoints for antibiotic resistance been established.

According to the results presented here, the following concentrations of antibiotic per disc were proposed: Tetracycline: 5 µg; Tylosin: 15 µg; Tilmicosin: 15 µg; and Lyncomycin: 15 µg, respectively.

The standard for interpretation for the agar diffusion procedure was proposed as follows: Tetracycline: sensitive > 19 mm in diameter; intermediate 15-18 mm and resistant < 14 mm; Tylosin: sensitive > 14 mm; intermediate 11-13 mm and resistant < 10 mm; Tilmicosin: sensitive > 14 mm; intermediate 11-13 mm and resistant < 10 mm; Lyncomycin: sensitive > 21 mm; intermediate 15-20 mm and resistant < 14 mm.

In addition, for MICs determination, the epidemiological cut-off values obtained were proposed as follows: Tetracycline: sensitive \leq 4 µg/ml and resistant > 16 µg/ml; Tylosin: sensitive \leq 2 µg/ml and resistant > 8 µg/ml; Tilmicosin: sensitive \leq 2 µg/ml and resistant > 8 µg/ml; Lyncomycin: sensitive \leq 4 µg/ml and resistant > 16 µg/ml.

In all cases, results from reference strains used here were within the acceptable limits for quality control strains according to NCCLS guidelines.

As the existence of oxytetracycline resistant strains of *P. larvae* has been already reported, the use of these epidemiological cut-off values or wild-type (WT)

cut-off values allows to detect small changes in populations of the Foulbrood pathogen.

None of the evaluated ATB was toxic for adults bees; although values of LD₅₀ for oxytetracycline were close to the limit for toxic compounds.

The technique used to determine larval toxicity was satisfactory interpretation and evaluation of LD₅₀. Oxytetracycline treatment was toxic, with a larval mortality higher than normal. By the other hand, tilmicosin, tylosin and lyncomycin were non- toxic for honeybee larvae.

All the antibiotics were effective to control AFB in colonies by eliminating clinical signs of the disease at all the doses and forms of application tested.

On a worldwide basis, this is the first approach for controlling *P. larvae* with the antibiotic tilmicosin, both *in vitro* and *in vivo*. In addition, this is the first record of using lyncomycin for the control of AFB in Argentina.

Abreviaturas y siglas

A	Absorbancia
ARN	Ácido ribonucleico
ATB	Antibiótico
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CIM ₅₀	Concentración Inhibitoria Mínima que inhibe el desarrollo del 50 % de las cepas en estudio
CIM ₉₀	Concentración Inhibitoria Mínima que inhibe el desarrollo del 90 % de las cepas en estudio
CBM	Concentración Bactericida Mínima
col.	Colaboradores
EUA	Estados Unidos de América
g	Gramos
h	Horas
LD ₅₀	Lethal Dosis 50% (Dosis Letal 50%)
MPC	Mutant Prevention Concentration (Concentración que previene el Desarrollo de Mutantes)
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
p.a.	Principio Activo
PCE	Puntos de Corte Epidemiológicos
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
QCG	Quality Control Guidelines
SD	Desvío Standard

“Evaluación de antibióticos para el control de loque americana en colmenas de abejas melíferas”

Capítulo 1

Introducción General y Objetivos

La República Argentina es el tercer productor mundial de miel, con una producción media de 90.000 toneladas por año, de la cual se exporta el 90% con un valor aproximado de 123 millones de dólares. Como país exportador, se ubica en primer lugar, con un volumen de 81.500 toneladas.

La loque americana es la enfermedad más grave y peligrosa que afecta a las larvas de las abejas (*Apis mellifera* L.) (Bailey & Ball, 1991; Shimanuki, 1990; Elzen *et al.*, 2002b). Es muy contagiosa, puede matar a una colmena y diseminarse a otras después de años de creerla erradicada, puede estar latente en una colonia y aparecer en forma repentina o nunca debido a factores de *stress*, condiciones externas, resistencia genética o causas desconocidas. No se presenta como epidemia, sino que avanza en forma progresiva, aparece en cualquier época del año.

White (1907, 1920) demostró que *Bacillus larvae* era el agente causal de la loque americana y realizó una descripción de la especie. En 1993 Ash y col. reclasificaron esta especie definiendo un nuevo género, *Paenibacillus* (del latín: casi un *Bacillus*, porque deviene de ese género pero es filogenéticamente distinto), que comprende el grupo 3 *Bacillus* spp. definido por el análisis del ARN r 16s. Heyndrickx y col. (1996) reclasificó a un miembro del género, *Paenibacillus pulvificiens* (patógeno débil de las larvas de abejas) como una subespecie de *Paenibacillus larvae*. El genoma de las dos subespecies posee una homología del 90%. Recientemente, Genersch y col (2005) realizaron un estudio taxonómico polifásico que comprendió características morfológicas, bioquímicas y estudios genómicos del ADN bacteriano usando técnicas de rep-PCR y Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) concluyendo que la diferenciación entre las subespecies

Paenibacillus larvae larvae y *Paenibacillus larvae pulvifaciens* no esta justificada, ya que ambas son variantes de la especie *Paenibacillus larvae* sin diferenciación a nivel subespecie.

El agente causal de la enfermedad es *Paenibacillus larvae* (White) Genersch *et al.* (2005), una bacteria con la capacidad de formar esporas que permanecen viables por largos períodos y sobreviven frente a condiciones adversas (Morse & Nowogrodzki, 1990). Está ampliamente difundida en todos los países productores de miel (Matheson, 1993, 1996).

La sintomatología clínica de la enfermedad se caracteriza por presentar los cuadros de cría con un aspecto de "cría salteada", se limita principalmente a las larvas que han muerto luego de ser operculadas. Las celdas afectadas presentan los opérculos hundidos y oscurecidos, de apariencia húmeda y con perforaciones irregulares. Los individuos enfermos cambian del color normal blanco nacarado al amarillento y castaño oscuro, casi negro transformándose en una masa viscosa. Con el correr del tiempo, los restos larvales se secan dando lugar a la formación de una escama negra que se adhiere firmemente al piso y fondo de las celdas. Cada una de esas escamas contiene aproximadamente $2,5 \times 10^9$ esporas bacterianas (Sturtevant, 1932).

Las esporas representan la forma infectiva e inician el ciclo de la enfermedad cuando son ingeridas por las larvas junto con el alimento. Germinan en el intestino de larvas menores a 3 días de edad (pH 6.5) originando células vegetativas flageladas que migran al epitelio y lo atraviesan en el momento de la metamorfosis. Posteriormente invaden la hemolinfa donde se multiplican y esporulan nuevamente (Bailey & Lee, 1962). La pupa muere por septicemia entre los 11 y 12 días de la eclosión del huevo (Tanada & Kaya, 1993). Las esporas bacterianas no pueden germinar tan fácilmente en larvas mayores de 3 días de edad y normalmente no alcanzan el epitelio, siendo eliminadas por las heces fuera

del intestino. Las esporas no pueden germinar en el tracto digestivo de las abejas adultas debido a la acidez del mismo (pH: 3-3,5).

Las esporas se diseminan por toda la colmena cuando las abejas encargadas de la limpieza remueven las larvas muertas. De esa forma se contamina la miel, el polen, la cera y otros productos de la colmena. Entre colmenas se disemina principalmente por pillaje, enjambres, intercambio de marcos y en menor medida por deriva de abejas (Matheson & Reid, 1992).

Desde su introducción en la Argentina (Alippi, 1992), se ha difundido en todas las zonas productoras del país, difusión posiblemente vinculada a la trashumancia de colmenas con el objeto de realizar multiplicación temprana, aumentar la producción de miel y polinizar cultivos, además de la compra-venta de núcleos, colmenas, paquetes y reinas sin control sanitario.

Actualmente, el manejo actual de la loque americana en la Argentina se cumple a distintos niveles que involucran pérdidas económicas, riesgos y limitaciones, como la quema del material apícola contaminado con esporas (Matheson & Reid, 1992), el empleo de descontaminantes como radiación gamma y esterilización con parafina (Charbonneau *et al.*, 1992; Matheson & Reid, 1992) y, el mejoramiento genético de las abejas (Rinderer, 1986; Spivak & Gilliam, 1998a; Spivak & Reuter, 2001; Spivak & Gilliam, 1998b).

La aplicación de antibióticos para el control de esta enfermedad es una alternativa de manejo. Es importante destacar que los antibióticos sólo controlan las formas vegetativas, eliminando los síntomas pero no las esporas que son las responsables de la diseminación de la enfermedad.

El uso indiscriminado de oxitetraciclina, sobre todo en forma preventiva, genera ciertos riesgos como la reducción de la expectativa de vida de las abejas

(Charboneau *et al.*, 1992), la inducción de desarrollo de resistencia en la población natural de bacterias (Alippi, 1996; Glinski & Rzedzicki, 1977; Kochansky *et al.*, 2001) y la contaminación de las mieles (Matsuka & Nakamura, 1990; Sporns *et al.*, 1986; Toporcak *et al.*, 1995).

OBJETIVO GENERAL

El objetivo central de este trabajo de tesis ha sido la evaluación integral de los antibióticos oxitetraciclina, tilosina, tilmicosina y lincomicina para el control de la loque americana.

Objetivos particulares

1. Evaluar la sensibilidad *in vitro* de *P. larvae* a estos antibióticos.
2. Evaluar la efectividad del medio MYPGP para determinar la sensibilidad/resistencia de *P larvae*
3. Definir la carga de AMB en los discos.
4. Establecer los valores con los que se definirán los grados de sensibilidad bacteriana
5. Establecer los puntos de corte para los CIM
6. Evaluar la toxicidad oral aguda de los antibióticos para larvas y adultas de *A. mellifera*.
7. Evaluar la eficacia de los antibióticos a campo para el control de la enfermedad.

A continuación se resumen las características más sobresalientes de los distintos grupos de antibióticos estudiados.

TETRACICLINAS: Es una de las familias de antibióticos más antigua. El primer antibiótico (ATB) de este grupo, la clortetraciclina, fue obtenido en 1948 a partir de *Streptomyces aureofaciens* (Duggar), recibiendo por ello el nombre

de aureomicina. En 1950 se aisló de *Streptomyces rimosus* (Sobón *et al.*) la oxitetraciclina. La estructura química de este grupo es tetracíclica, de ahí su denominación, siendo su núcleo central un octahidronaftaceno. Las tetraciclinas inhiben la síntesis de las proteínas bacterianas al fijarse a la subunidad ribosómica 30s. En ella bloquean el sitio aceptor del complejo ARN mensajero-ribosoma, impidiendo por ello la fijación del aminoacil ARN de transferencia. Además de este mecanismo básico, la tetraciclinas pueden quelar el magnesio necesario para que se produzca la unión ribosómica e inhibir algunos sistemas bacterianos, entre otros los implicados en la fosforilación oxidativa. A través de este mecanismo de acción, la tetraciclinas producen un efecto bacteriostático, aunque en ocasiones, si las bacterias son muy sensibles y la concentración alcanzada es elevada, pueden provocar su destrucción (Rang *et al.*, 2000). La penetración en el citoplasma bacteriano se realiza mediante difusión pasiva a través de los poros de la pared bacteriana, y posteriormente por diversos mecanismos de transporte activo asociados a algún transportador. Precisamente, la alteración del sistema del transporte activo es el principal modo de resistencia bacteriana a las tetraciclinas. Se cree que esta resistencia bacteriana se debe su resistencia a la incorporación de nuevos genes asociados a plásmidos móviles ó a transposones. Se han descrito otros sistemas de resistencia, como la síntesis de enzimas inactivadoras y mecanismos de protección del ribosoma. Se ha demostrado que existe resistencia cruzada entre las tetraciclinas (Roberts, 1996; Roberts, 2005). Presentan una amplia actividad antibacteriana, ya que actúan sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, además de tener actividad contra rickettsias, amebas y micoplasmas. (Sumano Lopez & Ocampo Cambreros, 1997).

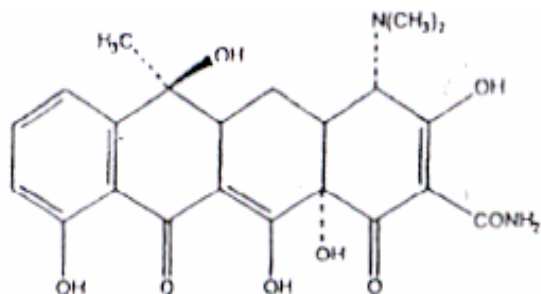


Figura 1: Estructura química de la tetraciclina.

MACRÓLIDOS: Bajo esta denominación se agrupa una serie de antibióticos, entre los cuales se encuentran tilosina (se aísla a partir de *Streptomyces fradiae* ((Walksman & Curtis) Walkman & Henrici)) y tilmicosina (sintetizada sintéticamente a partir de la tilosina), que se caracterizan por la presencia de un anillo lactónico macrocíclico, al que se unen diversos desoxiazúcares. Los macrólidos inhiben la síntesis de las proteínas bacterianas por unirse al sitio P en la subunidad 50s del ribosoma bacteriano. Actualmente se acepta que los macrólidos del grupo de la eritromicina bloquean el proceso de translocación del peptidil ARNt en el ribosoma, mientras que los del grupo de la espiramicina inhiben la formación del enlace peptídico previo al proceso de translocación. Estas diferencias en el mecanismo de acción se explican por la existencia de diferentes sitios de fijación: la proteína L22, a la que se une la eritromicina, y la proteína L27, que es el lugar de fijación para los macrólidos del grupo de la espiramicina. Ambas proteínas forman parte de la compleja estructura de la subunidad 50s del ribosoma bacteriano, constituida por dos moléculas de ARN y 33 proteínas diferentes. El efecto de los macrólidos puede ser bacteriostático o bactericida, dependiendo de la especie bacteriana sobre la que actúen, del tamaño del inóculo, de la fase de crecimiento en la que se encuentren las bacterias y de la concentración que alcance el antibiótico en el sitio de acción (*target site*). Los macrólidos se caracterizan por requerir de 2 a 4 veces la CIM (concentración inhibitoria mínima) para conseguir la CBM (concentración bactericida mínima), y esta concentración

debe mantenerse el tiempo suficiente, puesto que el efecto bactericida es tiempo-dependiente. La aparición de resistencia puede deberse a diferentes mecanismos como por ejemplo, resistencia intrínseca debido a la dificultad de este antibiótico (una base débil) para atravesar la membrana externa de la pared bacteriana; mutación cromosómica que induce alteraciones en el sitio de fijación de la subunidad 50s, disminuyendo la afinidad del ATB; alteraciones en el ARN ribosómico de la subunidad 50S, mediada por la transferencia de plásmidos que contienen el gen de una ARN-metilasa capaz de metilar la adenina, esta modificación reduce también la fijación del antibiótico a la subunidad ribosómica y también se han descrito mecanismos de inactivación enzimática de los macrólidos por estererasas y fosforilasas bacterianas (Flores, 1984; Kapusnik-Uner *et al.*, 1996).

Poseen una acción eficaz sobre las bacterias Gram positivas y espiroquetas, pero no contra la mayoría de los microorganismos Gram negativos (Rang *et al.*, 2000).

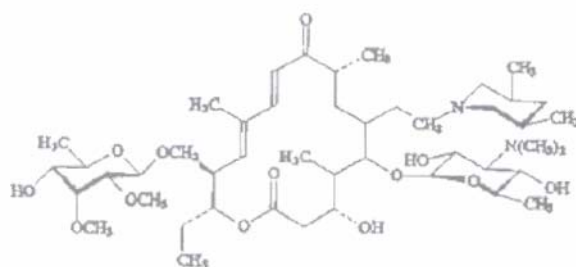


Figura 2: Estructura química de la tilmicosina.

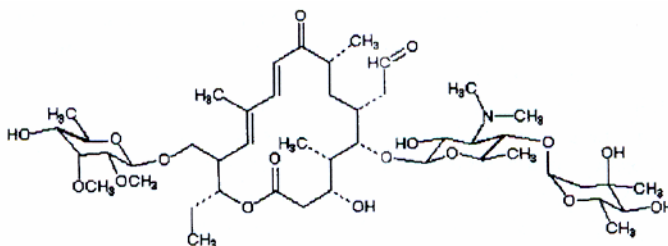


Figura 3: Estructura química de la tilosina.

LINCOSAMIDAS: comprenden dos antibióticos de importancia clínica: la lincomicina y su derivado clindamicina. La lincomicina es producida por *Streptomyces lincolensis*, y su estructura química es un aminoácido unido a un amino azúcar. Las lincosamidas se unen a la subunidad 50s de los ribosomas. Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo por el que inhiben la síntesis de proteínas, aparentemente inhibirían la peptidil-transferasa, interfiriendo la unión del sustrato aminoacil-ARNt al sitio A de la subunidad ribosómica 50s.

El mecanismo de resistencia a lincosamidas es común a eritromicina y estreptograminas (grupo MLS), como por ejemplo la producción de eritromicina esterasas, que catalizan la hidrólisis del anillo de lactona del antibiótico, o la metilación ARN ribosomal de la subunidad 50S (Otto *et al.*, 2006). La resistencia es cruzada entre ambas lincosamidas, y la transferencia por plásmidos puede llevar conjuntamente la resistencia a eritromicina (Flores, 1984; Kapusnik-Uner *et al.*, 1996).

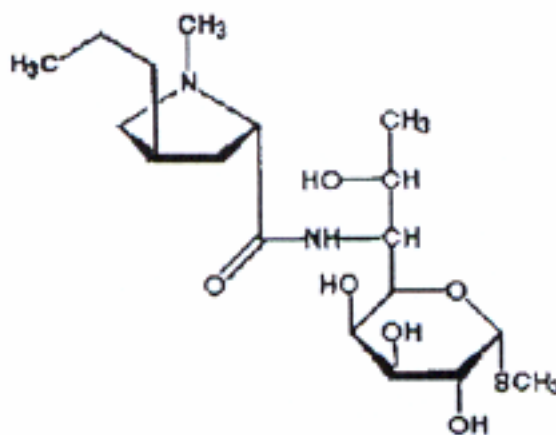


Figura 4: Estructura química de la lincomicina.

De todos los antibióticos antes mencionados, sólo la oxitetraciclina (como clorhidrato) ha sido ampliamente estudiada en colmenas y fue el único antibiótico aprobado para su empleo en colmenas hasta el año 2005 debido a su vida media corta que implica una baja concentración de residuos en miel (Kochansky *et al.*, 1999). En la Argentina se aprobó el uso de tartrato de tilosina, pero aún no se encuentra a la venta, mientras que en Octubre de 2005 se aprobó su uso en EUA y actualmente ya se encuentra disponible en ese mercado. Los restantes antimicrobianos fueron seleccionados sobre la base de estudios parciales realizados tanto *in vitro* y a campo (Alippi *et al.*, 1999; Kochansky *et al.*, 1999; Okayama *et al.*, 1996; Nakajima *et al.*, 1997; Nakajima *et al.*, 1998; Shimanuki & Knox, 1994; Sthaly & Ryan, 1995;).

CAPÍTULO 2

Ensayos de sensibilidad antimicrobiana *in vitro*

1. Materiales y métodos:

Se probó la sensibilidad de 23 cepas de *Paenibacillus larvae* (Tabla 1) a los antibióticos tilosina, tilmicosina, tetraciclina y lincosamida, de acuerdo con metodología previamente descripta (Acar & Goldstein, 1985; Alippi, 1996; Andrews, 2001; Andrews, 2004; Bauer *et al.*, 1966; NCCLS M31 A2, 2002; NCCLS M2 A8, 2003; NCCLS M7 A6, 2003; NCCLS M100 S14, 2005; Shimanuki & Knox, 1994; Sthaly & Ryan, 1995). Las 23 cepas de *P. larvae* utilizadas pertenecen al cepario de la Unidad de Bacteriología del CIDEFI UNLP (n=400) y se eligieron tanto a nivel mundial como de Argentina completamente al azar con el propósito de asegurar una amplia distribución geográfica de las cepas.

Se usaron dos técnicas para evaluar la sensibilidad de las diferentes cepas frente a los cuatro antibióticos estudiados:

1. 1 - ANTIBIOGRAMA: también llamado prueba de susceptibilidad microbiana en disco. Esta prueba de difusión en agar se utiliza de rutina en muchos laboratorios clínicos de humanos y animales, para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias comunes de desarrollo rápido, y también para algunas bacterias con requerimientos nutricionales especiales. Esta prueba de sensibilidad esta indicada para cualquier microorganismo capaz de producir un proceso infeccioso que requiera tratamiento antimicrobiano, si su sensibilidad no puede ser predicha a partir del conocimiento de la idoneidad del germen. Están indicados en los casos en que la bacteria infectante sea capaz de mostrar resistencia a los antibióticos usados habitualmente para el tratamiento. Los mecanismos de resistencia incluyen: producción de enzimas inactivadoras de antibióticos, alteración de su sitio blanco e intercambio

alterado de drogas o eflujo (NCCLS M2 A8, 2003). Existen microorganismos que aun mantienen su sensibilidad original a algunas drogas, por lo que en esos casos, la terapia empírica es totalmente reconocida y no es necesario realizar pruebas de sensibilidad.

Tabla 1: Cepas bacterianas usadas en los ensayos de sensibilidad *in vitro*.

Género y especie	Denominación	Origen geográfico	Fuente
<i>Paenibacillus larvae</i>	PL3	Concordia, Entre Ríos, ARGENTINA ^a	miel comercial
<i>Paenibacillus larvae</i>	PL7	Pigüé, Buenos Aires, ARGENTINA ^a	miel comercial
<i>Paenibacillus larvae</i>	PL14	(San Martín, La Pampa, ARGENTINA ^a	miel comercial
<i>Paenibacillus larvae</i>	PL15	La Plata, Buenos Aires, ARGENTINA ^a	miel comercial
<i>Paenibacillus larvae</i>	PL25	NUEVA ZELANDA ^b	miel comercial
<i>Paenibacillus larvae</i>	PL30	NUEVA ZELANDA ^b	miel comercial
<i>Paenibacillus larvae</i>	PL32	Arroyo Alegre, Córdoba, ARGENTINA ^a	miel comercial
<i>Paenibacillus larvae</i>	PL33	Chascomús, Buenos Aires, ARGENTINA ^a	miel comercial
<i>Paenibacillus larvae</i>	PL34	Valle Medio, Río Negro, ARGENTINA ^a	miel comercial
<i>Paenibacillus larvae</i>	PL35	Chimpay, Río Negro, ARGENTINA ^a	miel comercial
<i>Paenibacillus larvae</i>	PL41	Lecce, ITALIA ^c	miel comercial
<i>Paenibacillus larvae</i>	PL42	Modena, ITALIA ^c	miel comercial
<i>Paenibacillus larvae</i>	PL45	Vanchuse, FRANCIA ^d	miel comercial
<i>Paenibacillus larvae</i>	PL51	Lincoln, Buenos Aires, ARGENTINA ^a	miel comercial
<i>Paenibacillus larvae</i>	PL57	Uppsala, SUECIA ^e	miel comercial
<i>Paenibacillus larvae</i>	PL58	Uppsala, SUECIA ^e	miel comercial
<i>Paenibacillus larvae</i>	PL64	Ranchos, Buenos Aires, ARGENTINA ^a	miel comercial
<i>Paenibacillus larvae</i>	PL71	Grye, POLONIA ^f	miel comercial
<i>Paenibacillus larvae</i>	CCM 4483	REPÚBLICA CHECA ^g	Colección
<i>Paenibacillus larvae</i>	ATCC 9454		Colección
<i>Paenibacillus larvae</i>	PL295	EUA	miel comercial
<i>Paenibacillus larvae</i>	PL373	Boston, EUA	miel comercial
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853 ^h		Colección
<i>Pasteurella multocida</i>	ATCC 43137 ^h		Colección
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 29922 ^h		Colección
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213 ^h		Colección
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923 ^h		Colección

Referencias:

- ^a A. M. Alippi, Centro de Investigaciones de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, La Plata, Argentina.
- ^b M.R. Goodwin, Apicultural Research Unit, Ruakura Research Center, Hamilton, New Zealand.
- ^c Dr. E. Carpana, Istituto Nazionale de Apicoltura, Bologna, Italy.
- ^d Dr. Marc Colin, Station de Phytopharmacie, INRA Avignon, Montfavet Cedex, France.
- ^e I. Fries, Bee Division, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- ^f M. Jelinski, Instytut Weterynarii, Swarzędz, Poland.
- ^g CCM, Czech Collection of Microorganisms, Brno, Czech Republic;
- ^h Instituto Malbrán, Buenos Aires, Argentina.

La metodología usada fue la propuesta por Bauer y col. (1966), con modificaciones (Andrews (2001), NCCLS M2-A8 (2003) y Piddock (1990)) para Test de Susceptibilidad Antimicrobiana con Discos (antibiograma). La prueba del antibiograma de todos los antibióticos se realizó usando el medio MYPGP (Dingman & Sthaly, 1983) como medio basal debido a que *P. larvae* no desarrolla adecuadamente en medio Müller-Hinton.

1. 1. 1 – PREPARACIÓN DE LAS PLACAS DE PETRI CON MYPGP

Se prepara el medio MYPGP (Dingman & Sthaly, 1983) en frascos de tapa a rosca con 200 ml cada uno. La composición del medio es (g/l): 10 g Caldo Müller Hinton (Infusión de carne 300 g; Peptona ácida de carne 17,5 g; Almidón 1,5 g; pH 7,3 ± 0,1) extracto de levadura 15 g; K₂HPO₄ 3g; Piruvato de sodio 1g; Agar-agar 20 g; Glucosa 2 g 1000 ml agua destilada estéril; pH 7,1). Se esteriliza a 1^{1/4} atmósferas durante 15 minutos. Se saca del autoclave y se atempera en Baño María a 45 – 50°C, posteriormente se coloca en placas de Petri de 90 mm de diámetro hasta un nivel de 4 mm de alto, que se corresponde con 25 ml de agar. Las placas abiertas en banco de flujo a temperatura ambiente hasta que solidifique.

Las placas que no se usan en el momento de la preparación se pueden guardar hasta 1 semana en la heladera (4-8°C). Antes de usar, se debe secar la superficie de las placas para remover el exceso de humedad; para ello se dejan en el banco de flujo laminar, abiertas, por el término de 10 –30 minutos.

1. 1. 2- PREPARACIÓN DE LOS DISCOS

Se emplearon discos de papel 3MMW de 6 mm de diámetro (Donados por el Servicio de Antimicrobianos del Instituto Malbrán, ARGENTINA). Los discos se esterilizaron 20 minutos a 1^{1/4} atmósfera y luego se secaron en cámara

caliente (estufa). Una vez secos, se colocaron en orden sobre el dispositivo de llenado (una reja de alambre mosquitero estéril especialmente diseñada para este fin). De esta forma, se separó el disco de la superficie sobre la que apoya la reja, asegurando la absorción de la totalidad del volumen goteado sobre el disco.



Figura 5: Dispositivo para optimizar el llenado de los discos con ATB.

1. 1. 3- PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE ANTIBIÓTICOS

La solución madre de los antibióticos se preparó de acuerdo con la siguiente fórmula propuesta por el Servicio de Antimicrobianos del Instituto Malbrán:

$$\frac{1000 \times \text{carga del disco } (\mu\text{g}) \times \text{volumen de solución a preparar } (\text{ml})}{10 (\mu\text{l}) \times \text{potencia de la droga usada}} = \text{miligramos de la droga que debo pesar}$$

Dónde: # 1000 es un factor de conversión de unidades.
10 es el volumen que deberá absorber cada disco.

EJEMPLO: Para preparar **discos de tilosina de 15 µg**, la droga a usar tiene una potencia de 898 µg/mg, y se cargarán los discos con 10 µl.

$$\frac{1000 \times 15 \times 5}{10 \times 898} = 8.35 \text{ (Este resultado (8.35)) son los miligramos de droga a disolver en 5 ml de agua)}$$

1. 1. 4 – CARGA Y ALMACENAMIENTO DE LOS DISCOS CON ANTIBIÓTICOS

Los discos acomodados sobre el dispositivo de llenado, se gotearon con micropipeta automática 10 µl por disco de las distintas diluciones de tilosina, tilmicosina, lincomicina y tetraciclina, respectivamente. Una vez goteados los discos se dejaron secar en el banco de flujo laminar durante aproximadamente 25 minutos.

Los discos se conservaron en frascos sellados con parafilm, conteniendo un desecante (silicagel), y -20°C hasta el momento de usar.

Los frascos con los discos fueron retirados del freezer 2 horas antes de su empleo, con el fin de lograr un equilibrio con la temperatura ambiente antes de ser abiertos, evitando de esta forma la condensación de humedad.

1. 1. 5 -PREPARACIÓN DEL INÓCULO BACTERIANO

El método usado para la preparación del inóculo fue el propuesto por la NCCLS M2 A8 (2003) para microorganismos con exigencias nutricionales especiales. Se realizó a partir de células vegetativas de las diferentes cepas de *P. larvae* (Tabla 1) desarrolladas en agar MYPGP durante 48 h en aerobiosis a 37°C. Cada una de las cepas se suspendió en agua destilada estéril en tubos tapa a rosca y se ajustaron a una concentración $2,87 \times 10^8$ células/ml ($A_{620nm} = 0,388$) equivalente al estándar 1 de la escala de McFarland. Con esta concentración bacteriana se logró un crecimiento semiconfluyente necesario para llevar a cabo un antibiograma. El inóculo se empleó dentro de los 15

minutos para evitar una disminución de la viabilidad de las células vegetativas.

1. 1. 6 –INOCULACIÓN DE LAS PLACAS DE AGAR

Mediante un hisopo de algodón estéril se tomó el inóculo sumergiendo en el tubo y removiendo por rotación contra las paredes del mismo.

Se inoculó la superficie del agar por hisopado en tres direcciones, rotando la placa 60° cada vez para asegurar una completa distribución del inóculo. Finalmente se hisopó la circunferencia de la placa. De esta forma se obtuvieron zonas de inhibición uniformemente circulares, y un desarrollo bacteriano homogéneo.

Se dejaron las placas abiertas dentro del banco de flujo laminar durante 5 minutos, como mínimo, para que el exceso de humedad superficial sea absorbido por el medio de cultivo.

1. 1. 7 - COLOCACIÓN DE LOS DISCOS CON ANTIBIÓTICOS EN LAS PLACAS INOCULADAS

Los discos con la carga de cada ATB se aplicaron dentro de los 15 minutos de la inoculación. Se empleó un solo disco por placa de Petri de 90 mm en posición central.

Los discos se tomaron con pinzas estériles y una vez colocados sobre el medio de cultivo se ejerció una ligera presión con el fin de evitar que se movieran o desprendieran.

1. 1. 8 - INCUBACIÓN DE LAS PLACAS

Las placas inoculadas y con los discos ya aplicados se incubaron invertidas a 37°C por el término de 48 hs. La incubación se llevó a cabo dentro de los 15

minutos posteriores a la colocación.

1. 1. 9 – LECTURA DE LAS PLACAS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La lectura de las placas se realizó a las 48 horas de incubación midiendo el diámetro de la zona de inhibición, incluyendo el disco mediante un calibre.

El área que no mostró desarrollo obvio a ojo desnudo se consideró para la medición, sin tener en cuenta colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona (NCCLS M2 A8, 2003).

Se consideraron 3 categorías de interpretación:

SENSIBLE (S): esta categoría implica que una infección dada por la cepa en estudio puede ser tratada apropiadamente con las dosis de antibióticos recomendadas para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que hubiera contraindicaciones.

INTERMEDIA (I): esta categoría incluye cepas cuya Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) a un determinado antibiótico puede ser alcanzada en los tejidos deseados. La respuesta al tratamiento en estos casos puede ser menor que para cepas sensibles. Esta categoría sugiere que puede lograrse éxito clínico aumentando la concentración del antimicrobiano en el sitio de acción, siempre que las dosis puedan ser incrementadas.

RESISTENTE (R): las cepas resistentes no son inhibidas por las dosis habituales de uso.

Es importante denotar que hasta el momento no existen puntos de corte para antibiograma o CIM claramente delimitados a nivel mundial para el

antibiótico tetraciclina y la bacteria *P. larvae*. Para el caso de tilosina, tilmicosina y lincomicina no existen datos.

1. 1. 10 - PROCEDIMIENTOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD

Con el propósito de corroborar que la carga de los discos fue la correcta, se realizó un control de calidad para cada lote de discos cargados con los distintos ATB. Se usaron las cepas de referencia *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pasteurella multocida* ATCC 51689, siguiendo la técnica descrita por la NCCLS M2 A8 (2003), pero empleando MYPGP como medio basal. Los discos que no entraron dentro de los rangos esperados por la NCCLS fueron descartados.

Para los casos donde no existen rangos disponibles (ND) para control de calidad, se procedió de la siguiente forma (Técnica provista por el Departamento de Antimicrobianos del Instituto Malbrán, Argentina). Se prepararon 3 tipos de discos patrones: *Grupo 1* discos con la carga de ATB propuesta; *Grupo 2* discos con el doble de la carga propuesta y *Grupo 3* discos con la mitad de la carga propuesta. Luego de sembrar las placas de Petri con las cepas control, se colocan los discos y se llevan estufa, y se miden los diámetros de inhibición luego de la incubación a 37° C durante 18 h. Posteriormente se calcularon los diámetros promedio para cada uno de los discos. Finalmente se trazó una recta en un gráfico donde el eje X se correspondía con "**carga del disco (μg)**" y el eje de las Y con "**diámetro de halo (mm)**" con los tres puntos obtenidos de acuerdo con la carga del disco y el diámetro de halo. Una vez que la gráfica está lista pruebo los discos de mi producción (aproximadamente un 10%) y con los valores de halos (mm) máximo, mínimo y promedio hallados los interpolo en la gráfica con el fin de obtener valores de su valor correspondiente de "carga de disco". Teniendo en cuenta que la carga óptima del disco se corresponde con el 100%, las cargas obtenidas de los halos máximos, mínimo y promedio se corresponderán con un

porcentaje que BAJO NINGÚN PUNTO DE VISTA debe ser superior al 135 % (para valor máximo), inferior al 75% (para valor mínimo) y similar al 100% para el valor promedio de los discos preparados. Los discos fueron cargados con:

- Tilosina 15 µg /disco (Experiencia del laboratorio).
- Tilmicosina 15 µg /disco (NCCLS M31 A2 (2003)).
- Tetraciclina 5 µg /disco (USDA (2000)) y 30µg /disco (NCCLS M100 S15 (2005)).
- Lincomicina 15 µg /disco (Experiencia del laboratorio).

El propósito de realizar controles de calidad fue:

Monitorear la precisión y exactitud de los procedimientos usados para la evaluación de la sensibilidad bacteriana de los antimicrobianos, teniendo en cuenta que no existen valores de referencia para *P. larvae* y monitorear el comportamiento de los medios y reactivos usados.

Para todas las cepas control de calidad se procedió de la forma antes detallada, con las siguientes diferencias:

Se respetó la concentración de 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/ml) propuesta por NCCLS M7 A6 (2003) para las cepas de control de calidad y las placas se evaluaron a las 18 h, de acuerdo con lo que establece el protocolo.

1. 2 - CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) EN MEDIO SÓLIDO: La CIM se define como “la mínima concentración de un antimicrobiano que previene el desarrollo visible de un microorganismo en una prueba de sensibilidad por dilución en caldo o agar” (NCCLS M31-A2, 2002; NCCLS M7-A6, 2003; Andrews, 2004). El objetivo de realizar CIM es definir los **Puntos de corte** (“*breakpoints*”) que son las concentraciones discriminatorias usadas en la interpretación de resultados del test de sensibilidad y para discriminar entre

aislamientos sensibles, intermedios y resistentes" (MacGowan & Wise, 2004). La CIM es considerada como la **Prueba de oro** ("gold standard") para determinar la susceptibilidad de un microorganismo frente a un antimicrobiano; además se emplea para juzgar la "performance" de otros métodos usados para testear susceptibilidad antimicrobiana (Andrews, 2004).

La metodología usada fue la propuesta por la NCCLS (NCCLS M7-A6, 2003) para CIM en medio sólido, con las modificaciones de Alippi y col. (2005). La prueba de CIM de todos los antibióticos se realizó usando el medio MYPGP (Dingman & Stahly, 1983) como medio basal. Se prepararon soluciones stock de los antibióticos a concentraciones al menos diez veces mayor que la máxima concentración a probar (5120 µg/ml), según recomendación de la NCCLS M7-A6 (2003) empleando las siguientes fórmulas para determinar la cantidad de polvo antimicrobiano a usar:

$$\text{Pesada de ATB (mg)} = \frac{\text{Volumen de SE (ml)} \times \text{Concentración de SE (}\mu\text{g/ml)}}{\text{Potencia de ATB (}\mu\text{g/mg)}}$$

donde:

ATB = antibiótico

SE = Solución estéril a preparar

Al realizar la pesada, generalmente se obtiene un exceso de droga; en ese caso, conviene aplicar la siguiente fórmula, para reformular la cantidad de solvente a utilizar:

$$\text{Volumen de SE (ml)} = \frac{\text{Pesada de ATB (mg)} \times \text{Potencia de ATB (}\mu\text{g/mg)}}{\text{Concentración de SE (}\mu\text{g/ml)}}$$

EJEMPLO: Para preparar aproximadamente 100 ml de una solución madre de 1280 µg/ml de agente antimicrobiano con una potencia de 750 µg/mg, deben pesarse entre 170 y 200 mg de droga. Si el peso final del antibiótico fue 182.6

mg, el volumen de solvente necesario para diluir el mismo se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Volumen (ml)} = \frac{\text{(Peso)} \times \text{(Potencia)}}{\text{(Concentración deseada)}} = \frac{182,6 \text{ mg} \times 750 \text{ ug/mg}}{1280 \text{ ug/ml}} = 107,0 \text{ ml}$$

En este caso, los 182,6 mg de droga pesada se deben disolver en 107 ml de diluyente.

Para el caso particular de Tetraciclina (SIGMA ®) se usó etanol 95% como solvente y agua destilada estéril como diluyente; para Lincomicina (SIGMA ®) y Tilosina (SIGMA ®), las soluciones stock se prepararon en agua destilada estéril. En todos los casos se esterilizaron a través de un filtro de 22 µm acoplado a una jeringa; luego se prepararon alícuotas y se congelaron a -20°C hasta su uso. La tilmicosina en Argentina solo se consigue en solución a una concentración de 300.000 µg/ml (Micotil ®, ELANCO) pero, de igual forma que para los otros antibióticos, se diluyó en agua destilada estéril, se prepararon alícuotas y se guardaron en freezer a -20 °C.

En todos los casos, una hora antes de su empleo los antibióticos se retiraron del freezer y/o heladera atemperarlos.

1. 2. 1 – PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES DE TRABAJO

Para todos los antimicrobianos se siguió el esquema propuesto por la NCCLS M7-A6 (2003) con modificaciones. Una parte de la solución de antimicrobiano se diluye en 9 partes de agar fundido y, todas las diluciones a probar serán diluciones o concentraciones en base 2 a partir de 1µg /ml. (Tabla 2).

Solución de antimicrobianos							
Paso	Concentración de antibiótico (µg /ml)	Fuente	Volumen de fuente (ml)	Diluyente (ml)	Concentración Intermedia (µg /ml)	Conc. Final Dilución 1:10 (µg /ml)	Log 2
--	5120	Stock	---	---	5120	512	9
1	5120	Stock	2	2	2560	256	8
2	5120	Stock	1	3	1280	128	7
3	5120	Stock	1	7	640	64	6
4	640	Paso 3	2	2	320	32	5
5	640	Paso 3	1	3	160	16	4
6	640	Paso 3	1	7	80	8	3
7	80	Paso 6	2	2	40	4	2
8	80	Paso 6	1	3	20	2	1
9	80	Paso 6	1	7	10	1	0
10	10	Paso 9	2	2	5	0.5	-1
11	10	Paso 9	1	3	2.5	0.25	-2
12	10	Paso 9	1	7	1.25	0.125	-3
13	1.25	Paso 12	2	2	0.625	0.0625	-4
14	1.25	Paso 12	1	3	0.3125	0.0313	-5
15	1.25	Paso 12	1	7	0.1562	0.015	-6
16	0.1562	Paso 15	1	2	0.0781	0.0078	-7

Tabla 2: Preparación de Antibióticos (NCCLS M7-A6, 2003).

1. 2. 2 – PREPARACIÓN DE LAS PLACAS DE PETRI CON MYPGP Y LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ATB

Se agregó la solución de antibiótico apropiado para cada dilución, en el agar fundido y enfriado a 45 – 50 °C en Baño María.

Se agitó la mezcla de agar-antibiótico mediante varilla de vidrio estéril y se colocó en las Placas de Petri hasta alcanzar una profundidad de 4 mm (\cong 25 ml). La mezcla agar-antibiótico se debe colocar en forma rápida en las placas para evitar la solidificación total o parcial de la misma dentro del recipiente de mezclado y la formación de burbujas.

Las placas se dejaron solidificar a temperatura ambiente en banco de flujo laminar horizontal Tipo I.

Sólo se preparaban las placas que se iban a usar en el día. En caso que se prepararan placas adicionales, estas se dejaban secar, se envolvían en bolsas plásticas selladas y se guardaban a 2-8 °C 5 días como máximo. Antes de usar

estas placas se abrían en el banco de flujo, y se dejaban secar durante treinta minutos para eliminar el agua de condensación.

1. 2. 3 – CONTROL DE CRECIMIENTO

Se usaron placas con el medio base (MYPGP) sin el agregado de antibióticos como control de crecimiento, tanto para las cepas de *P. larvae* como para las cepas de control de calidad.

1. 2. 4 - PREPARACIÓN DEL INÓCULO

El método usado para la preparación del inóculo fue el propuesto por la NCCLS M7 A6 (2003) para microorganismos con exigencias nutricionales especiales. Se realizó a partir de células vegetativas de las diferentes cepas de *P. larvae* crecidas en agar MYPGP durante 48 hs a 37°C, se suspendieron las cepas bacterianas en agua destilada estéril y se ajustaron a $2,87 \times 10^8$ células/ml ($A_{620nm} = 0,388$, equivalente al estándar 1 de la escala de McFarland). El inóculo se usó dentro de los 15 minutos de realizado, de forma de evitar la disminución de la viabilidad de las células vegetativas.

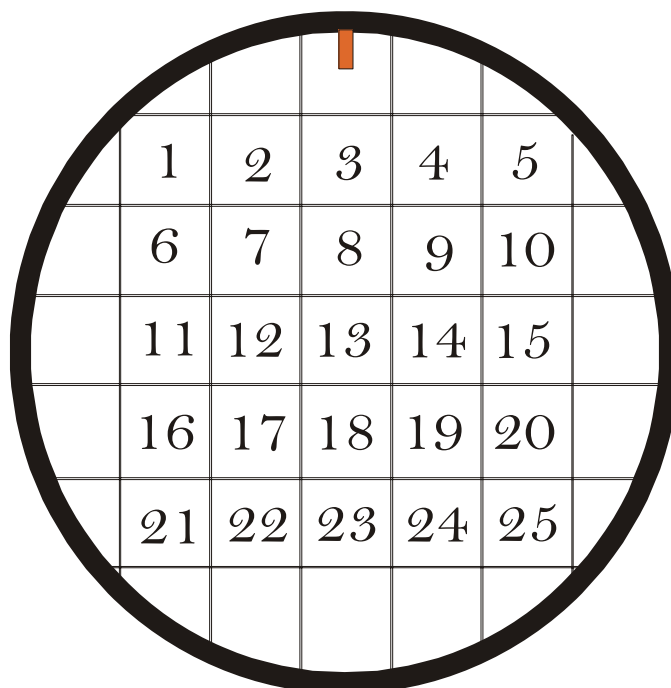
1. 2. 5 –SIEMBRE DE LAS PLACAS DE AGAR

Los tubos con las suspensiones bacterianas de las distintas cepas de *P. larvae* se ajustaron al valor 1 McFarland ($2,87 \times 10^8$ células/ml) y se colocaron en una gradilla. La siembra se realizó sobre la superficie del agar con la correspondiente concentración de ATB, en forma de gotas de 10 μ l tomadas con micro pipeta automática.

Se marcó cada placa para conocer la ubicación de los inóculos en la misma, según el Esquema 1. Se realizaron 5 repeticiones por placa para cada cepa estudiada.

Para comenzar, se inoculó una placa control sin antibiótico (control de viabilidad), y luego las placas conteniendo las distintas concentraciones de los antibióticos en estudio, comenzando por la menor concentración. Se inoculó una segunda placa control de viabilidad al finalizar la serie, para asegurar ausencia de contaminación (control de pureza), y la viabilidad de las cepas al finalizar el procedimiento.

Todas las placas sembradas se colocaron en incubación dentro de los 15 minutos de sembradas, de forma tal de evitar cualquier error de lectura debido a diferentes tiempo de incubación.



Esquema 1: Distribución de las cepas en una placa de Petri de 9 cm de diámetro, la marca roja se realizaba cortando el agar de forma de poder diferenciar la parte superior de la placa.

1. 2. 6 - INCUBACIÓN DE LAS PLACAS

Las placas inoculadas se mantuvieron a temperatura ambiente y abiertas

dentro de la campana de flujo laminar hasta que se absorbió el líquido que acompañó al inóculo (nunca más de 30 minutos). Luego se incubaron invertidas a 37°C por el término de 48 hs (Alippi *et al.*, 2005).

1. 2. 7 - DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)

Para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (Punto Final), las placas se colocaron sobre una superficie oscura y lisa. La CIM se registró como el valor de la menor dilución que inhibió completamente el desarrollo bacteriano; no se tuvo en cuenta el desarrollo de una simple colonia o una tenue película causada por el depósito del inóculo.

1. 2. 8 – PROCEDIMIENTOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD

Se realizaron controles de calidad con las cepas de referencia *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 (provistas por el Servicio de Antimicrobianos del Instituto Malbrán, Buenos Aires, ARGENTINA) y *Pasteurella multocida* ATCC 51689 (provista por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, ARGENTINA). Para las pruebas de CIM se usaron las mismas cepas que para los controles de calidad del método del antibiograma, con la salvedad que el *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es de poca utilidad en estas pruebas de difusión por su alta sensibilidad a la mayoría de los antibióticos, por lo tanto se lo reemplazó por el *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

El propósito de realizar controles de calidad fue:

Monitorear la precisión y exactitud de los procedimientos y medio de cultivo usados para la evaluación de la sensibilidad bacteriana de los antimicrobianos, dado que no existen valores de referencia para *P. larvae*.

Las 4 cepas de referencia usadas como control de calidad se sembraron en todas las placas que se usaron para este ensayo, realizándose cinco repeticiones por placa. Para todas las cepas control de calidad se procedió de la forma antes detallada con las siguientes diferencias:

- Se respetó la concentración de 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/ml) propuesta por NCCLS M7 A6 (2003) y las placas se leyeron a las 18 h, de acuerdo con lo que establece el protocolo.

Este procedimiento se realizó para los cuatro antibióticos probados; mientras que el rango que se usó para cada droga varió de acuerdo con la sensibilidad específica de la droga con respecto a la población bacteriana en estudio, los rangos probados fueron:

Concentración en medio de cultivo	Tilosina (µg/ml)	Tilmicosina (µg/ml)	Lincomicina (µg/ml)	Tetraciclina(µg/ml)
0,0078	X			
0,015	X			
0,0313	X	X		
0,0625	X	X	X	X
0,125	X	X	X	X
0,250	X	X	X	X
0,500	X	X	X	X
1	X	X	X	X
2			X	X
4			X	X
8				X
16				X
32				X
64				X
128				X

2. Resultados y discusión:

2. 1 - ANTIBIOGRAMA

2. 1. 1 – CONTROL DE CALIDAD: Los valores obtenidos para las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pasteurella multocida* ATCC 51689 resultaron dentro de los límites aceptables para las cepas usadas como control de calidad usando MYPGP en lugar de Müller-Hinton como medio basal (Tabla 3). Los controles que se realizaron, tanto para los casos donde existían rangos disponibles como para los que no, presentaron porcentajes de correlación que fluctuaron entre 85% y 120% (valor máximo permitido 135% y valor mínimo permitido 75%). Esto demostró que el medio MYPGP fue muy estable y puede ser usado para pruebas de sensibilidad, ya que las cepas control de calidad se ajustaron perfectamente a los parámetros propuestos por la NCCLS en los documentos M31 A2 (2002), M100 S15 (2005), Shryock *et al.* (1995), y a los límites de correlación esperados en los casos donde no existían rangos disponibles.

Tabla 3: Rangos aceptables de las cepas de referencia usadas como control de calidad (QCG) para CIM ($\mu\text{g/ml}$) y antibiograma (mm de halo de inhibición), datos propuestos por la NCCLS o Shryock *et al* (1995) para el caso de *Pasteurella multocida* y tilmicosina. Los rangos QCG son datos obtenidos con medio Müller-Hinton y los rangos CIDEFI son datos obtenidos usando medio MYPGP.

		Tetraciclina		Tilosina		Tilmicosina		Lincomicina	
		CIM ($\mu\text{g/ml}$)	Antibiograma (mm)	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	Antibiograma (mm)	CIM ($\mu\text{g/m}$)	Antibiograma (mm)	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	Antibiograma (mm)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	QCG	8-32 ¹	ND	≥ 32 ³	ND	>64 ³	ND	ND	ND
	CIDEFI	16	6	32	6	128	6	128	6
<i>Pasteurella multocida</i> ATCC 51689	QCG	0,5 ²	ND	8 ²	ND	0,5-4 ⁴	13-21 ⁴	ND	ND
	CIDEFI	0,5	6	8	20	4	17	4	14
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	QCG	0,5-2 ¹	18-25 ³	>32 ³	ND	≥ 64 ³	ND	ND	ND
	CIDEFI	1	23	128	6	64	6	64	6
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y 29213 ⁵	QCG	0,12-1 ₁	24-30 ³	0,5-4 ³	ND	1-4 ³	17-21 ³	ND	ND
	CIDEFI	0,5	26,5	2	29.5	1	19	1	23

REFERENCIAS:

QCG: Límites aceptables de control de calidad para la cepa en uso.

CIDEFI: Valores obtenidos en esta tesis.

ND: Límites no definido por la NCCLS.

¹ NCCLS M100-S15 (2005).

² Com. Pers. Dr. Gerardo Leotta, Director del Dpto. de Microbiología. Fac. de Cs. Vet. UNLP.

³ NCCLS M31-A2 (2002).

⁴ Shryock *et al* (1995).

⁵ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se usa para control en antibiograma y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 se usa como control para CIM.

2. 1. 2 – TETRACICLINA: Se empleó tetraciclina para generar datos de sensibilidad *in vitro*, a pesar que a campo se usa oxitetraciclina. Esta particularidad se debe a que todos los estándares realizados a nivel mundial están hechos con tetraciclina, ya que a partir de los valores de sensibilidad obtenidos *in vitro* se puede extrapolar su valor para otras tetraciclinas, como la oxitetraciclina, clorhidrato de oxitetraciclina y doxiciclina (NCCLS M31 A2, 2005; Kochansky *et al.*, 2001).

2. 1. 2. 1 - TETRACICLINA CON DISCOS DE 5 µg: esta clase de discos con una carga de 5 µg solo se usan en el Agricultural Research Service (USDA) para testear la sensibilidad de aislamientos de campo de *P. larvae* (Shimanuki & Knox, 2000; Cox, 2000). Debido a esto no existe ningún tipo de control de calidad propuesto por la NCCLS. Por esta razón no se realizaron controles de calidad con las cepas recomendadas para ese fin por la NCCLS; como controles se usaron porcentajes de correlación con valores que oscilaron entre 85% y 120%, y exclusivamente para los discos de tetraciclina cargados con 5 µg una repetición extra con el fin de evaluar la estabilidad del método. Teniendo en cuenta los puntos de corte propuestos por Cox (2000) (RESISTENTES halos < 20 mm; MODERADAMENTE RESISTENTES halos 21 – 40 mm; SUSCEPTIBLES halos >41 mm) o Evans (2003) (RESISTENTES halo < 15 mm), de las 23 cepas de *P. larvae* estudiadas, 3 cepas fueron resistentes, 12 cepas resultaron moderadamente resistentes y 8 cepas fueron susceptibles.

2. 1. 2. 2 - TETRACICLINA CON DISCOS DE 30 μg : 30 μg de tetraciclina por disco es la carga propuesta por la NCCLS en sus documentos M100-S15 (2005) y M31-A2 (2002) para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias en general y de bacterias aisladas de animales respectivamente. Teniendo en cuenta los puntos de corte propuestos por NCCLS (Tabla3), las cepas PL373 y PL42 serían resistentes y PL 295 se encontraría dentro del rango de intermedias. Comparando los resultados obtenidos con discos cargados con 5 μg y con 30 μg , se observa que con los discos de 30 μg disminuye la cantidad de cepas que entran en la categoría de resistente (de tres a dos), pero cae notoriamente la cantidad de cepas que entran en el rango de moderadamente resistentes (ó intermedia), de 12 a solo una cepa. Teniendo la posibilidad de optar entre dos discos con cargas diferentes ya estandarizados, es conveniente usar los de menor carga; de esta forma se detecta fácilmente pequeños cambios en la sensibilidad de las cepas en estudio.

2. 1. 3 - TILOSINA: debido a que no existe hasta la fecha (2006) ninguna carga de disco propuesta por la NCCLS para tilosina, en este trabajo se propone la carga de 15 μg de tilosina por disco; el valor de esta carga se decidió en base a lo establecido para la tilmicosina (otro macrólido de 16 anillos como la tilosina) (NCCLS M31 A2, 2002). Es importante tener en cuenta que la carga de los discos se puede decidir de manera aleatoria y luego ser cambiada si se considera necesario (Acar & Goldstein, 1985). Los puntos de corte que se proponen en este trabajo para tilosina en discos son los mismos que tiene tilmicosina (Anexo de Tablas, Tabla 4), ya que ambas drogas poseen similar estructura molecular y carga iónica, por lo que se supone que tienen similar migración en agar. Además, se tuvo en cuenta que diámetros de halo ≤ 15 mm se consideran resistentes, halos \geq de 16 mm y \leq a 29 mm categoría intermedia y halos \geq a 30 mm son considerados altamente sensibles (Acar & Goldstein, 1985; Piddock, 1990). De acuerdo con los puntos de cortes propuestos, las 23

cepas usadas en este trabajo fueron altamente sensibles, ya que sus diámetros oscilaron entre 29,5 y 55,5 mm.

2. 1. 4 - LINCOMICINA: debido a que para esta droga no existe hasta la fecha (2006) ninguna carga de disco propuesta por la NCCLS, pero teniendo en cuenta estudios previos (Kochansky *et al.*, 2001; Kochansky *et al.*, 2005) y, sabiendo que la única lincosamida que se prueba en disco es la clindamicina (carga de discos de 2 µg) que tiende a ser más activa *in vitro* que la lincomicina (NCCLS M31 A2, 2002), se propone la carga de discos con 15 µg de lincomicina. De acuerdo con los puntos de corte propuestos empíricamente por Acar & Goldstein (1985) y Piddock (1990) no se encontraron cepas resistentes (halos ≤ 15 mm), 4 cepas (PL7, PL14, PL16, PL295) caerían dentro de la categoría intermedia (diámetros que oscilaron entre 16 y 29 mm) y las 19 cepas restantes serían altamente susceptibles con halos que oscilaron entre 30 y 48,5 mm.

2. 1. 5 - TILMICOSINA: La NCCLS propone el empleo de discos con 15 µg de tilmicosina (M31-A2, 2002) para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de animales. Teniendo en cuenta los puntos de corte propuestos por NCCLS (Tabla3), las 23 cepas testeadas resultaron sensibles, de las cuales 21 resultaron altamente sensibles con halos que oscilaron entre 30 y 50 mm.

2. 2 - CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)

2. 2. 1 - CONTROL DE CALIDAD: Los valores obtenidos para las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Pasteurella multocida* ATCC 51689 usadas como control de calidad fueron adecuados (Tabla 3). En efecto, para todos los casos donde existen valores, estos resultaron dentro de los límites

aceptables propuestos por la NCCLS (NCCLS M31 A2 (2002) y NCCLS M7 A6 (2003)), usando MYPGP como medio basal. Para los casos donde no existen valores de referencia, se controló que la diferencia que existió entre las distintos lotes de medio de cultivo generara resultados similares; caso contrario, se re-testaban los lotes o se preparaban nuevos.



Foto 1: Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima en medio sólido usando MYPGP como medio basal, Tilosina 0,0625 $\mu\text{g/ml}$. De arriba hacia abajo cepas PL30, PL32 (sin crecimiento ya que son sensibles a la concentración probada), *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

2. 2. 2 - TETRACICLINA: La CIM de las cepas analizadas presentó una distribución bimodal, con una CIM_{50} de $1\mu\text{g/ml}$, CIM_{90} $16\mu\text{g/ml}$ y un rango de $0,125\text{-}128\mu\text{g/ml}$ (Figura 6a). Teniendo en cuenta esta distribución bimodal y lo propuesto por Acar & Goldstein (1985) y MacGowan & Wise (2004) para este

tipo de distribuciones, es posible observar que en la población estudiada existen cepas SUSCEPTIBLES y RESISTENTES, que poseen uno o varios mecanismos de resistencia; a partir de la distribución de sensibilidad de la población salvaje estudiada, se propone como puntos de corte para tetraciclinas y *Paenibacillus larvae* los siguientes: SUSCEPTIBLE $\leq 4 \mu\text{g/ml}$, INTERMEDIO $8 \mu\text{g/ml}$ y RESISTENTE $>16 \mu\text{g/ml}$, puntos que coinciden perfectamente con los propuestos para patógenos aislados de animales por la NCCLS M31 A2 (2002) y tetraciclina.

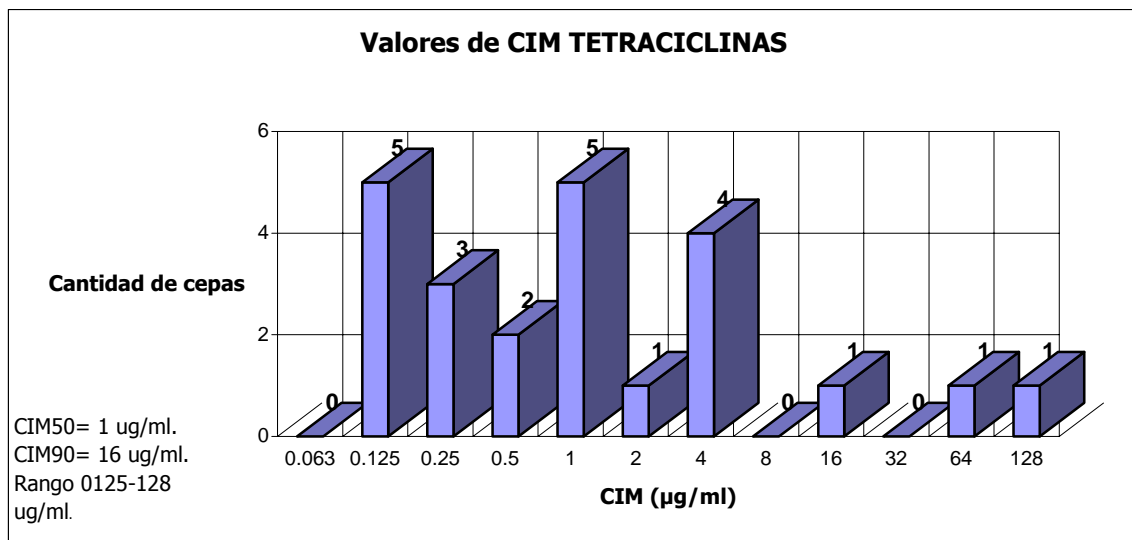


Figura 6a: Distribución de los valores de CIM de tetraciclina para la población de *P. larvae* estudiada.

Los valores de CIM obtenidos muestran que 20 de las 23 cepas estudiadas son SUSCEPTIBLES, en tanto las cepas PL42, PL295 y PL373 cuadran dentro de la categoría RESISTENTES. Asimismo, los valores de CIM₅₀ y CIM₉₀ muestran que a pesar que la población es mayoritariamente SENSIBLE considerando los puntos de corte propuestos previamente, existe un corrimiento de la población bacteriana hacia valores intermedios (cuatro cepas con valores = $4 \mu\text{g/ml}$) (MAFF, 1998), comparando con datos de Australia (59 cepas CIM₅₀ $0,04 \mu\text{g/ml}$ y CIM₉₀ $0,05 \mu\text{g/ml}$) (Hornitzky, 2005), Uruguay (8 cepas, todas con CIM < 2.5

$\mu\text{g/ml}$) (Piccini & Zunino, 2001) y Japón (28 cepas CIM_{50} 0,39 $\mu\text{g/ml}$ y CIM_{90} 0,39 $\mu\text{g/ml}$) (Okayama *et al*, 1996). Casos de resistencia ya fueron encontrados en Argentina, Canadá y Estados Unidos (Alippi, 2000; Colter, 2000; Evans, 2003 y Miyagi *et al.*, 2000). Las tres cepas RESISTENTES (PL42, PL295 y PL373) fueron correctamente discriminadas, tanto por CIM como por antibiograma usando discos de 5 μg y de 30 μg .

Con el fin de encontrar la mejor relación entre CIM y antibiograma y, de esta forma poder discernir cual sería la carga de tetraciclinas en discos adecuadas para chequear sensibilidad frente a *P. larvae*, se plotearon dos scattergramas, uno con los diámetros de inhibición de los discos de 5 μg y otro con los discos de 30 μg , para ambos casos frente al Log_2 de la CIM; a partir de estos datos se trazaron rectas de regresión (Piddock, 1989; Acar & Goldstein, 1985). Para discos con 5 μg de tetraciclina el valor de la curva de regresión fue de $r=0,7656$ (Figura 7a) con un valor de $p < 0,01$ a un nivel de confianza del 99%, lo cual muestra una buena correlación entre los valores de CIM y los halos de inhibición del antibiograma; además, se observan claramente las subpoblaciones SUSCEPTIBLES y RESISTENTES. Para el caso de los discos de 30 μg el valor de la curva fue de $r=0,3455$ (Figura 7b) con un valor de $p < 0,01$ a un nivel de confianza del 99%, lo cual muestra una buena correlación entre los dos parámetros usados pero baja correlación entre los valores de CIM y los halos de inhibición del antibiograma comparando con lo valores obtenidos para discos de 5 μg ; no obstante pueden observarse claramente las subpoblaciones SUSCEPTIBLES y RESISTENTES. Este valor tan bajo de correlación probablemente se deba a que a pesar que en la población estudiada existen cepas RESISTENTES, la mayoría son SUSCEPTIBLES y altamente susceptibles según la escala propuesta por Cox (2000). Cuando estas cepas altamente susceptibles se prueban con una carga de disco grande (30 μg / disco), genera halos muy grandes para todas (halos mayores de 60 mm), perdiendo de esta forma poder de resolución el antibiograma entre las cepas susceptibles y altamente susceptibles. Las moléculas tiene un poder de

migración en agar que esta determinado por un coeficiente de migración (Barry, 1985) "Bajo condiciones estandarizadas, la distancia alcanzada por un agente antimicrobiano en un determinado período de tiempo es proporcional a la concentración del antimicrobiano en el reservorio. Por supuesto, el tamaño, la forma de la molécula y su carga iónica total influirán en la tasa de difusión". Teniendo en cuenta esta definición se deduce que para el caso de las cepas RESISTENTES no existe diferencia en el diámetro de halo de inhibición ya que estas son resistentes sin importar la carga antimicrobiana, en tanto que para las cepas SUSCEPTIBLES y ALTAMENTE SUSCEPTIBLES los diámetro de halo son mucho más grandes, tanto que no existe una relación lineal directa entre diámetro de halo y carga de disco, de forma tal que para muchos casos el diámetro estaría determinado más por el poder de migración de la molécula antimicrobiana que por la sensibilidad propia de la bacteria en estudio. Esta particularidad se puede apreciar en las que presentan halos mayores a 60 mm ya que tiene valores de CIM que oscilan entre 0,125 y 4 µg/ml, aunque no se observa una relación lineal entre el diámetro de halo y el valor de la CIM.

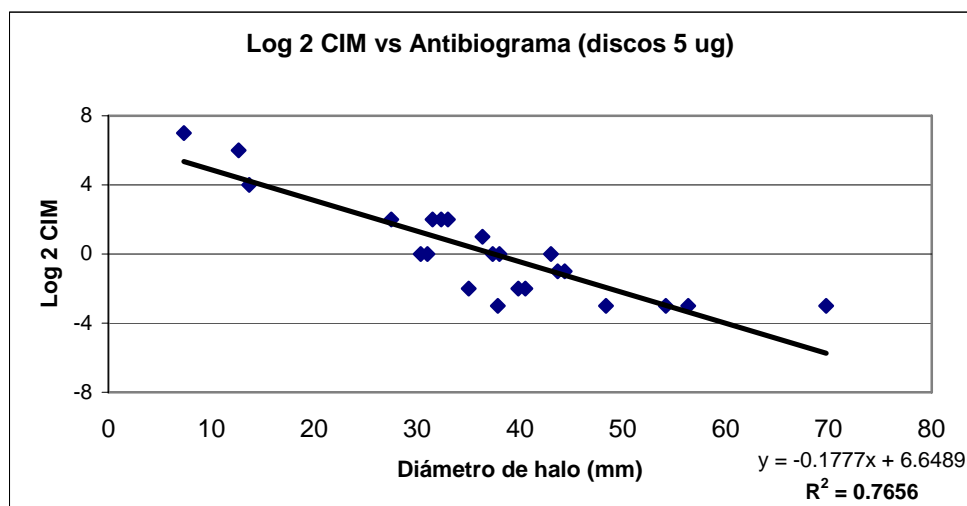


Figura 7a: Curva de regresión de los valores de inhibición por disco 5 µg vs. Log2 CIM para oxitetraciclina.

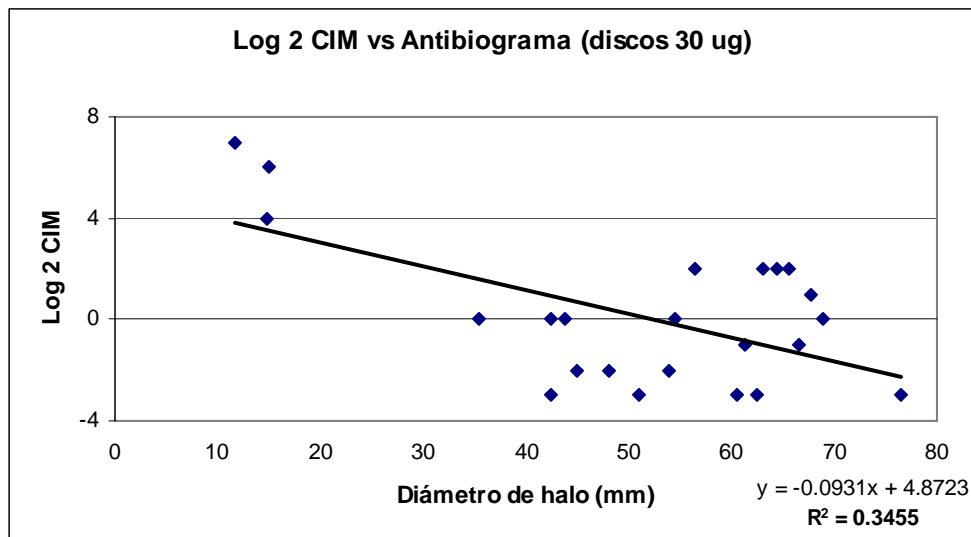


Figura 7b: Curva de regresión de los valores de inhibición por disco 30 μg vs. Log2 CIM para oxitetraciclina.

Hasta el presente, no se ha encontrado correlación alguna entre resistencia y haplotipo bacteriano (Evans, 2003). La resistencia a tetraciclina se debe principalmente a la adquisición de determinantes *Tet* más que a mutaciones cromosomales (Roberts, 1994), lo que hace suponer un origen independiente de la resistencia principalmente debida a material de naturaleza epigenético como plásmidos o transposones (Evans, 2003).

2. 2. 3 - TILOSINA: La CIM presentó una distribución unimodal, con una CIM₅₀ de 0,125 $\mu\text{g/ml}$, una CIM₉₀ 0,25 $\mu\text{g/ml}$ y un rango de 0,0313-0,500 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 6b). Valores con alta sensibilidad se encontraron en estudios previos (Alippi *et al.*, 1999; Alippi *et al.*, 2005; Elzen *et al.*, 2002 a,b; Hitchcock *et al.*, 1970; Moffett *et al.*, 1970; Peng *et al.*, 1996). Okayama y col. (1996) trabajando con 28 cepas de Japón de *P. larvae* obtuvieron valores de CIM₅₀ de 0,025 $\mu\text{g/ml}$, CIM₉₀ 0,1 $\mu\text{g/ml}$ y rango de 0,05-0,1 $\mu\text{g/ml}$, en tanto que Alippi y col.(2005) trabajando con una colección mundial de 67 cepas encontraron una CIM₅₀ de 0,0625 $\mu\text{g/ml}$, CIM₉₀ de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ y un rango de 0,0078-0,5 $\mu\text{g/ml}$.

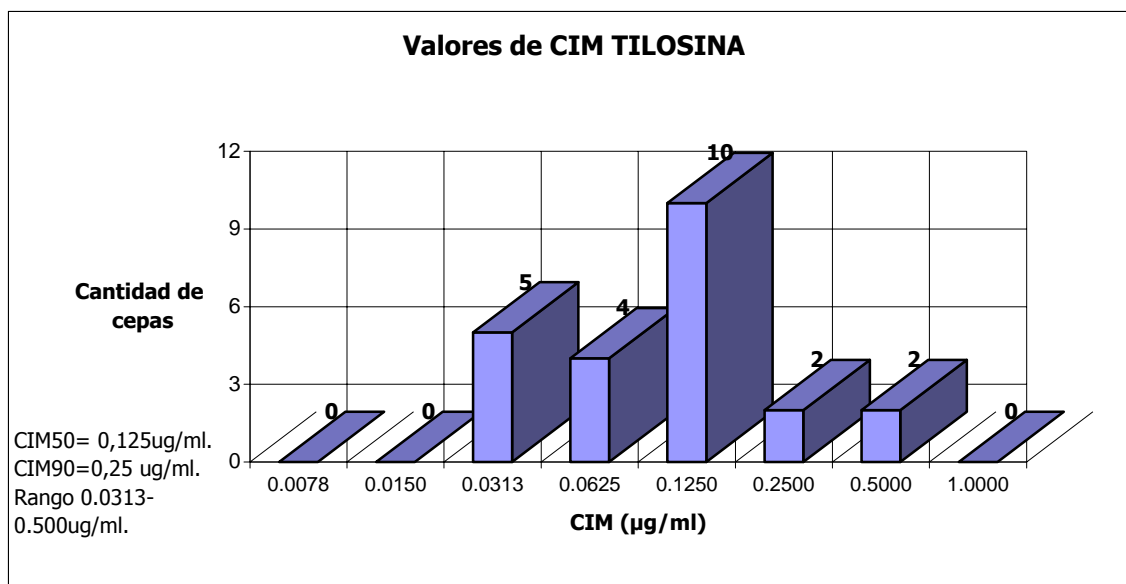


Figura 6b: Distribución de los valores de CIM de tilosina para la población de *P. larvae* estudiada.

La población estudiada aquí fue altamente sensible, aseveración que se desprende no solo de la comparación de los valores de CIM obtenidos en trabajos previos (Alippi *et al*, 2005; Okayama *et al*, 1996), sino también de los valores *persé* de CIM₅₀, CIM₉₀ y rango. La distribución típicamente unimodal de los valores de CIM permiten inferir que hasta el presente existe tanto una alta sensibilidad a la tilosina como la ausencia de indicios respecto a cambios en la sensibilidad de *P. larvae*. (Acar & Goldstein, 1985; MacGowan & Wise, 2004; MAFF, 1998).

Es importante denotar que las cepas que presentaron alta resistencia a la tetraciclina fueron claramente sensibles a la tilosina coincidiendo con lo encontrado por Miyagi y col. (2000) y Kochansky y col. (2001).

A partir de los datos de diámetro de inhibición obtenidos y los valores de CIM transformados en Log₂ se planteó un scattergrama, sobre la base de este se trazó una curva de regresión con un valor de r=0,831 (Figura 7c) con un valor de p < 0,01 a un nivel de confianza del 99%, lo que muestra una muy buena

correlación entre los valores de CIM y los antibiogramas. Teniendo en cuenta los puntos de corte propuestos en este trabajo (Tabla 4), y observando la buena correlación (Figura 7c) entre los antibiogramas y la CIM, se propone la carga de 15 µg / disco como la carga adecuada para evaluar sensibilidad a *P. larvae* frente a tilosina.

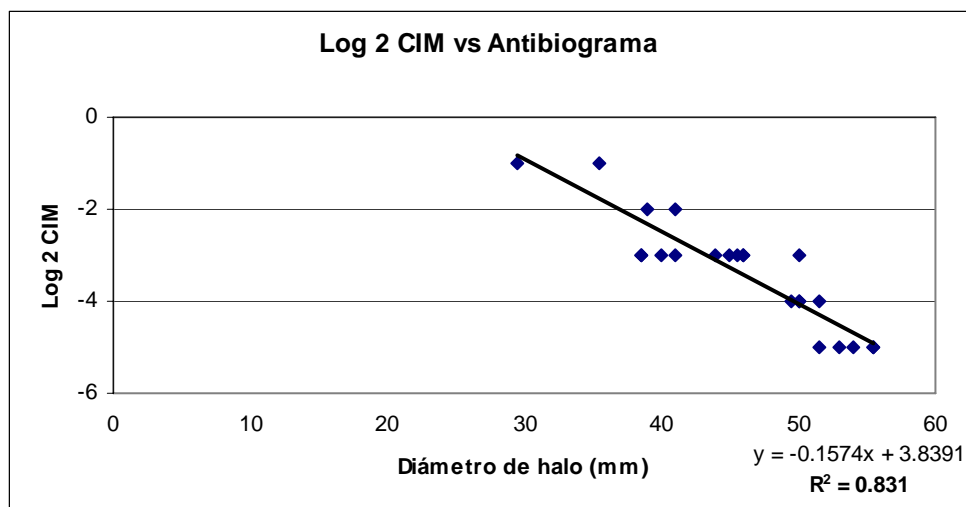


Figura 7c: Curva de regresión de los valores de inhibición por disco 15 µg vs. Log2 CIM para tilosina.

Tabla 4: Estándares para la interpretación de Antibiogramas y puntos de corte de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para patógenos en Veterinaria propuesto por la NCCLS en 2002 con modificaciones.

Antibióticos	Contenido del Disco (µg/disco)	Antibiograma (mm)			CIM (µg/ml)		
		Susceptible (S)	Intermedio (I)	Resistente (R)	Susceptible (S)	Intermedio (I)	Resistente (R)
Tetraciclina	30	≥19	15-18	≤14	≤4	8	≥16
Tilmicosina	15	≥14	11-13	≤10	≤8	16	≥32
Lincomicina	15 ¹	≥21 ²	15-20 ²	≤14 ²	≤0,5 ²	1-2 ²	≥4 ²
Tilosina	15 ¹	≥14 ³	11-13 ³	≤10 ³	≤8 ⁴	16 ⁴	≥32 ⁴

REFERENCIAS:

¹ Carga de disco propuesta en esta tesis

² Puntos de corte propuestos por NCCLS (2002) para clindamicina, se propone su uso para lincomicina y *P. I. larvae*.

³ Puntos de corte propuestos en esta tesis para *P. I. larvae*.

⁴ Puntos de corte propuestos por Alippi *et al* (2005).

La tilosina se aprobó recientemente para su uso en Argentina (SENASA,

2005) (www.alimentosargentinos.gov.ar), y además, se encuentra nominada en el "libro verde" de la FDA como droga aprobada para su uso en veterinaria (Kochansky *et al.*, 2001).

2. 2. 4 - LINCOMICINA: Los valores de CIM presentaron una distribución claramente unimodal, con una CIM₅₀ de 0,5µg/ml, CIM₉₀ 1 µg/ml y un rango de 0,125-1 µg/ml (Figura 6c), que se corresponde con una población altamente sensible (MAFF, 1998) (Figura 6c). Valores con alta sensibilidad se encontraron en estudios previos (Kochansky *et al.*, 2001); Okayama y col. (1996) trabajando con 28 cepas de Japón de *P. larvae* obtuvieron valores de CIM₅₀ de 0,025 µg/ml, CIM₉₀ 0,05 µg/ml y rango de 0,0135-0,05 µg/ml respectivamente. Las cepas que presentaron alta resistencia a la tetraciclina fueron claramente sensibles a la lincomicina, lo cual coincide con observaciones de Kochansky y col. (2001). La distribución típicamente unimodal de los valores de CIM corroboran que hasta el presente existe tanto una alta sensibilidad a la lincomicina como la ausencia de indicios respecto a cambios en la sensibilidad de *P. larvae*. (Acar & Goldstein, 1985; MacGowan & Wise, 2004; MAFF, 1998). Claramente se observa que tanto para las 23 cepas de este estudio como para las 28 cepas usadas por Okayama y col. (1996) los valores de CIM son muy bajos y el rango es muy estrecho, que implica una alta sensibilidad de *P. larvae* a la lincomicina.

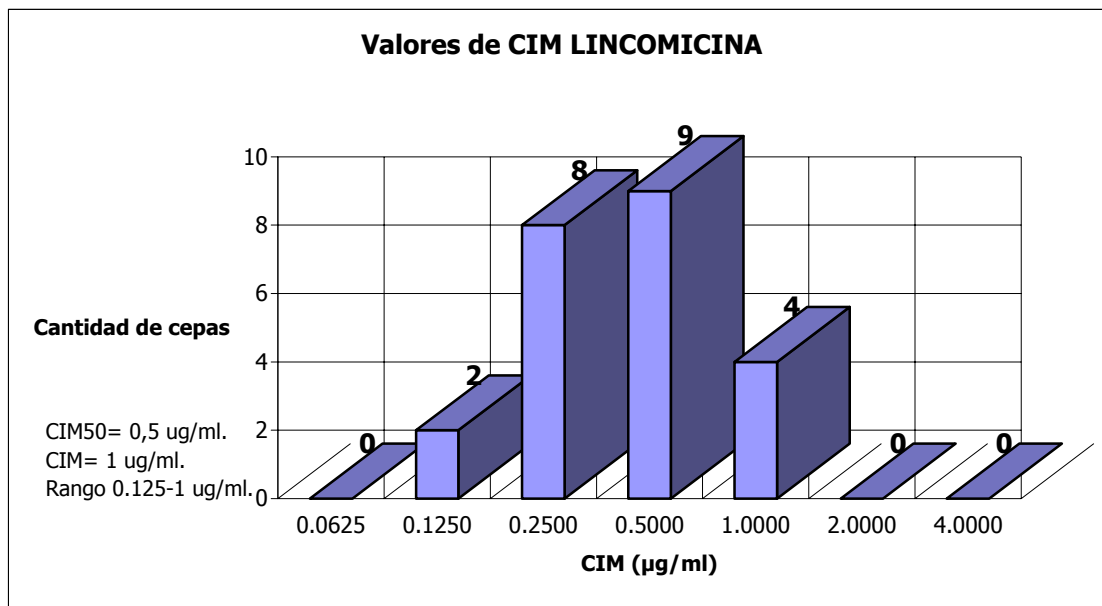


Figura 6c: Distribución de los valores de CIM de lincomicina para la población de *P. larvae* estudiada.

A partir de los datos de diámetro de inhibición obtenidos y de los valores de CIM transformados en Log_2 , se plotó un scattergrama y se trazó una curva de regresión cuyo valor fue $r=0,8570$ (Figura 7d) con un valor de $p < 0,01$ a un nivel de confianza del 99%. Este valor muestra una muy buena correlación entre los valores de CIM y los halos de inhibición.

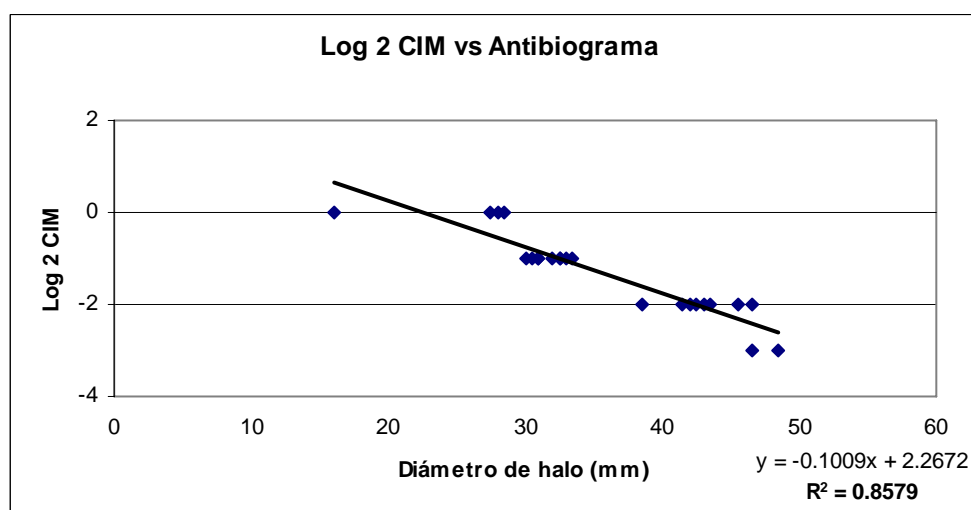


Figura 7d: Curva de regresión de los valores de inhibición por disco 15 µg vs. Log_2 CIM para lincomicina.

Las únicas lincosamidas empleadas en la actualidad son clindamicina (uso humano y veterinario) y pirlimicina (uso veterinario), para ambos casos los discos que se usan tienen una carga de 2 µg. Teniendo en cuenta que se pueden usar discos de clindamicina para testear sensibilidad a lincomicina, pero que esta droga tiende a ser más activa que la lincomicina (NCCLS M31 A2, 2002), en este trabajo se testeó una carga más alta de lincomicina en disco para intentar corregir esa menor actividad que posee la lincomicina *in vitro*. Teniendo en cuenta tanto la buena correlación que existe entre los antibiogramas y la CIM (Figura 7d) y de acuerdo con los puntos de corte propuestos en este trabajo (Anexo de Tablas, Tabla 3), se propone la carga de 15 µg / disco como la carga adecuada para evaluar la sensibilidad a *P. larvae* frente a este ATB.

La lincomicina se encuentra nominada en el "libro verde" de la FDA como droga aprobada para su uso en veterinaria (Kochansky *et al.*, 2001).

2. 2. 5 -TILMICOSINA: Los valores de CIM presentaron una distribución unimodal, con una CIM₅₀ de 0,25 µg/ml, una CIM₉₀ de 0,25 µg/ml y un rango de 0,0625-0,5 µg/ml (Figura 6d), que se corresponde con una población altamente sensible (MAFF, 1998). Para la población estudiada de *P. larvae*, la tilmicosina presentó valores de CIM bajos, similares a los encontrados para tilosina, lo que demuestra que la población es altamente sensible a este antibiótico. Valores con alta sensibilidad se encontraron en estudios previos para cepas de *Pasteurella spp.* (Shryock *et al.*, 1995; Shryock *et al.*, 1996), pero no hay datos bibliográficos de sensibilidad para *Paenibacillus larvae*. Las cepas que presentaron alta resistencia a la tetraciclina fueron claramente sensible a la tilmicosina.

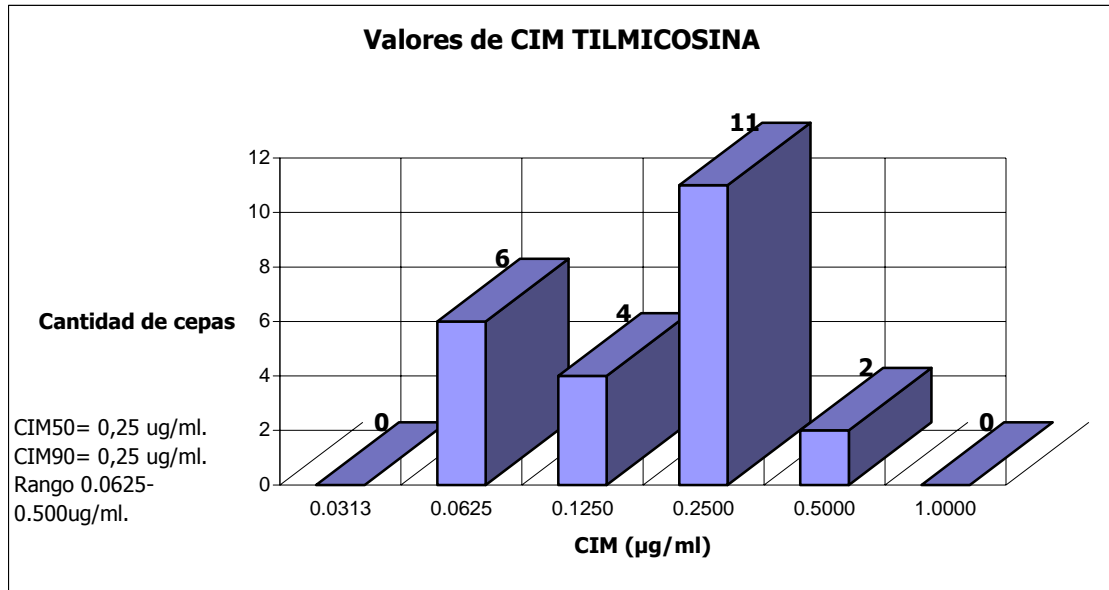


Figura 6d: Distribución de los valores de CIM de tilmicosina para la población de *P. larvae* estudiada.

A partir de los datos de diámetro de inhibición obtenidos y de los valores de CIM transformados en Log_2 se planteó un scattergrama y se trazó una curva de regresión cuyo valor fue de $r=0,7207$ (Figura 7e) con un valor de $p < 0,01$ a un nivel de confianza del 99%, lo cual muestra una buena correlación entre los valores de CIM y los halos de inhibición del antibiograma.

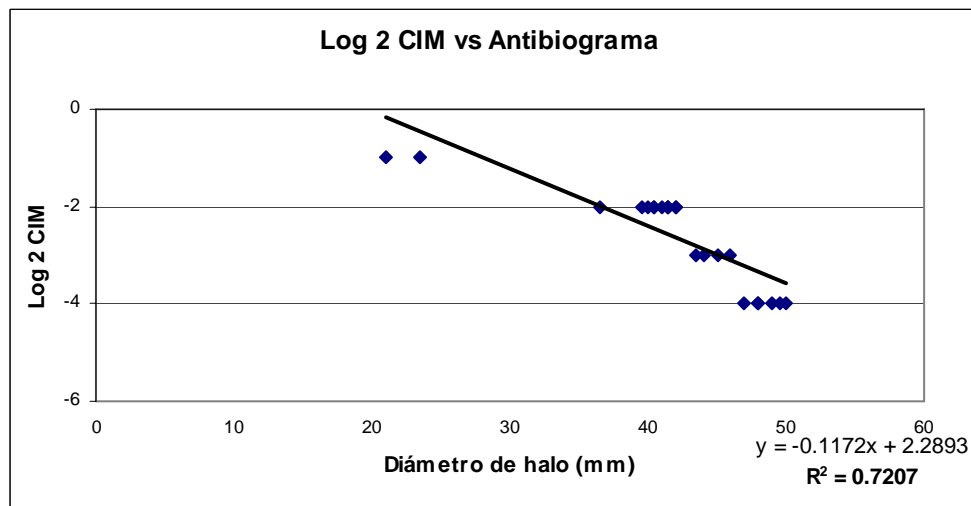


Figura 7e: Curva de regresión de los valores de inhibición por disco 15 µg vs. Log_2 CIM para

tilmicosina.

Teniendo en cuenta los puntos de corte propuestos en este trabajo (Tabla 3), y observando la buena correlación entre los antibiogramas y la CIM (Figura 7e), se propone la carga de 15 μg / disco como adecuada para testear la sensibilidad de *P. larvae* frente a este ATB.

A partir de los valores de sensibilidad por CIM de la población de *P. larvae* obtenidos en este trabajo se determinaron los "**puntos de corte epidemiológico**" (PCE) (*epidemiological cut-off values*) (Kahlmeter *et al*, 2003) sugeridos por la "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST). Los PCE sirven para identificar rápidamente organismos con sensibilidad reducida comparada con las CIM más alta de la población salvaje. Se emplean cuando: **a)** no existe consenso en un punto de corte clínico, en cuyo caso el punto de corte epidemiológico permite la detección y comparación con organismos resistentes; **b)** para drogas nuevas o viejas donde la resistencia ya ha sido descrita; **c)** en situaciones donde la "resistencia" representa complejos mecanismos que puedan tener implicancias en el hombre.

3. CONCLUSIONES:

En base a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se proponen los siguientes **puntos de corte epidemiológicos** para cada uno de los ATB estudiados:

- Tetraciclina: SENSIBLE ≤ 4 y RESISTENTE >16 .
- Tilosina: SENSIBLE ≤ 2 y RESISTENTE >8 .
- Tilmicosina: SENSIBLE ≤ 2 y RESISTENTE >8 .
- Lincomicina: SENSIBLE ≤ 4 y RESISTENTE >16 .

La particularidad de determinar los **puntos de cortes epidemiológicos**

como SENSIBLE (\leq) y RESISTENTE ($>$) radica en el hecho que según el Comité Ejecutivo de la EUCAST, se evade un hueco en la distribución de sensibilidades que de otra forma si existiría.

A partir de estos puntos de corte epidemiológicos, y hasta tanto se determinen los puntos de corte clínicos, será mucho más fácil la detección de resistencias emergentes para estas drogas y *Paenibacillus larvae*.

Para evitar residuos de antibióticos en miel y cera las dosis propuestas para colmenas suelen ser muy bajas, corriendo el riesgo que caigan dentro de la ventana de selección de mutantes (espacio que se forma entre la CIM necesaria para impedir el desarrollo de una cepa salvaje y la menor concentración de antimicrobiano que impida el desarrollo de la primera mutante (MPC)) (Drlica, 2003). Por esta razón estos puntos de corte son de suma utilidad para monitorear la sensibilidad a campo de esta población bacteriana hasta tanto se determinen los rangos de la ventana de selección de mutantes.

CAPÍTULO 3

Ensayos *in vitro* de toxicidad oral para abejas adultas

1. Materiales y Métodos:

1. 1 – MATERIAL VIVO: Para evaluar la toxicidad oral de ATB para abejas adultas se trabajó de acuerdo a las metodologías propuestas por ICBB (1985), Gough y col. (1994), Kraus y col. (1994) y Alippi y col. (1999) con modificaciones.

A comienzos del otoño de 2004 se recolectaron abejas pecoreadoras del alza melaria de una colmena con reina y sin síntomas clínicos de enfermedades, sin emplear humo para evitar el consumo de miel y posterior rechazo del tratamiento a probar. Las abejas se anestesiaron con CO₂ y se colocaron de a 10 en frascos de prueba efectuando 10 repeticiones (10 frascos) por cada una de las concentración probadas de tilosina, tilmicosina, lincomicina y oxitetraciclina, testigo sin tratamiento y control tóxico (dimetoato). Se usó al frasco como ***unidad experimental***. Las abejas se dejaron recuperar espontáneamente dentro de los frascos.

Los frascos con abejas se mantuvieron en un ambiente oscuro con condiciones ambientales controladas (temperatura ambiente 25° C ± 2° C y humedad relativa de 65% ± 5%). Los frascos se ubicaron de manera aleatoria sobre las mesadas de trabajo (Foto 2).



Foto 2: Disposición de los frascos durante el ensayo de toxicidad de abejas adultas *in vitro*.

1. 2 - TRATAMIENTOS Y DOSIS PROBADAS: Las dosis de los antibióticos probadas se seleccionaron de acuerdo con los resultados obtenidos *in vitro* (Capítulo 1) en este trabajo. Todas las dosis fueron expresadas en microgramos de principio activo (p.a.) por abeja ($\mu\text{g p.a./abeja}$). Cada grupo de 10 abejas (frasco individual) se alimentó con 200 μl de una solución estéril de sacarosa al 50% p/v en agua destilada, más la correspondiente dosis de droga a probar, de modo que cada abeja recibió *ad libitum* 20 μl de solución. Una vez que la dosis fue tomada (aproximadamente 5 horas) (Alippi *et al.*, 1999) se colocó en el alimentador una solución de sacarosa y agua y se repuso las veces necesarias. Las soluciones de ATB se prepararon de acuerdo con lo explicado en el Capítulo 1.

Los tratamientos y dosis probadas fueron:

Testigo altamente tóxico (dimetoato) Se incluye como control tóxico estándar (Gough *et al.*, 1994):

- ✓ D₁ 0,02 µg p.a./abeja (10 frascos) (0,2 µg de p.a. / frasco)
- ✓ D₂ 0,04 µg p.a./abeja (10 frascos) (0,4 µg de p.a. / frasco)
- ✓ D₃ 0,08 µg p.a./abeja (10 frascos) (0,8 µg de p.a. / frasco)
- ✓ D₄ 0,16µg p.a./abeja (10 frascos) (1,6 µg de p.a. / frasco)
- ✓ D₅ 0,32 µg p.a./abeja (10 frascos) (3,2 µg de p.a. / frasco)
- ✓ D₆ 0,64 µg p.a./abeja (10 frascos) (6,4 µg de p.a. / frasco)

Tratamiento TILOSINA

- ✓ TILO₁ 50 µg p.a./abeja (10 frascos) (500 µg de p.a. / frasco).
- ✓ TILO₂ 100 µg p.a./abeja (10 frascos) (1000 µg de p.a. / frasco).
- ✓ TILO₃ 200 µg p.a./abeja (10 frascos) (2000 µg de p.a. / frasco).
- ✓ TILO₄ 400 µg p.a./abeja (10 frascos) (4000 µg de p.a. / frasco).

Tratamiento TILMICOSINA

- ✓ TILMI₁ 50 µg p.a./abeja (10 frascos) (500 µg de p.a. / frasco).
- ✓ TILMI₂ 100 µg p.a./abeja (10 frascos) (1000 µg de p.a. / frasco).
- ✓ TILMI₃ 200 µg p.a./abeja (10 frascos) (2000 µg de p.a. / frasco).
- ✓ TILMI₄ 400 µg p.a./abeja (10 frascos) (4000 µg de p.a. / frasco).

Tratamiento LINCOMICINA

- ✓ LINCO₁ 50 µg p.a./abeja (10 frascos) (500 µg de p.a. / frasco).
- ✓ LINCO₂ 100 µg p.a./abeja (10 frascos) (1000 µg de p.a. / frasco).
- ✓ LINCO₃ 200 µg p.a./abeja (10 frascos) (2000 µg de p.a. / frasco).
- ✓ LINCO₄ 400 µg p.a./abeja (10 frascos) (4000 µg de p.a. / frasco).

Tratamiento CLORHIDRATO DE OXITETRACICLINA

- ✓ CLO₁ 50 µg p.a./abeja (10 frascos) (500 µg de p.a. / frasco).
- ✓ CLO₂ 100 µg p.a./abeja (10 frascos) (1000 µg de p.a. / frasco).
- ✓ CLO₃ 200 µg p.a./abeja (10 frascos) (2000 µg de p.a. / frasco).
- ✓ CLO₄ 400 µg p.a./abeja (10 frascos) (4000 µg de p.a. / frasco).

Tratamiento BLANCO

El Testigo Blanco consistió en una solución de sacarosa en agua preparada al 50 % p/v).

Las dosis elegidas para probar toxicidad oral para adultos *in vitro* incluyeron las dosis de campo; ya que 1250 mg. de Oxitetraciclina equivalen ~ 68 µg p.a./abeja; 1000 mg. de Tilosina equivalen a ~ 56 µg p.a./abeja; 1000 mg. de Tilmicosina equivalen a ~ 56 µg p.a./abeja y 1000 mg. de Lincomicina equivalen a ~ 56 µg p.a./abeja.

En todos los casos la evaluación se realizó a las 24, 48 y 72 h, contando el número de abejas muertas por frasco.

1. 3 – ANÁLISIS ESTADÍSTICO: Con los valores obtenidos se calcularon los valores de LD₅₀ (*dosis letal media*) (EPA PROBIT, 1994), que se define como la dosis de biocida necesaria para que muera la mitad de la población en estudio. El cálculo de la LD₅₀ se obtiene trazando una horizontal desde y=0 en abscisas y, en el punto de corte, es donde se halla el valor buscado. Sobre una población de insectos se puede definir una cierta distribución de niveles de tolerancia.

Este modelo de regresión *probit* para las relaciones entre las distribuciones de muertos y las distribuciones de insecticida, surge como

resultado directo de asumir la condición de normalidad de la distribución de las tolerancias (Finney, 1971; Wadley, 1967; Zar, 1998).

2. Resultados y Discusión

Ninguno de los ATB probados resultó tóxico para las abejas adultas a ninguna de las concentraciones ni tiempos ensayados, de hecho fueron virtualmente no tóxicos (ICBB, 1985), (Tabla 5); Los valores de LD₅₀ obtenidos con el dimetoato a las 24 hs, 48 hs y 72 hs resultaron dentro de los rangos esperados para este compuesto (Gough *et al*, 1994).

Tabla 5: Valores de LD₅₀ a las 24 h, 48 h y 72 h para abejas adultas obtenidos a partir de ensayos de laboratorio. Comparaciones de toxicidad entre el testigo tóxico Dimetoato y las antibióticos Oxitetraciclina, Tilosina, Tilmicosina y Lincomicina.

Compuesto	Tiempo (h)	Intercepción	Err. Std.	Pendiente	Err. Std.	DL ₅₀ (μg / abeja)
Dimetoato	24	6.153455	0.268210	2.355612	0.388996	0,324
	48	6.019589	0.204358	1.409017	0.208696	0,198
	72	6.170721	0.126345	1.461616	0.127451	0,158
Oxitetraciclina	24	0.491932	0.818631	1.367412	0.347952	1.980,559
	48	0.958722	0.551536	1.496220	0.241740	502,333
	72	1.154073	0.497844	1.582871	0.222101	268,977
Tilosina	24	1.394214	0.853845	0.868382	0.368841	14.200, 502
	48	1.588866	0.668630	0.981414	0.290908	2.990,427
	72	2.201430	0.569769	0.831658	0.251788	2.317,644
Tilmicosina	24	1.170973	0.905314	0.952424	0.388403	10.478,438
	48	-0.821780	1.553873	1.826449	0.631991	1.539,876
	72	-0.175497	1.190802	1.659180	0.491458	1.316,164
Lincomicina	24	1.707203	0.890723	0.682122	0.387857	67.187,156
	48	3.612924	1.272954	1.166262	0.530692	5.776,387
	72	1.088503	1.082069	1.038114	0.456048	5.859,858

A pesar que ninguna de las drogas fue tóxica para abejas, se puede observar en la Tabla 5 que a las 24 horas los ATB Tilosina, Lincomicina y Tilmicosina necesitan una altísima cantidad de droga ($> 10.000 \mu\text{g}$ p.a./abeja) para lograr la LD₅₀, contrastando con la Oxitetraciclina que tiene una LD₅₀ de 1980,559 μg p.a./abeja.

A las 48 horas existe un descenso muy marcado en las LD₅₀ de todas las drogas (Tabla 5), pero este fenómeno se observa más claramente para Lincomicina y Tilmicosina. Esta manifestación probablemente se deba a un efecto retardado de toxicidad, el cual a pesar de ser muy marcado, no tiene incidencia dado que las concentraciones de drogas probadas a campo distan mucho de los valores de LD₅₀ para las 48 y 72 horas. Alippi y col.(1999) también observaron este efecto en Oxitetraciclina y Terramicina ®.

A las 72 horas los valores de LD₅₀ siguen cayendo, aunque no tan bruscamente como a las 48 horas. A pesar de ello, todos los valores de LD₅₀ excepto el de la Oxitetraciclina, distan mucho tanto de los valores de productos levemente tóxicos (100 µg p.a./abeja según ICBB (1985)) como de las concentraciones de campo. Valores similares fueron obtenidos en trabajos previos para el caso de la oxitetraciclina (Alippi *et al.*, 1999).

En aquellas países donde se emplean ATB para el control de enfermedades en las colmenas, el único producto aprobado para el control de loque americana es la oxitetraciclina la cual presentó valores de LD₅₀ próximos al límite para compuestos tóxicos (< 100 µg p.a. / abeja).

Con respecto a la tilosina, ha sido recientemente aprobada para su uso en colmenas en Argentina (www.alimentosargentinos.gov.ar , 2005) y EUA (Federal Register, 2005). En el caso de lincomicina y tilmicosina, ambos ATB también resultaron virtualmente atóxicos.

3. Conclusiones

Ninguno de los ATB evaluados resultó tóxico para las abejas adultas.

Tanto tilosina, como tilmicosina y lincomicina resultaron virtualmente atóxicos. En el caso de la oxitetraciclina, los valores de LD₅₀ obtenidos fueron

Capítulo 3. Ensayos *in vitro* de toxicidad oral para abejas adultas.

próximos al límite para compuestos tóxicos, de modo que una mala dosificación a campo podría fácilmente resultar en toxicidad para las abejas.

CAPÍTULO 4

Ensayos de toxicidad larval a campo

1. Materiales y Métodos

Se evaluó la toxicidad sobre larvas de los cuatro antibióticos estudiados, aplicados en forma de sobres (paper pack) ó candy con sus respectivos controles en colmenas de abejas melíferas (*Apis mellifera ligustica*, L.).

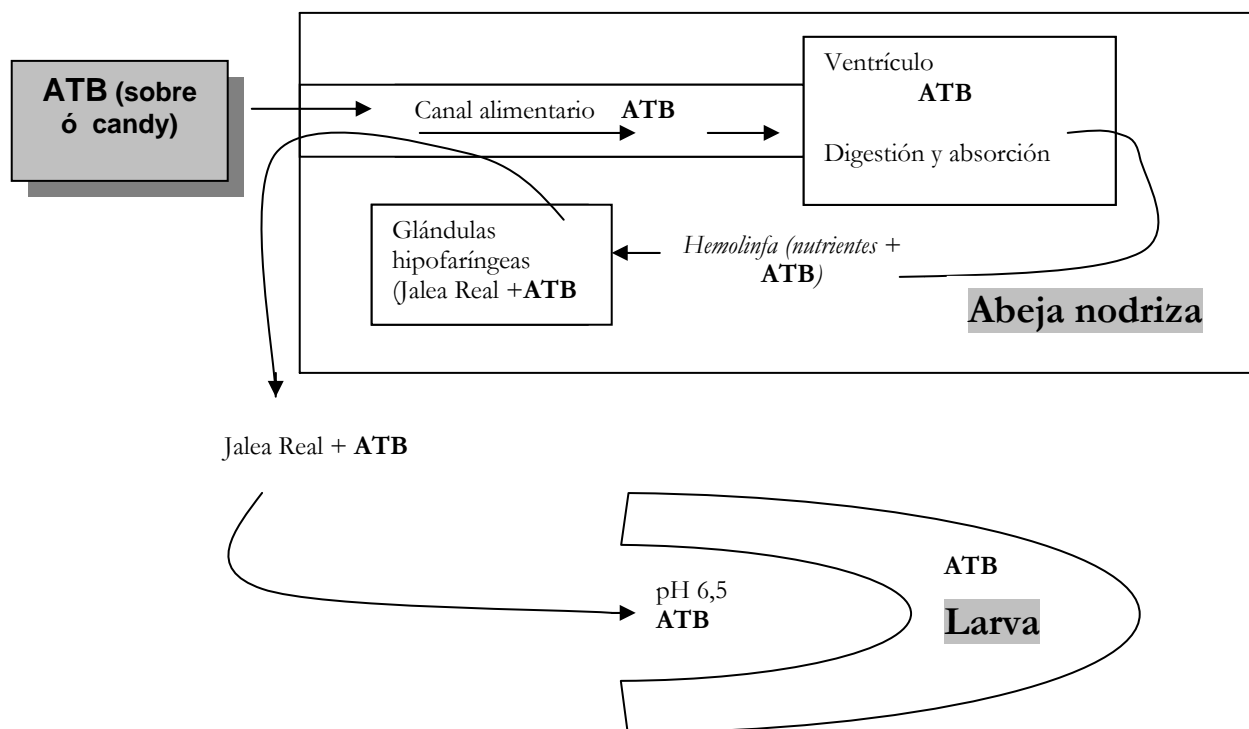
Todos los productos antibacterianos, antiprotozoarios y acaricidas de uso permitido en apicultura en Argentina (www.alimentosargentinos.gov.ar) tienen un período de retirada determinado (tiempo en que el producto debe ser retirado de la colmena antes del flujo principal de néctar). A pesar de esto, en este ensayo como se quiso probar la toxicidad de las drogas para la cría de abejas en el peor escenario posible, se aplicaron los sobres y candies en primavera temprana muy cerca del flujo principal de néctar, de forma tal de garantizar que el producto a probar se consumiese dentro del período de mayor crecimiento larval dónde existe la mayor cantidad de cría en la colmena. De esta forma, si hubiera toxicidad, esta sería muy notoria.

Si bien se han desarrollado muchas técnicas para determinar la mortandad larval (Woodrow, 1941; Woodrow, 1942; Hoage & Rothenbulher, 1966; Fukuda & Sakagami, 1968; Johansson & Johansson, 1971; Page, 1980; Pettis *et al*, 2004), la mayoría propone metodologías muy engorrosas de realizar.

Sobre base los trabajos de Fukuda & Sakagami (1968) y Pettis y col. (2004), se efectuaron algunas modificaciones debido a que la forma de aplicación de las drogas a campo no fue por espolvoreo, donde una importante cantidad del preparado cae dentro de las celdas con larvas provocando alta mortandad para algunas drogas (Pettis *et al* 2004), sino que se usaron sobres o candy como vehículo de las mismas.

El empleo de sobres ó candies evita el contacto directo entre la droga y las larvas dado que los mismos se colocan sobre los cabezales de los cuadros de cría, se realizan 4 o 5 orificios y luego las abejas son las encargadas de roerlos. Además, esta metodología evita ir al campo cada semana durante 4 a 6 semanas como en el caso del espolvoreo (García Girou, 2003).

La infección con loque americana ocurre casi exclusivamente en larvas de menos de 3 días de edad (las más sensibles a la enfermedad) por ingestión de alimento con esporas de *Paenibacillus larvae* (Bailey & Ball, 1991; Gregorc & Bowen, 1998; Ratnieks, 1992). El alimento durante este período de desarrollo larval es la jalea real, segregada por las glándulas hipofaríngeas de las abejas nodrizas. El ATB debe estar activo en la jalea real segregada por las abejas nodrizas para evitar la infección larval. Para que esto ocurra las nodrizas deben alimentarse con el ATB, luego debe ser absorbido del canal alimentario, pasar a la hemolinfa y finalmente ser segregado a través de las glándulas hipofaríngeas en la jalea real y suministrado a las larvas de menos de tres días (Esquema 2) (Nakajima *et al.*, 1997; Nakajima *et al.*, 1998). La jalea real tiene un pH cercano a 4, debido probablemente a la presencia de ácidos grasos hidroxílicos, por lo que se estima que las drogas lipofílicas y ácidas son la que deberían estar en mayor concentración en jalea real por ser mayor la permeabilidad a través de membranas. Además, los mecanismos de retención de iones (*ion-trapping mechanism*) hace que las sustancias básicas se concentren mejor en fluidos ácidos (Nakajima *et al.*, 1998).



Esquema 2: Ruta cinética esperada para ATB en abejas adultas y larvas de *A. mellifera*. (Modificado de Nakajima *et al.*, 1997)

1.1- MATERIAL VIVO: El ensayo se realizó en el apiario experimental sito en la localidad de "Los Talas" Partido de Berisso; Provincia de Buenos Aires, Argentina durante la primavera del año 2005. Se trabajó con 3 (tres) repeticiones por tratamiento, totalizando 18 colmenas de *Apis mellifera ligustica*, las cuales provenían de paquetes de abejas realizados en febrero de 2005 y no tenían, al comienzo del ensayo, síntomas clínicos de ninguna enfermedad.

Todas las colmenas del ensayo se homogeneizaron de modo que se conformaron con 1-3 cuadros de cría, 4-8 cuadros de abejas y 2 cuadros de miel y polen, esto último para asegurar una adecuada reserva alimenticia.

1. 2 - TRATAMIENTOS Y MODO DE APLICACIÓN: Los tratamientos probados se aplicaron en las colmenas sobre los cabezales de los cuadros de la zona de cría (Foto 3), con el total de la droga para el tratamiento completo en sobres cribados para el caso de Oxitetraciclina, Tilosina, Lincomicina y Testigo sobre, y en candies envueltos en papel y cribados para los casos de Tilmicosina y Testigo candy.

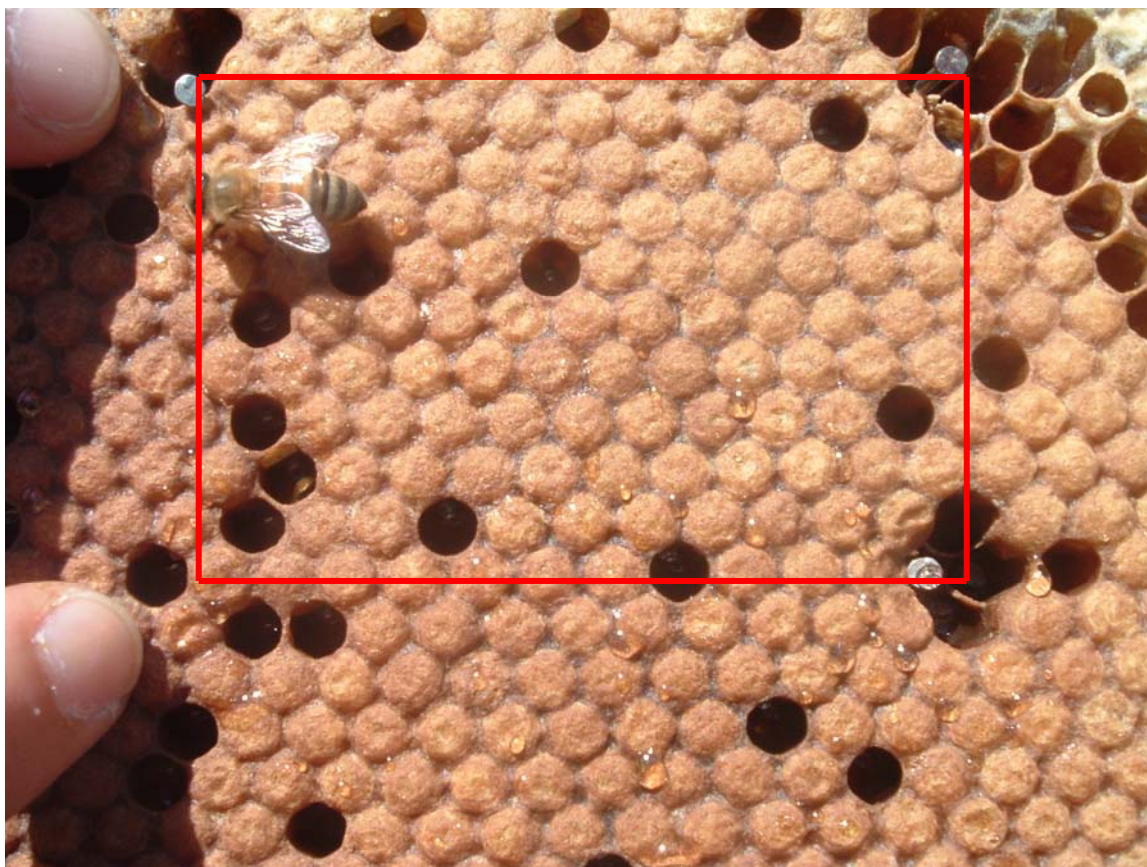


Foto 3: Área marcada en un cuadro de cría en el segundo día de muestreo.

De esta forma, las abejas roen el papel del sobre o del candy y lo consumen en no más de 4 semanas.

De todas las formas de aplicación posible de antibióticos en colmenas al momento de realizarse el ensayo, se eligieron los sobres y los candies ya que los estudios preliminares realizados para este trabajo y datos previos

del grupo de trabajo (Alippi *et al*, 1999) aseguraban el consumo de los sobres y candies en un tiempo de tres a cuatro semanas.

En el caso de tilosina (SIGMA ®), oxitetraciclina (SIGMA ®) y lincomicina (SIGMA ®) se suministraron en sobre porque el principio activo está disponible en forma de polvo. En el caso de la tilmicosina, esta droga sólo se encuentra disponible en Argentina en solución (Micotil ®), de modo que se adaptó la aplicación en forma de candy para poder desafiar esta droga a campo con su correspondiente testigo.

En la aplicación por sobres, cada uno contenía 45 g de sacarosa + 5 g de gelatina de cereza + la dosis de cada antibióticos a probar. Para el caso de los candies, la composición fue de 45 g de sacarosa + 5 g de gelatina de cereza + agua destilada estéril con la correspondiente dosis de tilmicosina.

Tratamientos en sobre:

- ✓ *Tratamiento Tilosina* (1g de tilosina (p.a.) + 45 gr. de sacarosa + 5 gr. de gelatina de cereza)
- ✓ *Tratamiento Oxitetraciclina* (1,25g de oxitetraciclina (p.a.) + 45 gr. de sacarosa + 5 gr. de gelatina de cereza)
- ✓ *Tratamiento Lincomicina* (1g de lincomicina (p.a.) + 45 gr. de sacarosa + 5 gr. de gelatina de cereza)
- ✓ *Testigo Sobres* (45 gr. de sacarosa + 5 gr. de gelatina de cereza)

Tratamientos en candy:

- ✓ *Tratamiento Tilmicosina* (1g de tilmicosina (p.a.) + 45 gr. de sacarosa + 5 gr. de gelatina de cereza)

- ✓ *Testigo Candy* (45 gr. de sacarosa + 5 gr. de gelatina de cereza + agua destilada)

Las dosis usadas para los tratamientos se calcularon en base a resultados de sensibilidad *in vitro* (Capítulo 1), toxicidad para adultos (Capítulo 2), experiencias previas de dosificación a campo y tiempo de recurrencia de la enfermedad.

1. 3 - METODOLOGÍA DE CAMPO:

El ciclo biológico de la abeja obrera se divide en tres días de huevo, 6 días de larva y 11-12 días de pupa, la abeja adulta eclosiona entre los 20 y 21 días (Fukuda y Sakagami, 1968).

En el caso de las larvas, estas se dividen en dos grupos: larvas chicas (menores de tres días) las cuales se alimentan exclusivamente de jalea real generada por las abejas nodrizas grandes (Alimentación Masiva), y las larvas grandes (mayores de tres días) que se alimentan de pan de miel (miel, polen y jalea real de inferior calidad) (Alimentación Progresiva) a mayores intervalos de tiempo, producida por las abejas nodrizas chicas.

El día cero (1º Inspección) se eligió un cuadro con cría abierta por colmena (Fukuda & Sakagami, 1968), dentro del cual se marcó con clavos una sección de 136 celdas, donde debían existir tanto huevos como larvas chicas (Oomen *et al.*, 1992).

Previo a la aplicación de cada tratamiento (1º Inspección), 7 días Post-tratamiento (2º Inspección) y 21 días post-tratamiento (3º Inspección),

se obtuvo una foto digital de cada uno de los cuadros, de las colmenas bajo ensayo, que tenían el área marcada (Foto 3), y se anotó la cantidad de celdas con huevos, larvas chicas, larvas grandes, celdas vacías y celdas con polen o néctar que había en el área marcada, de forma de poder corroborar los datos anotados en el campo con las fotos obtenidas.

El día 7 post-tratamiento (2º Inspección) se consideró como cría viable la presencia de cría operculada que deviene de larvas de 1º-5º estadio (Winston, 1987), o larvas grandes que devienen de huevos de la semana anterior, en tanto que las celdas vacías, con huevos o larvas chicas que en la 1º Inspección tenían huevos a larvas, se contabilizaron como recambiadas (por muerte).

El día 21 post-tratamiento (3º inspección) se contabilizó la cantidad total de cría nacida respecto a la 1º inspección, de forma de poder calcular la mortalidad neta en esa colmena debido al tratamiento en cuestión.

Todas las fotos obtenidas fueron procesadas con los software Corel PHOTO-PAINT 10, PhotoKodak® y Adobe photoshop 6.0.

1. 4 – ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS: La proporción de larvas muertas en la 2º Inspección respecto al número de larvas en la 1º Inspección fue transformada usando la transformación estándar arcoseno (seno^{-1} (raíz cuadrada de Y)) (Fedlaufer *et al*, 2001; Zar, 1998). Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de las transformaciones y, en caso de existir diferencias significativas estadísticamente, se realizó un post-hoc test, LSD (Least Square Differences).

2. Resultados y Discusión:

2. 1 – ANÁLISIS ESTADÍSTICO: Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos probados ($F = 7,25$, $df = 5$, $p = 0,002$). Luego de analizar los resultados del ANOVA por LSD (Anexo de Tablas, Tabla 6) se observó que el tratamiento oxitetraciclina originó diferencias muy altamente significativas ($p < 0,001$) (Zar, 1998) con ambos testigos, lincomicina y tilosina, y diferencias significativas ($p < 0,05$) (Zar, 1998) con la tilmicosina. Asumiendo que la tasa de mortalidad normal

Tabla 6: Resultados del LSD (Diferencias mínimas de Cuadrados) (subrayado diferencias significativas ($p < 0,05$) y en negrita subrayado diferencias muy altamente significativas ($p < 0,001$)).

	Testigo sobre	Testigo candy	Oxitetraciclina	Tilmicosina	Tilosina	Lincomicina
Testigo sobre		0,694278	<u>0,000361</u>	<u>0,022216</u>	0,476791	0,694278
Testigo candy	0,694278		<u>0,000720</u>	<u>0,046319</u>	0,745784	1,000000
Oxitetraciclina	<u>0,000361</u>	<u>0,000720</u>		<u>0,041385</u>	<u>0,001291</u>	<u>0,000720</u>
Tilmicosina	<u>0,022216</u>	<u>0,046319</u>	<u>0,041385</u>		0,083198	<u>0,046319</u>
Tilosina	0,476791	0,745784	<u>0,001291</u>	0,083198		0,745784
Lincomicina	0,694278	1,000000	<u>0,000720</u>	<u>0,046319</u>	0,745784	

para larvas de abejas puede llegar hasta un 14% (Fukuda & Sakagami, 1968), y teniendo en cuenta los porcentajes de mortalidad encontrados en este ensayo (Anexo de Tablas, Tabla 7 y Figura 3), se ve claramente que la oxitetraciclina presentó la mayor toxicidad de las drogas testeadas (promedio $17,2 \% \pm 1.5$) superando incluso la mortandad larval normal, diferenciándose claramente de los tratamientos testigos, lincomicina y tilosina.

Tabla 7: Porcentajes de mortandad larval para los distintos tratamientos y las distintas Inspecciones en los ensayos de campo.

Colmena	Tratamiento	Mortandad (%)	Mortandad (%)	Mortandad (%)
		1 ^o -2 ^o Inspección	2 ^o -3 ^o Inspección	1 ^o -3 ^o Inspección
3	Testigo paper	10.3 %	0.8%	11.1%
13	Testigo paper	11.8%	0.0%	11.8%
32	Testigo paper	7.4%	0.0%	7.4%
6	Oxitetraciclina	16.2%	0.0%	16.2%
16	Oxitetraciclina	16.2%	0.0%	16.2%
34	Oxitetraciclina	19.1%	1.8%	20.9%
8	Tilmicosina	13.2%	0.0%	13.2%
22	Tilmicosina	13.2%	1.7%	14.9%
33	Tilmicosina	14.0%	0.0%	14.0%
12	Tilosina	10.3%	0.8%	11.1%
20	Tilosina	13.2%	0.0%	13.2%
36	Tilosina	8.8%	0.0%	8.8%
15	Lincomicina	11.8%	0.0%	11.8%
17	Lincomicina	10.3%	0.0%	10.3%
35	Lincomicina	8.8%	0.8%	9.6%
25	Testigo candy	10.3%	0.0%	10.3%
9	Testigo candy	8.8%	0.0%	8.8%
37	Testigo candy	11.8%	0.0%	11.8%

En el caso de la oxitetraciclina se encontraron resultados similares demostrando toxicidad larval (Pettis *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 1992). Estos últimos observaron que dosis superiores a 0,0025% (rango que incluye la dosis propuesta por Terramicina® y aprobada para el uso a campo en EUA (correspondiente a 0,025µg/mg alimento larval)) producían retardo en el desarrollo larval, y manchas pigmentarias en los últimos estadios larvales.

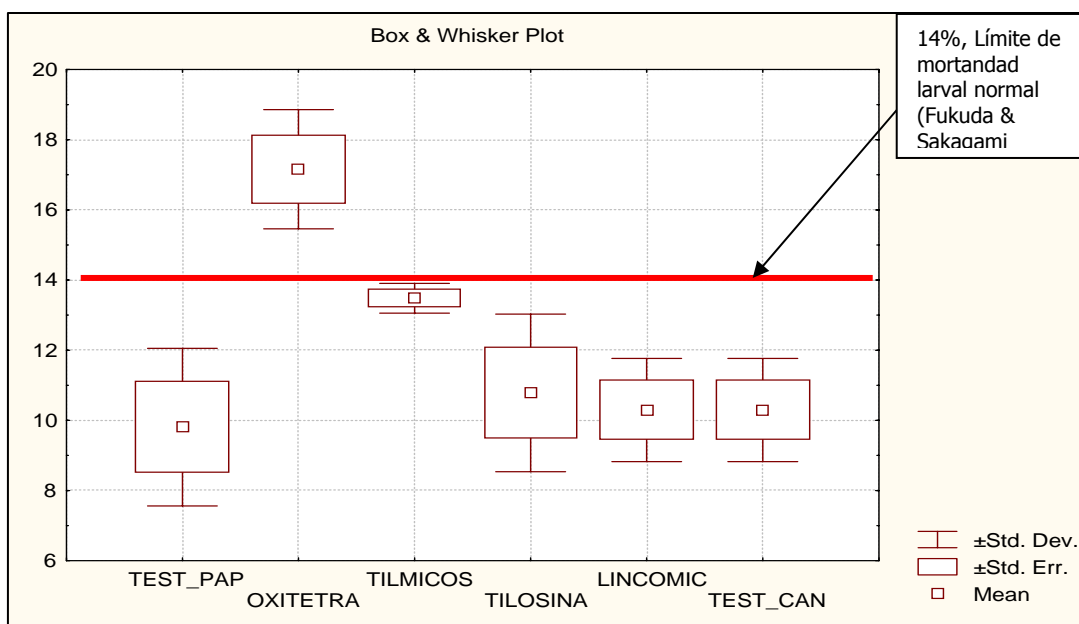


Figura 3: Porcentajes de mortalidad larval mostrando el promedio de los tratamientos y los desvíos estándares.

El tratamiento tilmicosina generó diferencias significativas ($p < 0,05$) (Zar, 1998) con respecto a los tratamientos testigo y lincomicina por una parte (tratamientos menos tóxicos) y con el tratamiento oxitetraciclina el cual resultó tóxico para las larvas (Figura 3). La tilmicosina no presentó diferencias significativas con respecto a la tilosina, siendo ambos productos levemente más tóxico que los testigos y la lincomicina, aunque dentro de los parámetros de normalidad propuestos por Fukuda & Sakagami (1968).

El tratamiento tilosina presentó diferencias muy altamente significativas ($p < 0,001$), con la oxitetraciclina, en tanto que no se diferenció de los tratamientos testigos, lincomicina y tilmicosina; además se encuentra por debajo del 14% de mortalidad natural. Resultados similares, mostrando baja o nula toxicidad, fueron encontrados por Pettis *et al* (2004)

y Elzen *et al* (2002), aunque usando el espolvoreado como modo de aplicación (Peng *et al*, 1996).

Los tratamientos testigos y lincomicina presentaron diferencias muy altamente significativas con el tratamiento oxitetraciclina ($p < <0,001$), y diferencias significativas ($p < 0,05$) con la tilmicosina pero no se diferenciaron entre sí, demostrando que el tratamiento lincomicina fue el menos tóxico para larvas de abejas entre las cuatro drogas probadas. Resultados de baja toxicidad larval fueron encontrados por Fedlaufer *et al* (2001) y Pettis *et al* (2004).

Finalmente, la mortandad que existió entre la 2º y la 3º Inspección promedio para cada tratamiento, fue inferior a la tasa normal de mortandad para cría operculada que es del 1% (Fukuda & Sakagami, 1968) (Anexo de Tablas, Tabla 7), lo que demuestra que la presencia de cría operculada es un indicador de buena sanidad en la colonia.

En este trabajo se descartaron las aplicaciones en forma de jarabe, ya que algunas drogas en medio líquido son muy inestable, particularmente para el caso de la oxitetraciclina (Ratnieks, 1992). El patty tampoco se usó como forma de aplicación ya que debido a sus ingredientes (2 partes de azúcar + 1 parte de aceite vegetal + la cantidad adecuada de droga) puede permanecer hasta 11 semanas o más en las colmenas conteniendo en su interior la droga activa, por ejemplo oxitetraciclina (Gilliam & Argauer, 1975). El hecho que la droga se encuentre activa en la colmena durante casi tres meses genera la posibilidad de producir residuos en cera ó en miel, además de originar una alta presión de selección hacia los genotipos resistentes a la droga en cuestión (Elzen *et al*, 2002). Finalmente tampoco

se eligió el espolvoreado semanal durante 4 a 7 semanas (García Girou, 2003), ya que no sólo no resultó 100% efectivo a campo (Wilson *et al*, 1971) sino que, se corre el riesgo que los tratamientos no se terminen generando sub-dosificación (problema importante en la Apicultura Argentina (Albo, *Com. Pers.*) y que conllevan a la selección de genotipos resistentes a la droga en uso. El uso de los sobres o candies en una única aplicación elude la necesidad de asistir semanalmente al campo.

3. Conclusiones:

La técnica puesta a punto en esta tesis para determinar la toxicidad larval a campo resultó efectiva y permitió determinar claramente diferencias estadísticamente significativas entre las drogas testeadas.

Sólo el tratamiento oxitetraciclina presentó mortandad larval superior a la normal, demostrando demostrando que resulta tóxico para larvas de abejas, no solo en la forma de aplicación propuesta en este trabajo (paper-pack), sino también por espolvoreado directo sobre las larvas (Pettis *et al*, 2004), o vía sistémica a través del alimento (Peng *et al*, 1992).

Los otros tres ATB probados (tilmicosina, tilosina y lincomicina) no resultaron tóxicos para las larvas de abejas. A pesar de ello, podemos inferir que la tilmicosina resulta la droga con el porcentaje más alto de toxicidad dentro de los parámetros normales, mientras que la lincomicina tuvo niveles de mortandad similares a los testigos.

CAPÍTULO 5

Efectividad a campo de los antibióticos para el control de loque americana

1. Materiales y Métodos:

Se evaluó la efectividad de tilosina, tilmicosina, oxitetraciclina y lincomicina para el control de la loque americana en colmenas inoculadas artificialmente con esporas de *Paenibacillus larvae* (cepa de Origen Chascomús (PL33), sin resistencia a tetraciclinas y con fingerprint A) como en Alippi *et al*, 2005. El ensayo se desarrolló en el campo que la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP) posee en 63 y 119, La Plata (35° latitud Sur, 57° longitud Oeste), Provincia de Buenos Aires, Argentina.

1. 1 - MATERIAL VIVO: Para el ensayo se emplearon 30 colonias de abejas melíferas de raza italiana (*Apis mellifera ligustica* L.) desarrolladas a partir de paquetes de abejas. Las reinas eran nuevas y de la misma edad, marcadas y con las alas cortadas para evitar el abandono de la colonia (Alippi *et al*. 1999). Todas las colmenas fueron curadas con CUMAVAR ® para controlar al ácaro *Varroa destructor* durante el mes de Febrero de 2005. Las colonias fueron estandarizadas para lo cual se les realizó un test de capacidad de limpieza de acuerdo con la técnica de Message modificada (Palacio *et al*, 1996; Rothembuhler, 1964). Este test clasifica a las colonias de acuerdo a la capacidad que tienen las obreras de identificar y desopercular las celdas para posteriormente remover la cría muerta de su interior. Los resultados del Test de capacidad de limpieza determinaron que 8 colmenas tenían capacidad de limpieza (Comportamiento Higiénico Total (CHT > 80%)), mientras que las 22 colmenas restantes no tenían capacidad de limpieza

(CHT < 80%) (Palacio *et al*, 1996). Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar la efectividad de 4 ATB a campo, de forma tal que para ver el efecto real de las drogas probadas a campo, y sabiendo que la presencia de Comportamiento Higiénico en las colmenas está relacionado con la resistencia natural a las enfermedades de la cría (Message & Gonçalves, 1977; Gilliam *et al*, 1989) se eligieron las colmenas con baja capacidad de limpieza para probar las drogas ya que cualquier recuperación notoria en la colmena definitivamente es producto de la droga. Dejándose para los controles las colmenas con Comportamiento Higiénico.

Al inicio del ensayo las colonias fueron nuevamente estandarizadas y ninguna presentaba síntomas clínicos de enfermedades. Todas contaban con 18.000 abejas adultas, 5 cuadros de cría (3 cuadros de cría operculada y 2 de cría abierta), 2 cuadros con miel y polen y 3 cuadros de cera estampada. Las colonias fueron distribuidas en el lote experimental de forma completamente aleatoria.

1. 2 - INOCULACIÓN ARTIFICIAL: La inoculación artificial se llevó a cabo el 06/04/05 de acuerdo a lo descrito por Alippi y col. (1999) con modificaciones. Todas las colmenas se inocularon por inserción en el cuadro de cría central, de un rectángulo de 10 X 20 cm de panales provenientes de colmenas con síntomas de loque americana caracterizados con grados 4 ó 5 (Alippi *et al*, 2005) (opérculos hundidos y grasientos, material viscoso ó escamas). Cada rectángulo contenía 35 (\pm 5) escamas y/o material viscoso. La cepa de *Paenibacillus larvae* utilizada para inocular el apiario fue de origen La Plata.

1. 3. – TRATAMIENTOS, MODO DE APLICACIÓN y DOSIS USADAS: la cantidad de droga correspondiente al tratamiento completo para cada

Capítulo 5. Efectividad a campo de los antibióticos para el control de loque americana.

colmena se aplicó sobre los cabezales de los cuadros de la zona cría (Foto 4) en sobres criados (Oxitetraciclina, Tilosina, Lincomicina y Testigo sobres (solo azúcar) ó candies criados (Tilmicosina y Testigo candy) de acuerdo a lo explicado en el capítulo 3.



Foto 4: Aplicación de un paper-pack Testigo en una colmena.

Las dosis usadas para los tratamientos se calcularon en base a resultados de sensibilidad *in vitro*, toxicidad larval, toxicidad de adultos, experiencias previas, tiempo de recurrencia de la enfermedad en estudios previos y tamaño de las colmenas. Básicamente, a partir de los valores de *punto de corte* que ya existen o los propuestos en esta tesis (valor de CIM calculada en el Capítulo 1) logrado *in vitro* y teniendo en cuenta que para que el ATB sea activa *in vivo* debe superar en los fluidos biológicos como mínimo 4

veces la CIM + una zona de seguridad (Lorian, 1985), se procedió de la siguiente manera para calcular la dosis de campo a usar:

Punto de corte ATB **X** *Zona de seguridad* **X** 18.000 abejas adultas (de acuerdo al número de abejas del ensayo) = **Dosis de campo a usar**

- ✓ Lincomicina, se multiplico el *punto de corte* por 14 (4 veces la CIM + una zona de seguridad).
- ✓ Tilosina, se multiplico el *punto de corte* por 28 (4 veces la CIM + una zona de seguridad).
- ✓ Tilmicosina, se multiplico el *punto de corte* por 28 (4 veces la CIM + una zona de seguridad).
- ✓ Oxitetraciclina, se multiplico el *punto de corte* por 17 (4 veces la CIM + una zona de seguridad).

Los tratamientos resultantes fueron:

Tratamientos en sobres:

- ✓ **Tratamiento A** Testigo sobre (45 gr. de sacarosa + 5 gr. de gelatina de cereza)
- ✓ **Tratamiento B** (1,25g de oxitetraciclina (p.a.) + 45 gr. de sacarosa + 5 gr. de gelatina de cereza)
- ✓ **Tratamiento C** (1g de lincomicina (p.a.) + 45 gr. de sacarosa + 5 gr. de gelatina de cereza)
- ✓ **Tratamiento D** (1g de tilosina (p.a.) + 45 gr. de sacarosa + 5 gr. de gelatina de cereza)

Tratamientos en candy:

- ✓ **Tratamiento E** (1g de tilmicosina (p.a.) + 45 gr. de sacarosa + 5 gr. de gelatina de cereza + agua destilada)
- ✓ **Tratamiento F Testigo Candy** (45 gr. de sacarosa + 5 gr. de gelatina de cereza + agua destilada)

Particularmente para los consumos de sobres y candies sólo de registro la presencia o ausencia de ellos en las primeras 4 (cuatro) inspecciones, ya que el objetivo era que se consumieron dentro de este período (entre tres y cuatro semanas).

De consumirse más rápido, la posología se asemejaría al espolvoreado el cual ya fue probado y en algunos casos, como la oxitetraciclina, no fue totalmente efectivo (Wilson *et al*, 1971). De perdurar el ATB activo más de cuatro semanas se correría el riesgo de generar residuos en miel y cera o de seleccionar cepas resistentes a las drogas usadas (Elzen *et al*, 2002).

Los tratamientos se aplicaron el 16 de Mayo de 2005, en todas las colmenas existían claramente síntomas clínicos de la enfermedad. Teniendo en cuenta que los sobres o candies debían consumirse en un tiempo máximo de cuatro semanas, el período de carencia mínimo estimada de la zona sería de 120 días. Asimismo se eligió el tratamiento otoñal en vez de un tratamiento primaveral, ya que en esta época del año no existe un flujo importante de néctar, de forma tal que no existe acopio de néctar en celdas ni tampoco se produce el labrado de panales, evitando de esta forma la presencia de residuos de antibióticos en miel o cera.

1. 4 – RELEVAMIENTO A CAMPO DE LOS DATOS: Las inspecciones de campo comenzaron 45 días post-inoculación, tiempo necesario para que la enfermedad se desarrolle en las colmenas inoculadas. Además este período

de tiempo es el adecuado para que la enfermedad se disemine dentro de un colmenar producto de la deriva de abejas (Ratnieks, 1992).

Las inspecciones se realizaron a intervalos quincenales, y en cada inspección se relevaron datos poblacionales (cuadros de cría de abejas, cuadros de abejas, presencia de reina), datos nutricionales (cuadros de miel y polen) y datos sanitarios (conteo total de escamas, material viscoso y opérculos hundidos de todos los cuadros de cría de las colmenas en estudio y/o presencia de otra enfermedad). Los niveles de infección de loque americana se determinaron siguiendo la siguiente escala ordinal (Alippi *et al*, 2005):

- 0 – sin síntomas visibles de loque americana
- 1 - 1-10 escamas, material viscoso y/u opérculos hundidos
- 2 - 11-30 escamas, material viscoso y/u opérculos hundidos
- 3 - 31-99 escamas, material viscoso y/u opérculos hundidos
- 4 - ≥ 100 escamas, material viscoso y/u opérculos hundidos
- 5 – Recambio de reina debido a la loque americana.
- 6 – Muerte de la colmena debido a la loque americana.

1. 5 - ANÁLISIS ESTADÍSTICO: Se realizó un análisis de varianza no paramétrico a través del Test de Kruskal-Wallis para explorar la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) en tres momentos del ensayo: 1º Inspección (comienzo del ensayo), 5º Inspección (mitad del ensayo) y 10º Inspección (Final del ensayo). En los casos en donde existieron diferencias significativas se empleó el Test de Nemenyi modificado (Zar, 1998) para realizar comparaciones.

2. Resultados y Discusión:

Todos los tratamientos, incluidos los controles, fueron consumidos en el término de 20 a 31 días, particularmente los tratamientos realizados bajo la forma de candy (tilmicosina y su control), fueron los que más tardaron en consumirse (26 días promedio para el control y 31 días promedio para la tilmicosina). Es importante remarcar que el consumo que se observó en este ensayo estuvo caracterizado por el tamaño de la población en estudio, la época del año (otoño), y la adecuada presencia de reservas al momento de aplicar los productos a probar en este ensayo. Colonias más grandes, diferente época del año (primavera o verano) y/o la ausencia de reservas alimenticias puede devenir en un mayor o menor consumo de los sobres o candies.

Todos los tratamientos resultaron efectivos en controlar la enfermedad (Figura 8). Promediando el ensayo (5° Inspección que se corresponde con los 60 días de iniciados los tratamientos) todas las colmenas de los tratamientos tilosina, tilmicosina y oxitetraciclina no presentaban síntomas de la enfermedad. Mientras que cuatro de las cinco colmenas de lincomicina no presentaban síntomas de la enfermedad y la restante presentaba un nivel de infección 2 (dos) (Figura 9). Hacia el final el ensayo (10° Inspección que se corresponde aproximadamente con los 120 días de iniciados los tratamientos) ninguna de las colmenas de los cuatro tratamientos presentaban síntomas de la enfermedad, mientras que cinco de las diez colmenas usadas como control habían muerto por causa de la enfermedad (Figura 10), a pesar que tres de ellas tenían comportamiento higiénico superior al 80%.

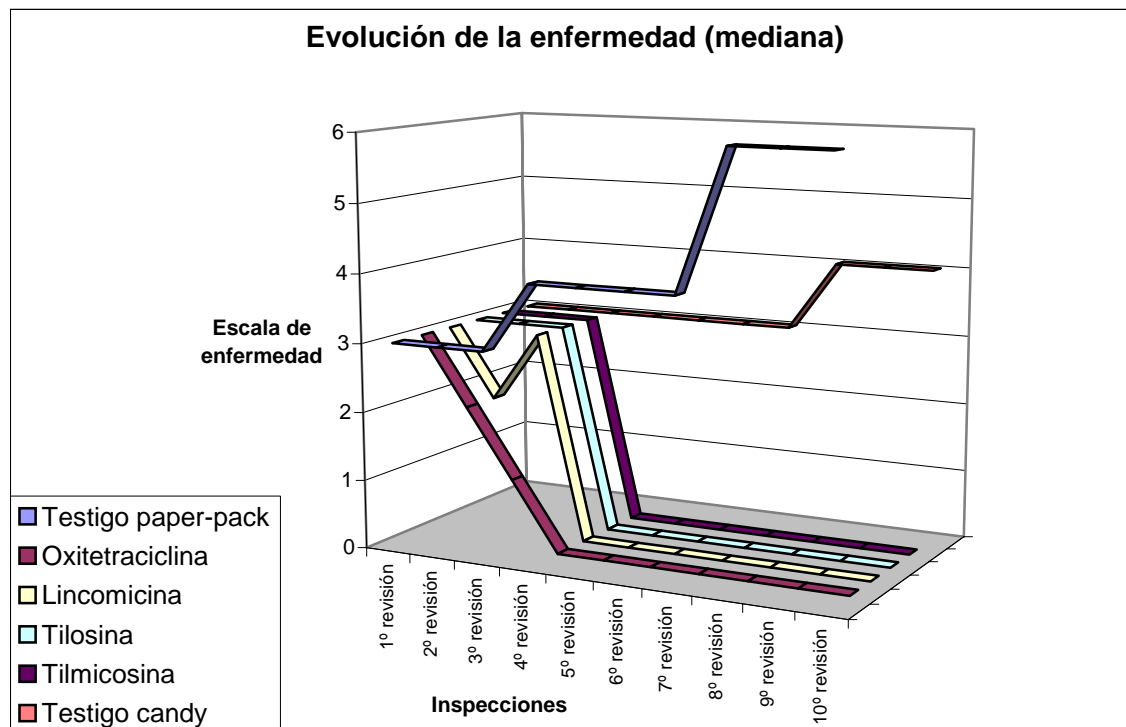


Figura 8: Evolución de la enfermedad (medianas) a lo largo de las 10 Inspecciones realizadas.

El test de Kruskal-Wallis no arrojó diferencias estadísticamente significativas en la 1º Inspección ($df = 5$; $p = 0,5380$), pero si para la 5º Inspección donde ya existen diferencias estadísticamente entre los tratamientos ($df = 5$; $p = 0,0001$). El Test de comparaciones múltiples de Nemenyi modificado (Zar, 1998)) mostró a los **Tratamientos A** (Testigo sobre) y **Tratamientos F** (Testigo candy) iguales entre sí y distintos al resto de los tratamientos, demostrando la efectividad de las drogas probadas. Finalmente en la 10º Inspección siguen existiendo diferencias significativas entre tratamientos ($df = 5$; $p < 0,00001$), y las posteriores comparaciones múltiples muestran a los **Tratamientos A** (Testigo sobre) y **Tratamientos F** (Testigo candy) iguales entre sí y distintos al resto de los tratamientos, corroborando la efectividad de los ATB probadas (Anexo de Tablas, Tabla 8).

Tabla 8: Tabla que muestra los valores usados y los resultados del Test de Nemenyi modificado.

	Comparación	SE	Q	Q (0,05; , 3)	Conclusión
5° Inspección	a vs b	219,841	3,730	2,472	Rechazo H0
	a vs d	219,841	3,730	2,472	Rechazo H0
	a vs e	219,841	3,730	2,472	Rechazo H0
	a vs c	219,841	3,230	2,472	Rechazo H0
	a vs f	219,841	0,455	2,472	Acepto H0
	f vs b	219,841	3,275	2,472	Rechazo H0
	f vs d	219,841	3,275	2,472	Rechazo H0
	f vs e	219,841	3,275	2,472	Rechazo H0
	f vs c	219,841	2,775	2,472	Rechazo H0
	c vs b	219,841	0,500	2,472	Acepto H0
	c vs d	219,841	0,500	2,472	Acepto H0
	c vs e	219,841	0,500	2,472	Acepto H0
	e vs b	219,841	0,000	2,472	Acepto H0
	e vs d	219,841	0,000	2,472	Acepto H0
	d vs b	219,841	0,000	2,472	Acepto H0
10° Inspección	a vs b	219,841	3,434	2,472	Rechazo H0
	a vs c	219,841	3,434	2,472	Rechazo H0
	a vs d	219,841	3,434	2,472	Rechazo H0
	a vs e	219,841	3,434	2,472	Rechazo H0
	a vs f	219,841	0,045	2,472	Acepto H0
	f vs b	219,841	3,389	2,472	Rechazo H0
	f vs c	219,841	3,389	2,472	Rechazo H0
	f vs d	219,841	3,389	2,472	Rechazo H0
	f vs e	219,841	3,389	2,472	Rechazo H0
	e vs b	219,841	0,000	2,472	Acepto H0
	e vs c	219,841	0,000	2,472	Acepto H0
	e vs d	219,841	0,000	2,472	Acepto H0
	d vs b	219,841	0,000	2,472	Acepto H0
	d vs c	219,841	0,000	2,472	Acepto H0
c vs b	219,841	0,000	2,472	Acepto H0	

Como queda claramente representado en la Figura 8, todos los tratamientos probados en este trabajo fueron efectivos en controlar la enfermedad a campo.

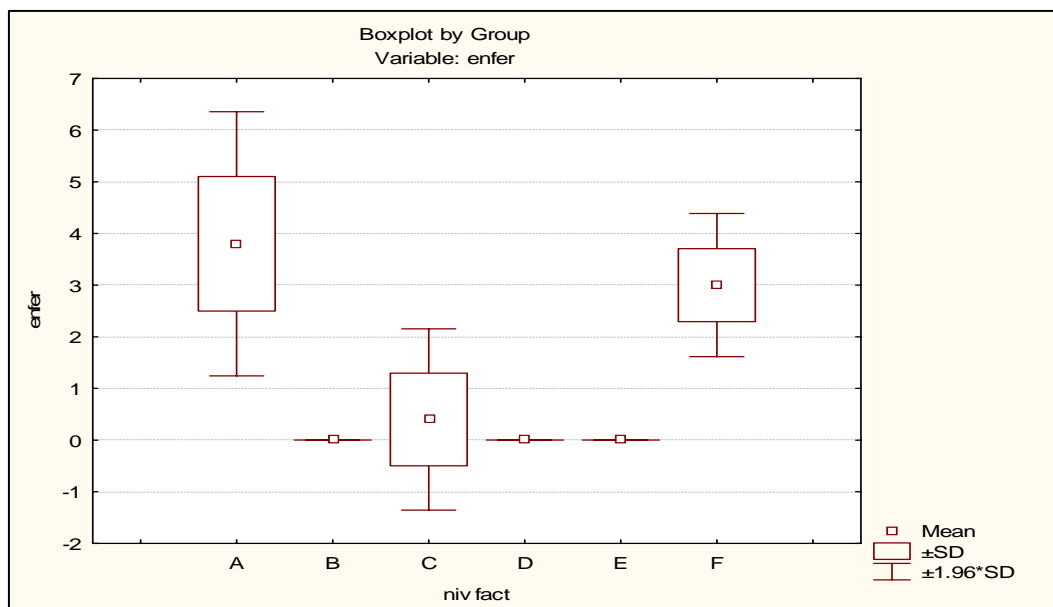


Figura 9: Medias y desvíos estándar de los 6 tratamientos en la 5^o Inspección. **Tratamientos A** (Testigo sobre), **Tratamiento B** (oxitetraciclina), **Tratamiento C** (lincomicina), **Tratamiento D** (tilosina), **Tratamiento E** (tilmicosina), **Tratamiento F** (Testigo Candy).

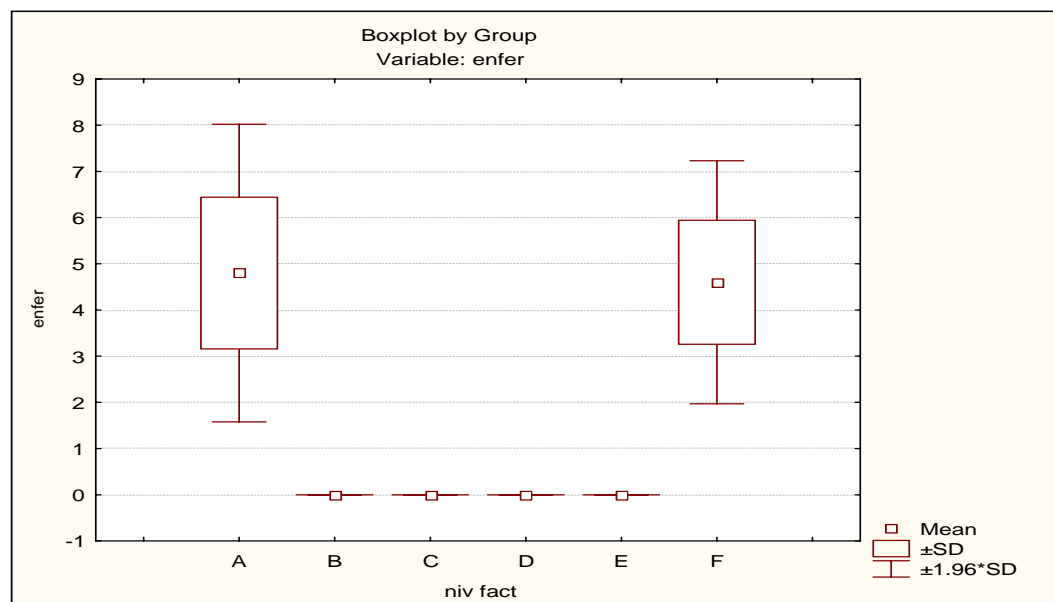


Figura 10: Medias y desvíos estándar de los 6 tratamientos en la 10^o Inspección. **Tratamientos A** (Testigo sobre), **Tratamiento B** (oxitetraciclina), **Tratamiento C** (lincomicina), **Tratamiento D** (tilosina), **Tratamiento E** (tilmicosina), **Tratamiento F** (Testigo Candy).

Esta conclusión se desprende del hecho que para la 5° Inspección, 19 de las 20 colmenas tratadas con antibióticos carecían de síntomas clínicos de la enfermedad (sólo una colmena del tratamiento lincomicina presentaba un nivel de infección 2 (dos)). A partir de la 6° Inspección y hasta la 10° Inspección ninguna de las 20 colmenas tratadas y recuperadas volvió a mostrar síntomas clínicos de la enfermedad. Más aún, 180 días post-tratamiento se testearon las colmenas con el fin de relevar la sanidad de las mismas sin encontrar síntomas de loque americana.

Los tratamientos tilosina y tilmicosina (ambos del grupo de los macrólidos) presentaron el mismo tipo de evolución al momento de controlar la enfermedad a campo mostrando un descenso de los niveles de infección en todas las colmenas de la 3° a la 5° Inspección. Este hecho muestra claramente que estos ATB son realmente efectivos para controlar la enfermedad a campo. Por otra parte, los 2 excipientes utilizados (sobre y candy) en los tratamientos tilosina y tilmicosina respectivamente, no aportaron diferencias en el comportamiento de los mismos. Asimismo, el uso de estos macrólidos a las dosis y con los excipientes propuestos asegura la ausencia de recurrencia por seis meses, según lo observado en este ensayo.

La efectividad que mostró el macrólido tilosina concuerda con otros investigadores empleando otras formas de aplicación, como Hitchcock y col. (1970) quienes aplicaron tilosina en forma de espolvoreado sobre los cabezales de los cuadros de cría; Moffet y col. (1970) vehiculizaron la tilosina en jarabe; Peng y col. (1996) usando 200 mg de tilosina durante 4 semanas eliminaban los síntomas de la enfermedad hasta 7 semanas post-tratamiento. Estos últimos observaron que las abejas eran renuentes a consumir 800 mg. de tilosina en 7 gr. de azúcar. En este ensayo no hubo problemas de aceptación, de forma similar Alippi y col. (1999) cambiando el tipo de excipiente tampoco observaron inconvenientes en el consumo de 750 mg. de tilosina. Asimismo, Alippi *et al* (1999, 2005) demostraron

que usando 1,5 gr. de tilosina no encuentran recurrencia hasta 1 año post-tratamiento. Elzen *et al* (2002a, b) espolvoreando 200 o 400 mg de tilosina sobre los cabezales de los cuadros de cría observaron ausencia de síntomas clínicos de la enfermedad entre 15 y 45 días post-tratamientos sin recurrencia hasta 150 días post-tratamientos. Finalmente Pettis & Fedlaufer (2005) eliminaron los síntomas de la enfermedad usando 600 mg de tilosina por colmena, pero no definieron cual era el tiempo en que esa dosis protegía a la colmena.

Recientemente SENASA aprobó la tilosina para su uso en abejas (www.alimentosargentino.gov.ar/apicola, Abril 2005), pero aún no se comercializa en nuestro país. Paralelamente se aprobó el uso de tilosina en EUA a una dosis de 200 mg durante tres semanas (Federal Register, 2005).

Cabe destacar que la tilmicosina a pesar de ser el antimicrobiano de mayor uso en veterinaria (NCCLS, 2002), no había sido probado para el control de loque americana a nivel mundial. En este trabajo se encontró una excelente efectividad a campo.

La lincosamida (Lincomicina) pudo controlar totalmente la enfermedad a partir de los 75 días y hasta los 150 días. Fedlaufer *et al* (2001) y Pettis & Fedlaufer (2005) llegaron a conclusiones similares usando 600 mg de lincomicina, pero evaluaron la recurrencia hasta 60 días post-tratamiento.

La Oxitetraciclina mostró en los ensayos de campo una muy buena efectividad, a partir de la 1° Inspección la cantidad de síntomas presentes en las colmenas desciende bruscamente hasta llegar a desaparecer definitivamente en la 5° Inspección. Resultados similares encontraron Alippi y col. (1999). A pesar de este excelente resultado a campo es importante recordar que para este ensayo, y por razones de seguridad, se trabajó con una cepa de *Paenibacillus larvae* susceptible a la oxitetraciclina, pero ya existen reportes de cepas resistentes a la

oxitetraciclina en Argentina, EUA y Canadá (Alippi, 2000; Colter, 2000; Evans, 2003; Miyagi *et al*, 2000).

3. Conclusiones:

Todos los ATB ensayados en esta tesis resultaron efectivos para el control de la enfermedad a campo a las dosis y en las formas de aplicación probadas.

Para todos los ATB sería imprescindible determinar la MPC para poder definir la menor dosis a usar de forma tal que no solo sea efectiva a campo, sino que también evite la selección de mutantes resistentes con todos los problemas que esto trae aparejado para una enfermedad endémica como lo es la loque americana.

Capítulo 6

Consideraciones finales y Conclusiones

El objetivo central de esta tesis fue la evaluación integral de los antibióticos oxitetraciclina, tilosina, tilmicosina y lincosamina para el control de loque americana.

Si bien la mayoría de los problemas sanitarios de la abeja melífera se controlan con "Normas de Manejo Integrado", el empleo de antibióticos sigue siendo fundamental para un efectivo control de las enfermedades bacterianas, en particular, aquellas causadas por patógenos esporulados como es el caso de *Paenibacillus larvae*, agente causal de la loque americana.

La utilización exclusiva de químicos como única forma de control, tampoco corrige el problema, no obstante, el uso de los mismos junto con otras prácticas de manejo (paqueteado o cepillado de abejas o, incluso en caso de infecciones incipientes raleado de cuadros) resulta en una mayor eficiencia. Por otra parte, el grupo trabajo que dirige la Ing. Alippi y del cual formo parte, tiene una basta experiencia en el uso de aceites esenciales para el control de loque americana. A pesar de mostrar una alta efectividad *in vitro* nunca presentó efectividad a campo a las dosis y con la posología probada.

La aplicación de oxitetraciclina (como clorhidrato) es el tratamiento más difundido localmente en los apiarios afectados por loque americana, particularmente debido a su vida media corta lo cual implica una baja residualidad en miel.

Los resultados obtenidos en esta tesis demostraron que la oxitetraciclina es efectiva para controlar la enfermedad, pero paralelamente es tóxica para las larvas

Capítulo 6. Consideraciones finales y Conclusiones

a las dosis recomendadas. El valor de LD50 obtenido para el caso de las abejas adultas resultó muy cercano al límite impuesto para compuestos tóxicos, de modo que una mala dosificación a campo podría fácilmente resultar en toxicidad para adultas.

Adicionalmente, se han encontrado casos de resistencia a las tetraciclinas en las poblaciones naturales de *Paenibacillus larvae* de distintos orígenes geográficos. Entre los posibles factores de resistencia se incluyen:

- Sub-dosificación a campo, producto de la "*cura preventiva*" usada por los apicultores, particularmente en la Argentina (Ing. Agr. Raúl Pérez, Com. Pers.) donde se emplea la mitad del principio activo necesario para controlar a la enfermedad (un problema cuya posible solución comenzaría con la capacitación de asesores apícolas (drogas aprobadas, formas de aplicación, residualidad de las mismas, etc.) junto a un rol más protagonista por parte del estado a través de asesorías y capacitaciones gratuitas a los asesores que se encuentran en relación directa con los productores).
- La tetraciclina era la única droga aprobada mundialmente para controlar la loque americana hasta el año 2005, lo que pudo generar una importante presión de selección hacia cepas resistentes.
- En la última década han aparecido nuevas pestes que afectan a las colmenas generando un debilitamiento de las mismas. Por ello se requiere un mayor número de tratamientos para mantener una correcta sanidad, favoreciendo de esta forma la posibilidad de generar cepas resistentes.

Capítulo 6. Consideraciones finales y Conclusiones

Por estas razones, creímos conveniente evaluar antibióticos alternativos para el control de la enfermedad los cuales habían mostrado un muy buen comportamiento *in vitro*, incluyendo el control de cepas bacterianas resistentes a oxitetraciclina.

Tanto tilosina, como lincomicina y tilmicosina resultaron altamente eficientes en eliminar los síntomas clínicos de loque americana en colmenas inoculadas artificialmente y no presentaron toxicidad para larvas ni para adultas.

Restaría determinar, para lincomicina y tilmicosina, los valores de vida media en miel, polen, jalea real y ceras, dado que sólo hay datos para el caso de tilosina, la cual, pese a presentar una altísima efectividad en colmenas y nula toxicidad para adultas y larvas genera una mayor residualidad de productos de degradación intermedia en miel. Asimismo, es menester destacar que potenciales desbalances en la flora nativa de las abejas, la reducción de la vida media, o la reducción de la producción de miel, son parámetros que deberían ser estudiados con el fin de realizar un estudio más abarcativo del uso de antibióticos en colmenas.

Con el propósito de evitar la presencia de residuos de antibióticos en mieles, se corre el riesgo de la sub-dosificación a campo por parte de los productores, lo cual haría que las dosis empleadas cayeran dentro de la ventana de selección de mutantes, de forma tal que esta solución se transformaría en un grave problema a corto plazo. Sería conveniente profundizar estos estudios para encontrar la Concentración Selectora de Mutantes *in vitro* y así determinar las dosis adecuadas a campo. Cabe destacar que la aparición de resistencia es un hecho inevitable; para el caso particular de la resistencia transmitida vía vertical, una aproximación a este valor puede calcularse a través de la determinación de la Ventana de Selección de Mutantes Pero para la resistencia transmitida vía horizontal es algo que no se puede calcular ni predecir.

Capítulo 6. Consideraciones finales y Conclusiones

Creemos importante resumir las características de la apicultura Argentina:

- Medianos y grandes productores que se dedican a apicultura trashumante.
- Pequeños productores distribuidos en 21 de las 23 provincias del país.
- Una historia de multiplicación de material vivo sin control sanitario.
- Empleo de oxitetraciclina para el control de otra enfermedad bacteriana, la loque europea a partir de su introducción en la década del 60.
- 17 años desde la introducción de loque americana a nuestro país y 7 años de la primera detección de la resistencia de *P. larvae* a la oxitetraciclina.

Lo antedicho, describe un panorama de dispersión del patógeno que hace impensable el manejo de la enfermedad sin el uso complementario y estratégico de antibióticos.

Por otra parte, la reciente postura de la Comunidad Económica Europea (CEE) de exigir tolerancia cero de residuos de antibióticos en miel, hace imperioso el correcto uso de los mismos. No obstante este tipo de requisitos muchas veces no está relacionado con potenciales efectos en la salud humana sino más bien con aspectos económico, particularmente los Límites Máximos Permitidos (LMR) para las drogas en estudio tienen un valor oficial, en tanto que estos mismos LMR de las únicas drogas a probadas para su uso en apicultura son, paradójicamente entre 3 (oxitetraciclina 100 µg/Kg. para alimentos y 30 µg/Kg. para miel) y 10 (tilosina 100 µg/Kg. para alimentos y 10 µg/Kg. para miel) veces menores. Esto es realmente llamativo, ya que el consumo de miel/persona/año es muy bajo (nunca mayor a 4 Kg/persona/año, www.alimentosargentinos.gov.ar/apicola) por lo que aquí se considera que los límites impuestos de residuos en miel deberían encuadrarse dentro de otra situación global.

Capítulo 6. Consideraciones finales y Conclusiones

Los países con una apicultura desarrollada, como Argentina y EUA, deben garantizar la continuidad y el desarrollo de esta importante actividad agropecuaria para que siga generando divisas.

Se debe desmitificar el empleo de antibióticos en colmenas mediante el uso racional de los mismos respetando los parámetros de seguridad adecuados, como ocurre en medicina humana y veterinaria. El uso racional de antibióticos minimizaría los efectos potencialmente nocivos que pudieran tener en humanos los residuos de antibióticos son: **Efectos en la microbiota intestinal humana** debidos a: 1- Modificación en la actividad metabólica de la microbiota, 2- Cambios en la población bacteriana, 3- Selección artificial de bacterias resistentes y 4- Alteración del efecto barrera. (Sundlof *et al.*, 2000; Perrin-Guyomard *et al.*, 2001), o las **Reacciones de Hipersensibilidad**: 1- Hipersensibilidad a drogas, 2- Alergias a drogas que van desde rash cutáneos hasta shock anafilácticos Sundlof *et al.*, 2000.)

A continuación se transcriben las principales conclusiones de este trabajo de tesis que estudió la efectividad de distintos antibióticos para el control de la loque americana, una de las enfermedades más graves que afectan a las abejas.

Conclusiones:

- ✓ El medio MYPGP resultó altamente efectivo para determinar la sensibilidad/resistencia de *P. larvae* frente a los antibióticos tilosina, tilmicosina, oxitetraciclina y lincomicina porque permitió el crecimiento óptimo de esta especie y los controles de calidad se ajustaron a los parámetros propuestos.

Capítulo 6. Consideraciones finales y Conclusiones

- ✓ Se proponen las siguientes cargas de discos:
 - Tetraciclina: 5 μg
 - Tilosina: 15 μg
 - Tilmicosina: 15 μg
 - Lincomicina: 15 μg

- ✓ Se propone el siguiente standard para interpretación de los discos:
 - Tetraciclina: sensible ≥ 19 mm; Intermedio 15-18 y resistente ≤ 14
 - Tilosina: sensible ≥ 14 mm; Intermedio 11-13 y resistente ≤ 10
 - Tilmicosina: sensible ≥ 14 mm; Intermedio 11-13 y resistente ≤ 10
 - Lincomicina: sensible ≥ 21 mm; Intermedio 15-20 y resistente ≤ 14

- ✓ Se proponen los siguientes puntos de corte epidemiológicos para las CIM:
 - Tetraciclina: sensible ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$ y resistente > 16 $\mu\text{g/ml}$
 - Tilosina: sensible ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ y resistente > 8 $\mu\text{g/ml}$
 - Tilmicosina: sensible ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ y resistente > 8 $\mu\text{g/ml}$
 - Lincomicina: sensible ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$ y resistente > 16 $\mu\text{g/ml}$

- ✓ Ninguno de los ATB evaluados resultó tóxico para abejas adultas; tanto tilosina, como tilmicosina y lincomicina resultaron virtualmente atóxicos. En el caso de oxitetraciclina los valores de LD50 obtenidos fueron próximos al límite de compuestos tóxicos, de modo que un mínimo error en la dosificación a campo puede resultar en toxicidad para abejas adultas.

- ✓ La técnica puesta a punto en esta tesis para determinar la toxicidad larval de los ATB resultó satisfactoria y permitió determinar claramente diferencias estadísticamente significativas.

- ✓ Sólo el tratamiento oxitetraciclina presentó una mortandad larval superior a la normal, lo cual demuestra que resulta tóxico. Tilmicosina, tilosina y lincomicina por el contrario no resultaron tóxicos para las larvas, aunque de los tres, la tilmicosina presentó un mayor porcentaje de toxicidad dentro de los parámetros normales y la lincomicina tuvo los niveles de mortandad más bajos.
- ✓ Todos los antibióticos ensayados en esta tesis resultaron efectivos para el control de la enfermedad a campo a las dosis y en las formas de aplicación probadas.
- ✓ Los resultados de todos los ensayos con tilmicosina para el control de *P. larvae*, tanto in vitro como a campo y de toxicidad para abejas y larvas, constituyen el primer registro a nivel mundial.
- ✓ Los resultados de todos los ensayos con lincomicina para el control de *P. larvae*, tanto in vitro como a campo y de toxicidad para abejas y larvas, son inéditos para la Argentina.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Acar, J. F. & Goldstein, F. W. 1985. "Disk susceptibility test" IN *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Ed. Lorian, V. Ch. 2, pp 27-63. Baltimore: Williams & Wilkins.
2. Alippi, A.M. 1992. Characterization of *Bacillus larvae* White, the causative agent of AFB of honey bees. First record of its occurrence in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología* 24: 75-80.
3. Alippi, A. M. 1996. Caracterización de aislamientos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* mediante tipo bioquímico y resistencia a oxitetraciclina. *Revista Argentina de Microbiología*. 28: 197-203.
4. Alippi, A.M.; Albo, G.N.; Leniz, D.; Rivera, I.; Zanelli, M.L.; Roca, A.E., 1999. Comparative study of tylosin erythromycin and oxitetracycline to control American Foulbrood of honeybees. *Journal of Apicultural Research*. 38: 149-158.
5. Alippi, A. M., 2000. Is Terramycin® losing its effectiveness against AFB?. The Argentinean experience. *Bee Biz* 11, 27-29.
6. Alippi, A. M.; Albo, G. N.; Reynaldi, F. J. & De Giusti, M. R. 2005. In vitro and in vivo susceptibility of the honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* to the antibiotic tylosin. *Veterinary Microbiology*. 109: 47-55.
7. Andrews, J. M., 2001. BSAC Standardized Disc Susceptibility Testing Method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48: 43-57.

Bibliografía citada.

8. Andrews, J. M., 2004. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations. 5 de agosto de 2005 http://www.bsac.org.uk/db/documents/version_4_january_2005_final_NH_april_2.pdf
9. Ash, C.; Priest, F. G. & Collins, D. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Walbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie Van Leeuwenhoek* 46: 270-279.
10. Bailey, L & Ball, B.V. (Eds.) 1991. Honey Bee Pathology, Second Edition, Academic Press, London.
11. Bailey, L. & Lee, D. C. 1962. *Bacillus larvae*: its cultivation *in vitro* and its growth *in vivo*. *Journal General Microbiology* 29: 711-171.
12. Barry, A. L. 1985. "Procedure for Testing Antimicrobial Agents in Agar Media: Theoretical Considerations" IN *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Ed. Lorian, V. Ch. 1, pp 1-26. Baltimore: Williams & Wilkins.
13. Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J.C. & Turck, M. 1996. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *The American Journal of Clinical Pathology*. 45: 493-496.
14. Charboneau, R.; Gosselin, P & Thibault, C. 1992. Irradiation and AFB. *American Bee Journal* 132:249-251.
15. Colter, D. 2000. Antibiotic Resistant American Foulbrood, *Alberta Bee News*, February 4.

Bibliografía citada.

16. Cox, R. L. 2000. Incidence of oxytetraciline *Paenibacillus larvae* spores in honey samples from Iowa. *Proceedings of the American Bee Research Conference IN American Bee Journal Vol. 140: 901.*
17. Dadant e Hijos. 1975. La colmena y la abeja mellifera. Editorial Hemisferio Sur.
18. Del Hoyo, M.; Basualdo, M.; Lorenzo, A.; Palacio, M.A.; Rodríguez, E.M. & Bedascarrasbure, E. 2001. Effect of shaking honey bee colonies affected by American foulbrood on *Paenibacillus larvae larvae* spore loads. *Journal of Apicultural Research 40: 65-69.*
19. Dingman, D.W. & Stahly, D.P. 1983. Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Applied and Environmental Microbiology. 46:860 869.*
20. Drlica, K. 2003. The mutant selection window and antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 52: 11-17*
21. Elzen, P.; Westervelt, D.; Causey, D.; Rivera, R.; Baxter, J.; Fedlaufer, M. 2002a. Control of oxytetraciline-resistant American Foulbrood with tylosin and its toxicity to honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research 41:97-100.*
22. Elzen, P.; Westervelt, D.; Causey, D.; Ellis, J.; Hepburn, H.R.; Neumen, P. 2002b. Method of application of tylosin, an antibiotic for American Foulbrood control, with effects on small hive beetle (Coleoptera: Nitidulidae) populations. *Journal of Economic Entomology 95: 1119-1122.*

Bibliografía citada.

23. EPA PROBIT, United State Environmental Protection Agency. 1994. EPA PROBIT Analysis Program Used for Calculating CC / EC Values; Version 1,5. Environmental Monitoring and Support Laboratory: Cincinnati, 1994.
24. Evans, J. D., 2003. Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *Journal Invertebrate Pathology* 83, 46-50.
25. Federal Register. 2005. Vol. 70, No. 220 / Wednesday, November 16, 2005 / Rules and Regulations
26. Fedlaufer, M. F.; Pettis, J. S.; Kochansky, J. P & Stiles, G. 2001. Lincomycin hydrochloride for the control of American foulbrood disease of honey bees. *Apidologie* 32; 547-554.
27. Finney, D.J., 1971, Probit Analysis. Cambridge University: Cambridge.
28. Flores, J. 1984. Farmacología humana. Segunda Edición. Ed. Salvat Medicina.
29. Fukuda, H & Sakagami, S.F. 1968. Worker brood survival in honeybees. *Research Population Ecology* 10: 31-39.
30. García Girou, N. 2003. Fundamentos de la Producción Apícola Moderna. Ed.
31. Genersch, E; Forsgren, E; Pentikäinen, A; Ashiralieva, A; Rauch, S; Kilwinski, J & Fries, I. 2005. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *IJSEM Papers in Press- Published online 4 November 2005 as <http://dx.doi.org/10.1099/ijis.0.63928-8>*.

Bibliografía citada.

32. Gilliam, M & Argauer, RJ. 1975. Stability of oxitetracycline in diets fed to honeybee colonies for disease control. *Journal of Invertebrate Pathology* 26:383-386.
33. Gilliam, M.; Tauber, S. III; Lorenz, B.J. & Prest, D.B. 1989. Hygienic honeybees and antagonistic normal microflora for control Chalkbrood disease. *XXXII International Apicultural Congress of Apimondia. Rio de Janeiro. Brazil. October 22-28.*
34. Glinski, Z. & Rzedzicki, J. 1977. Evaluation of *Bacillus larvae* to antibiotics and sulfonamides in Poland in 1962-1971. *Polsk. Arch. Wet.* 20:9-16.
35. Gough, H J; Mc Indoe, E C ; Lewis, G B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity test on honey bees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. *Journal of Apicultural Research* 33: 119-15-25.
36. Gregorc, A. & Bowen, I. D. 1998. Histopathological and histochemical change in honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) after infection with *Bacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood disease. *Cell Biology International.* 22: 137-144.
37. Heyndrickx, M.; Vandemeulebroecke, K.; Hoste, B.; Janssen, P; Kesters, K; De Vos, P.; Logan, N.A.; Ali, N. & Kerkely, R. C. WR. C. (1996). Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash *et al*, 1993, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906). Ash *et al*. 1994 as a subsp of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* subsp *larvae* and *P. larvae* subsp *pulvifaciens*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 270-279.

Bibliografía citada.

38. Hitchcock, J.D.; Moffett, J.O.; Lacket, J.J. & Elliot, J.R. 1970. Tylosin for control American Foulbrood disease in honeybees. *Journal of Economic Entomology* 63: 204-207.
39. Hoage T.R. & Rothenbulher W.C. 1966. Larval honey bee response to various doses of *Bacillus larvae* spores. *Journal of Economic Entomology* 59:42-45.
40. Hornitzky, M. 2005. Oxytetracycline sensivity of *Paenibacillus larvae*. subsp. *larvae* isolates. *A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Nº 05/021:1-6.*
41. ICBB International Commission for Bee Botany, 1985. Third symposium on the harmonization of methods for testing the toxicity of pesticides to bees. Rothamsted Experimental Station; Harpenden, UK.
42. Johansson, T.S.K. & Johansson, M.P. 1971. Direct Measurement of Comb Area with a Planimeter. *American Bee Journal* 111: 179.
43. Kahlmeter, G.; Brown, D.F.J.; Goldstein, F.W.; MacGowan, A.P.; Mouton, J.W.; Österlund, A.; Rodloff, A.; Steinbakk, M.; Urbaskova, P. & Vatopoulos, A. 2003. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52: 145-148.
44. Kapusnik-Uner, J. E.; Sande, M. A. & Chambers, H. F. 1996 "Fármacos antimicrobianos. Tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina y diversos antibacterianos" EN *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Ed. Goodman Gilman, A. Cap 47, pp 1193-1224.* México D. F.: Mc Graw-Hill Interamericana.

Bibliografía citada.

45. Kochansky, J.; Knox, D. & Shimanuki, H.. 1999. Comparative stability of tetracycline and tilosyn in sugar syrup. *Apidologie* 31: 321-326.
46. Kochansky, J.; Knox, D.; Fedlaufer, M. & Pettis, J. S. 2001. Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and -resistant *Paenibacillus larvae*. *Apidologie* 32:215-222.
47. Kraus, B.; Koeninger, N. & Fuchs, S. 1994. Screening substances for their effect on *Varroa jacobsoni*: Attractiveness, repellency, toxicity and masking effects of ethereal oils. *Journal of Apicultural Research* 33:34-43.
48. Lorian, V. 1985. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore.
49. MacGowan, A. P. & Wise, R. 2004. Establishing MIC breakpoints and the interpretation of *in vitro* susceptibility tests. 5 de agosto de 2005 http://www.bsac.org.uk/_db/_documents/version_4_january_2005_final_NH_april_2.pdf
50. MAFF. 1998. A review of Antimicrobial Resistance in the Food Chain. New Zealand. 3 de agosto de 2005 <http://archive.food.gov.uk/maff/pdf/resist.pdf>
51. Matheson A. 1993. World bee health report. *Bee world* 74: 176-212.
52. Matheson A. 1996. World bee health update. *Bee world* 77: 45-51.
53. Matheson A. & Reid M. 1992. Strategies for the Prevention and Control of American Foulbrood (part I of a Three-part Series). *American Bee Journal* 399 - 402.

Bibliografía citada.

54. Matheson A. & Reid M. 1992. Strategies for the Prevention and Control of American Foulbrood (part II of a Three-part Series). *American Bee Journal* 471-475.
55. Matheson A. & Reid M. 1992. Strategies for the Prevention and Control of American Foulbrood (part III of a Three-part Series). *American Bee Journal* 534-547.
56. Matsuka, M. & Nakamura, J. 1981. Oxytetracycline residues in honey and royal jelly. *Journal of Apicultural Research* 29: 112-117.
57. Message, D. & Gonçalves, L.S. 1977. Estudio da resistência compartamental à cria pútrida européia em *Apis mellifera adansonni* (africanizadas). *Anais do 4º Congresso Brasileiro de Apicultura (Curitiba)1976: pp. 185-191.*
58. Miyagi, T., Peng, C.Y.S., Chuang, R.Y., Mussen, E.C., Spivak, M.S., Doi, R.H.. 2000. Verification of oxitetracycline-resistant American Foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology* 75, 95-96.
59. Moffett, J.O.; Hitchcock, J.D.; Lockett, J.J.; Elliot, J.R. 1970. Evaluation of some new compounds in controlling American foul brood. *Journal of Apicultural Research* 9: 39-44.
60. Morse R.A. & Nowogrodzki R. (Eds.) 1990. Honey bee pests, predators and diseases. Second Ed., *Cornell University Press, 474pp.*
61. Nakajima, C., Okayama, A., Sakogawa, T. & Hayama, T. 1997. Disposition of Ampicillin in Honeybees and Hives. *Journal of Veterinary Medicine*

Bibliografía citada.

Science 59: 765-767.

62. Nakajima, C.; Sakogama, T.; Okayama, A; Nakamura, A & Hayama, T. 1998. Disposition of mirosamicin in honeybee hives. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 21: 269-273.*
63. NCCLS Document M31-A2. 2002. *Performance Standards for the Antimicrobial Disk and Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard-Second Edition.* NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).
64. NCCLS Document M2-A8. 2003. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard-Eighth Edition.* NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).
65. NCCLS Document M7-A6. 2003. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard-Sixth Edition.* NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).
66. NCCLS Document M100-S15. 2005. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. Disk diffusion. Vol. 25 N°1.* NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards).
67. Okayama, A.; Sakowama, T.; Nakajima, C. & Hayama, T. 1996. Biological properties and antibiotic susceptibility of *Bacillus larvae* originated from American Foulbrood of honeybee in Japan. *Journal of Veterinary Medicine Science 58: 439-441.*
68. Oomen, P. A., De Ruijter, A. & Van Der Steen, J. "Method for honeybee

Bibliografía citada.

- brood feeding tests with insect growth-regulating insecticides". *Bulletin OEPP/EPPO*. **22**, 613-616.
69. Otto Alberto Sussmann P., Lorenzo Mattos & Andrés Restrepo. 2006. Resistencia bacteriana <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026%20Resistencia.PDF>
70. Page Jr., R.E. 1980. New photographic method for estimating numbers of sealed brood cells. *Journal of Apicultural Research* 19: 202-204.
71. Palacio, M. A.; Figini, E.; Del Hoyo, M.; Rodríguez, E.; Bedascarrasbure, E.; Ruffinengo, S. & Cuenca Estrada, G. 1996. Selección para comportamiento higiénico en una población de *Apis mellifera* sujeta a selección y su relación con las enfermedades de la cría. *5th Congreso Ibero Latinoamericano de Apicultura*; pp. 148-150.
72. Peng, Y.S.; Mussen, E.; Cheng, P.; Fong, A.; Montague, M.A. & Tyler, T. 1992. "Effects of Chlorotetracycline of Honey Bee Worker Larvae Reared *in vitro*" . *Journal of Invertebrate Pathology* 60: 127-133.
73. Peng, Y.S.; Mussen, E.; Fong, A.; Cheng, P.; Wong, G. & Montague, M.A. 1996. Laboratories and field studies on the effects of the antibiotics tylosin on honey bees *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Development and prevention of American Foulbrood disease. *Journal of Invertebrate Pathology* 67: 64-71.
74. Perrin-Guyomard, A., Cottin, S., Corpet, D. E., Boisseau, J. and Poul, J.-M. 2001. Evaluation of residual and therapeutic doses of tetracycline in the human-flora-associated (HFA) mice model. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 34, 125-136.

Bibliografía citada.

75. Pettis, J.S.; Kochansky, J. & Fedlaufer M.F. 2004. Larval *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) Mortality after Topical Application of Antibiotics and Dusts. *Journal of Economic Entomology* 97:171-176.
76. Pettis, J. S. & Fedlaufer, M. F. 2005. Efficacy of lincomycin and tylosin in controlling American foulbrood in honey bee colonies. *Journal of Apicultural Research* 44: 106-108.
77. Piccini, C. & Zunino, P. 2001. American Foulbrood in Uruguay: Isolation of *Paenibacillus larvae larvae* from Larvae with Clinical Symptoms and Adult Honeybees and Susceptibility to Oxytetracycline. *Journal of Invertebrate Pathology* 78:176-177.
78. Piddock, L. J. V. 1990. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensivity in bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*. 68:307-318.
79. Rang, H.P.; Dale, M. M. & Ritter, J. M. 2000 Farmacología. Cuarta edición. Edición Harcourt.
80. Ratnieks, F.L.W. 1992. American Foulbrood: The spread and control of an important disease of honey bee. *Bee World*, 73:177-191.
81. Rinderer, T. E.; M.A. Collins 1986. Behavioural Genetics. *In: Bee Genetics and Breeding*. (Rinderer, T.E., ed.). Academic Press, Inc. London, United Kingdon.
82. Roberts, M. C. 1994. Epidemiology of tetracycline-resistance determinants. *Trends in Microbiology*. 2: 353-357.

Bibliografía citada.

83. Roberts, M. C. 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Reviews* 19: 1-24.
84. Roberts, M. C. 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters* 245: 195-203.
85. Rothenbuhler, W.C. 1964. Behavior genetics of nest cleaning in honeybees. I. Responses of four inbred lines to disease-killed brood. *American Zoologist* 4: 111-123.
86. SENASA. 2005. www.alimentosargentinos.gov.ar/apicola 22 de Abril de 2000, 11:30 hs.
87. Shimanuki, H. 1990. Bacteria In: Honey bee pests, predators and disease. Second Ed.. Morse R. A. and Nowogrodsky R. (Eds.). Cornell University Press, USA, pp 27-47.
88. Shimanuki, H. & Knox, D. A. 1994. Susceptibility of *Bacillus larvae* to Terramycin. *American Bee Journal* 134: 125-126.
89. Shimanuki, H. & Knox, D. A. 2000. "Diagnosis of Honey Bee Diseases". IN *Agriculture Handbook Number 690'*. USDA (United States Department of Agriculture).
90. Shryock, T. R.; White, D.W.; Werner, C.S. & Staples, J.M. 1995. Proposed Quality Control Guidelines for Antimicrobial Susceptibility Test Using Tilmicosin. *Journal of Clinical Microbiology*. 33: 331-335.

Bibliografía citada.

91. Shryock, T. R.; White, D.W.; Staples, J.M. & Werner, C.S. 1996. Minimum inhibitory concentration breakpoints and disk diffusion inhibitory zone interpretive criteria for tilmicosin susceptibility testing against *Pasteurella* spp. associated with bovine respiratory disease. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*. 8:337-344.
92. Spivak, M. & Gilliam, M. 1998a. Hygienic behavior of honey bees and its application for control of brood disease and Varroa. *Bee World* 79(3): 124-134.
93. Spivak, M. & Gilliam, M. 1998b. Hygienic behavior of honey bees and its application for control of brood disease and Varroa. *Bee World* 79: 169-186.
94. Spivak, M & Reuter, G. S. 2001. Resistance to American Foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* 32: 555-565.
95. Sporns,P.; Kwan,S: & Rooth, L.A.. 1986. HPLC analysis of oxitetracycline residues in honey. *Journal of Food Protection* 49: 383-388.
96. Sthaly, P. & Ryan, K. C. 1995. Minimal inhibitory concentrations of virginiamycin and flavomycin for *Bacillus* larvae.
97. Sokal, R.R.; Rohlf, F.J., 1981. Biometry. W. H. Freeman: New York; Chapters 13, 14.
98. Sturtevant, A. P. 1932. Relation of commercial honey to the spread of American foulbrood. *Journal of Agricultural Research* 45: 257-285.

Bibliografía citada.

99. Sumano Lopez, H. S. & Ocampo Cambreros, L. 1997. *Farmacología Veterinaria*. Segunda edición. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana.
100. Sundlof, S. F., Fernandez, A. H. and Paige, J. C. 2000. Antimicrobial drug residues in food-producing animals. In: Prescott, J. F., Baggot, J. D. and Walker, R. D. (eds.) *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, 3 rd ed. Ames, Iowa, USA, pp. 744-759.
101. Tanada, Y & Kaya, H. K. (eds.). 1993. *Insect Pathology*. Academic Press Inc., Harcourt Brace Jovanovich Publishers.
102. Toporcak, J.; Nagy, J. & Sokol, J..1995. Residues in honey of oxytetracycline and tylosin used for the control of American Foulbrood disease in Slovakia. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe. Rok.XXXIX, 1:113-120*.
103. Wadley, F. M. 1967. *Experimental Statistics in Entomology*. Graduate School Press. USDA Washington DC.
104. White, G. F. 1907. The cause of American Foulbrood. U.S. Department of Agricultural, Bureau of Entomology, Circular 94.
105. White, G. F. 1920. American Foulbrood. U. S. Department of Agricultural, Bulletin N° 809.
106. Wilson, WT; Elliot, JR & Hitchcock, JD. 1971. Low recurrence of American foulbrood in honey-bee colonies previously treated with drugs. *American Bee Journal 111: 430-431*.
107. Winston, M.L. 1987. *The biology of honey bee*. Harvard University Press, Cambridge, MA.

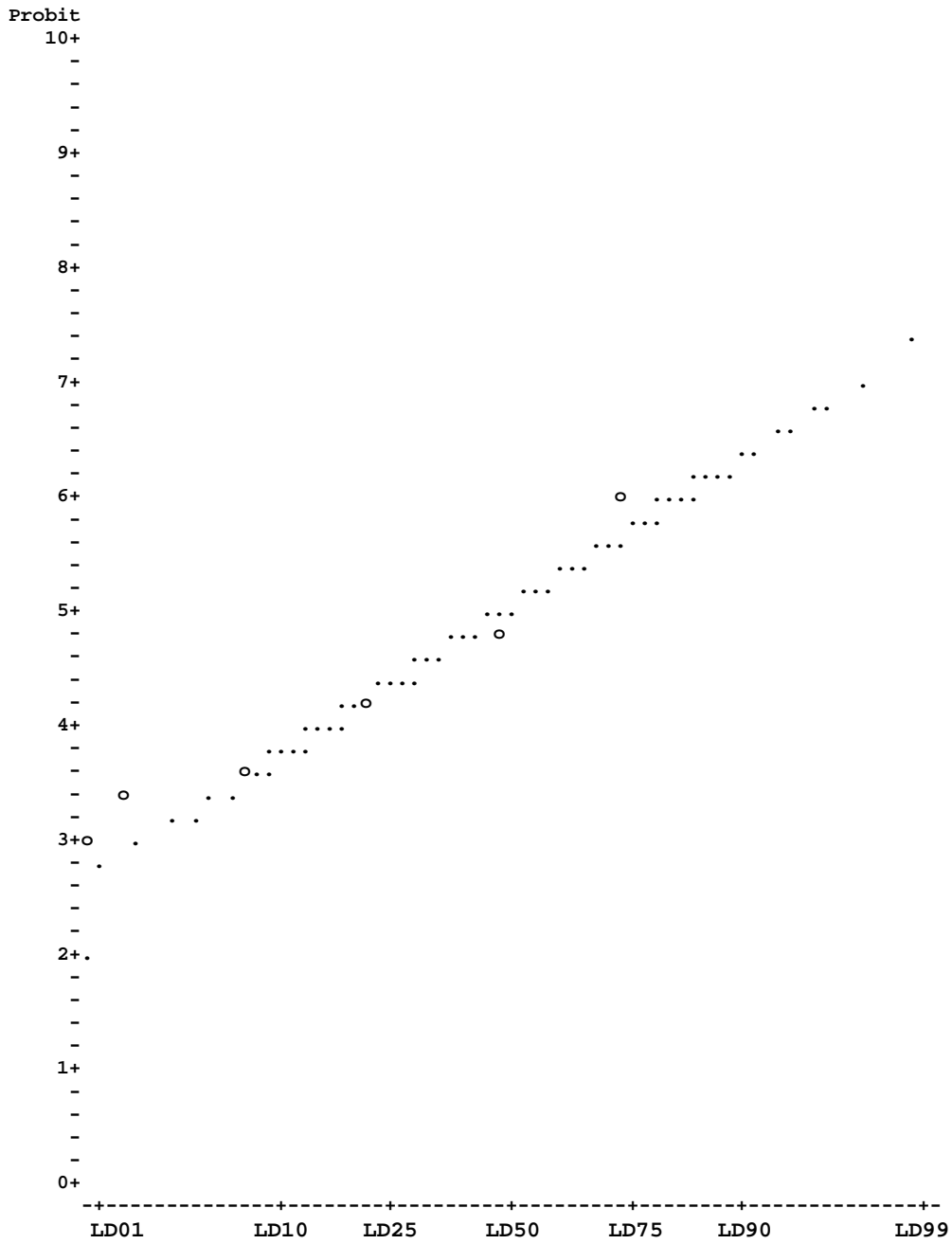
Bibliografía citada.

- 108.** Woodrow, A.W. 1941. Behavior of honeybees towards brood infected with American Foulbrood. *American Bee Journal* 81:363-366.
- 109.** Woodrow, A.W. 1942. Susceptibility of honeybee larvae to individual inoculations with spores of *Bacillus larvae*. *Journal of Economic Entomology* 35: 892-895.
- 110.** Zar, J. H., 1998. Biostatistical Analysis; Prentice Hall.

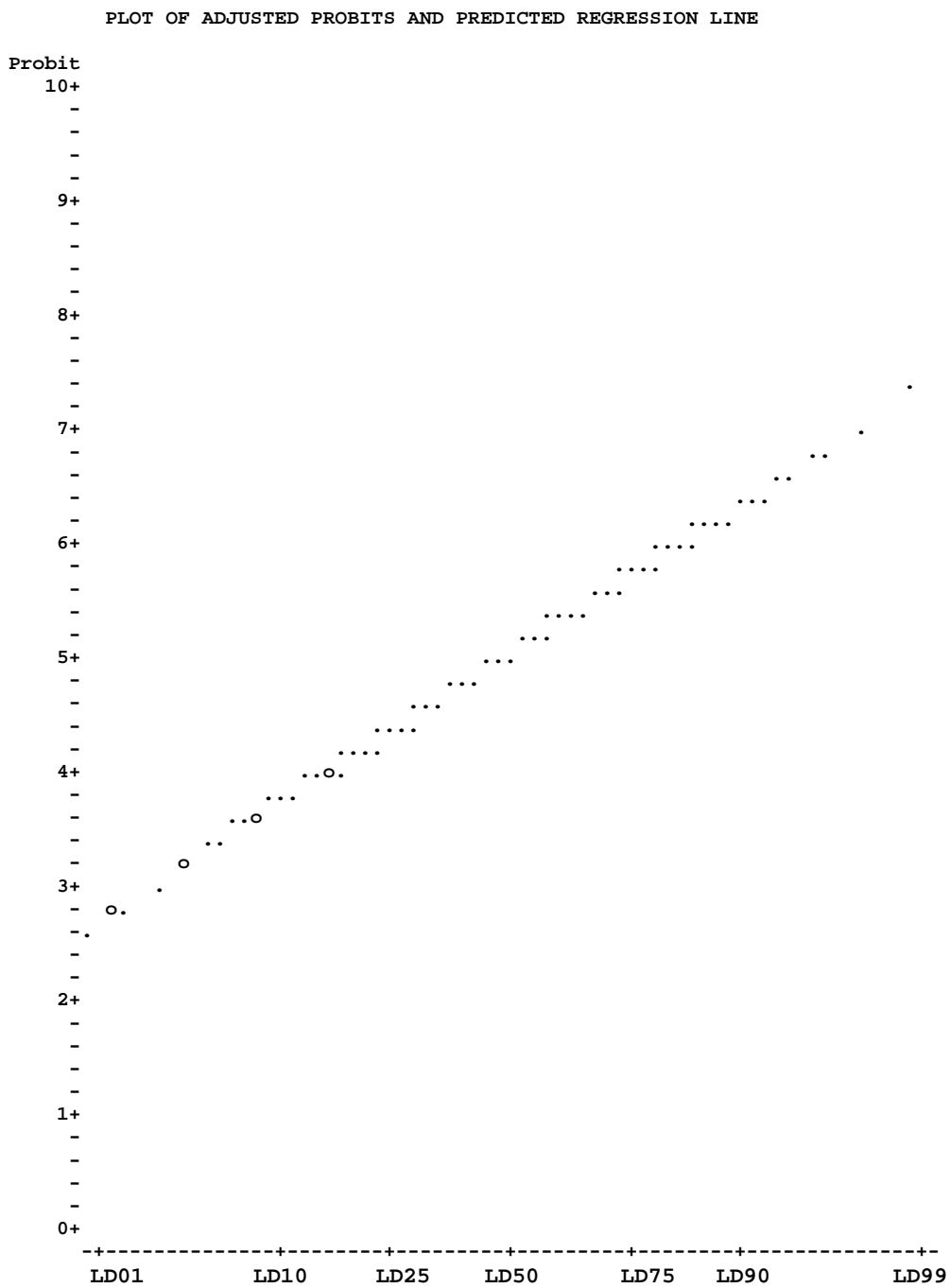
Anexos de gráficos LD₅₀

Cálculo de LD_{50} para Dimetoato 24 hs

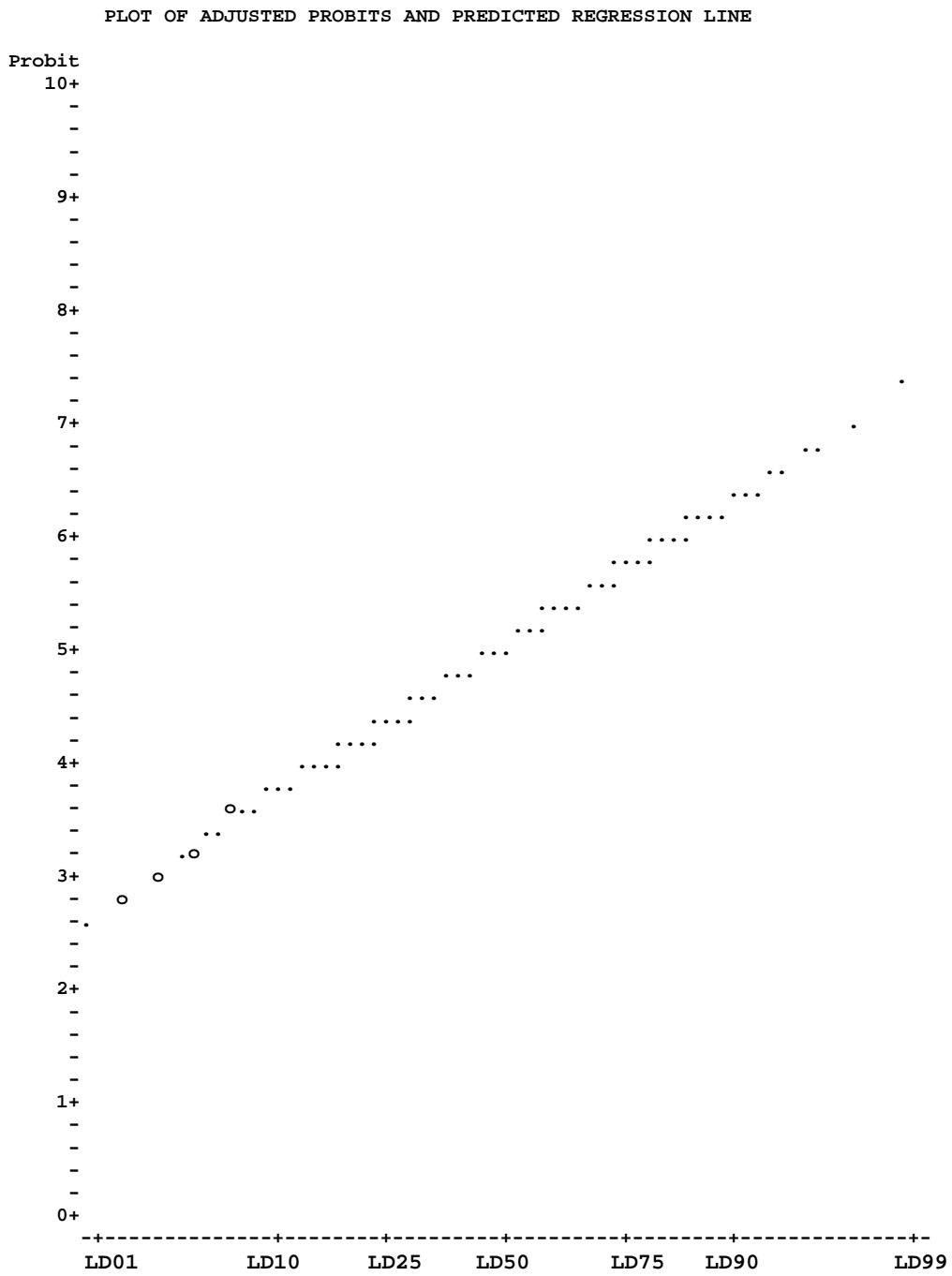
PLOT OF ADJUSTED PROBITS AND PREDICTED REGRESSION LINE



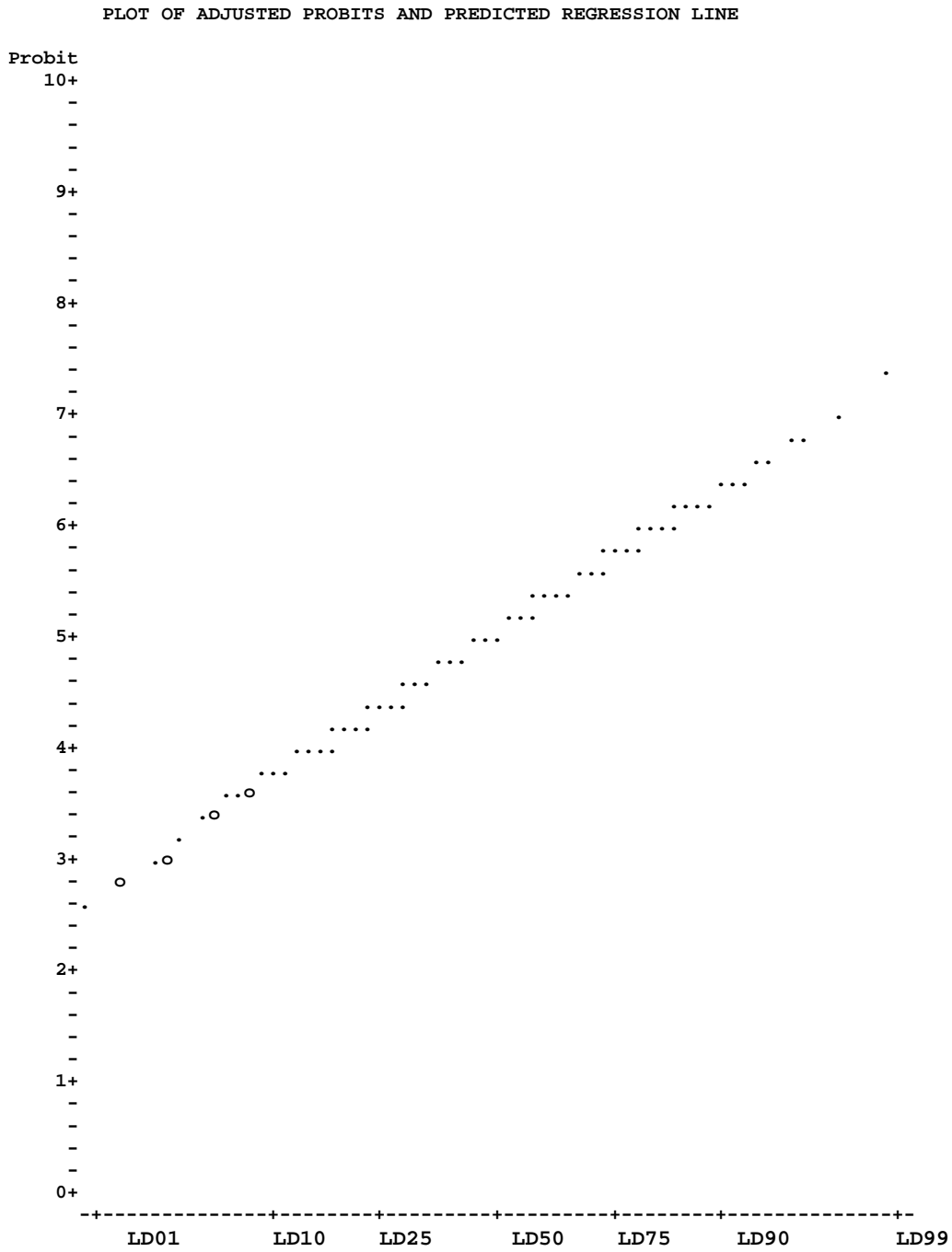
Cálculo de LD_{50} para Oxitetraciclina 24 hs



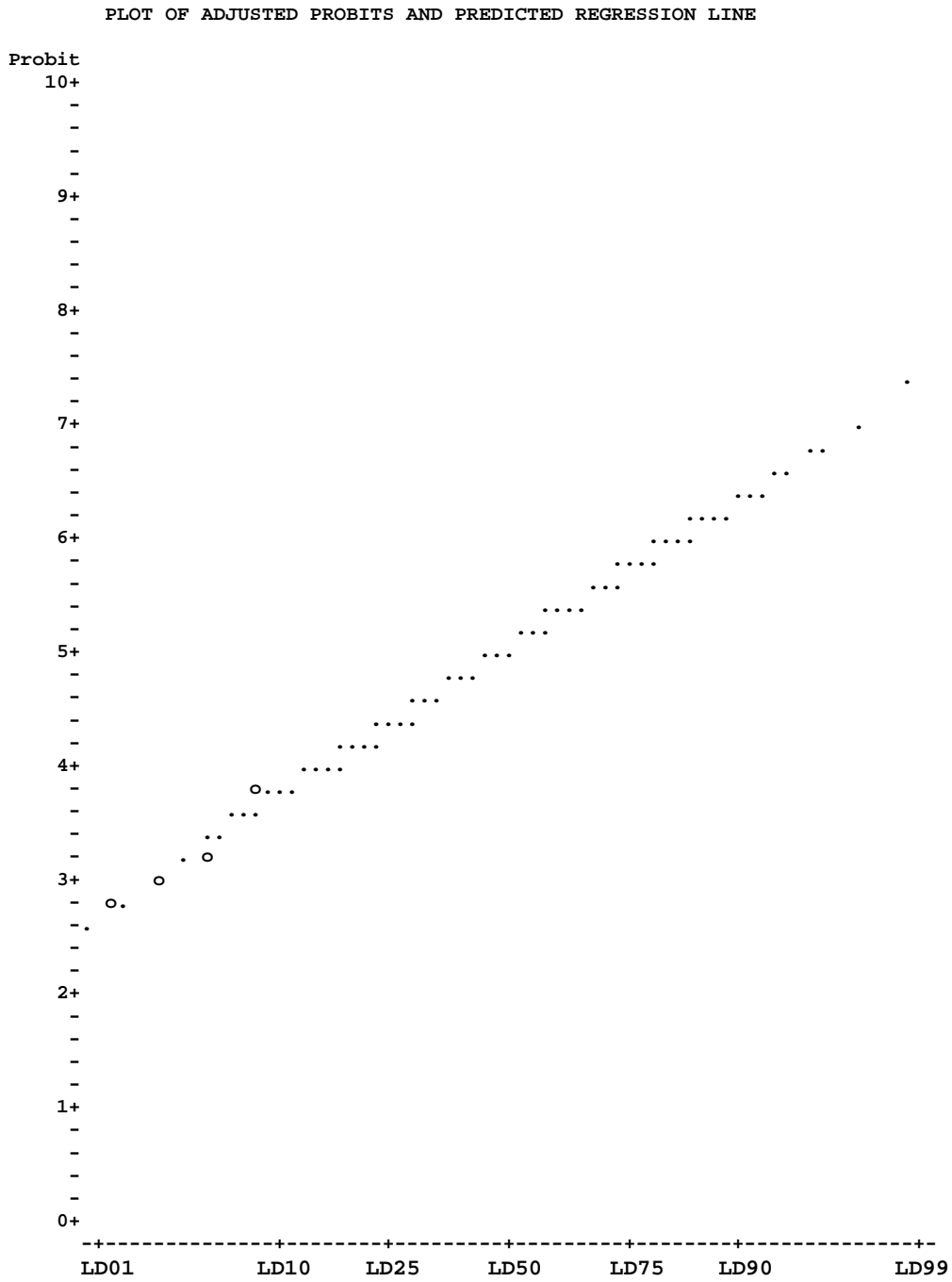
Cálculo de LD_{50} para Lincomicina 24 hs



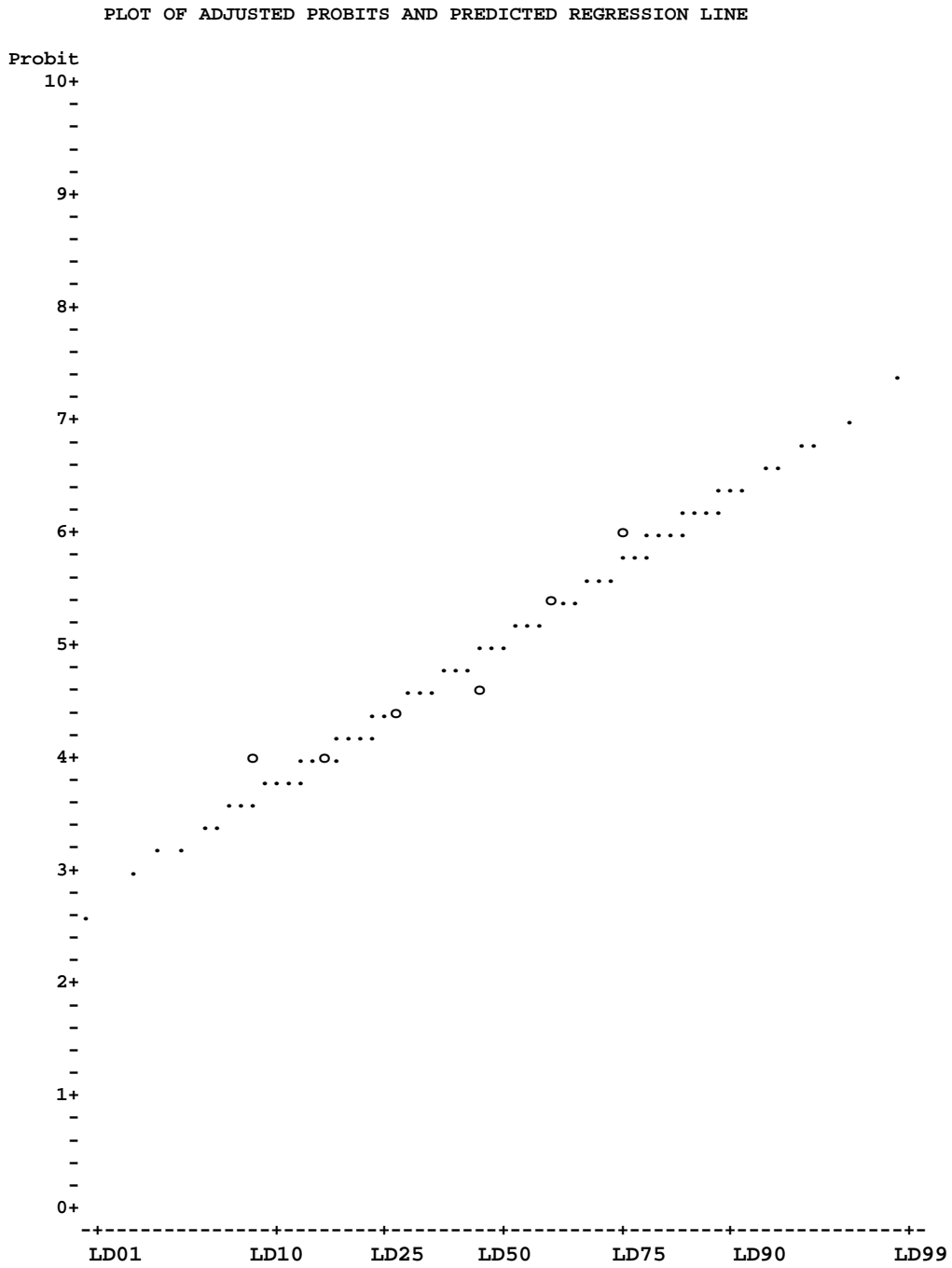
Cálculo de LD_{50} para Tilosina 24 hs



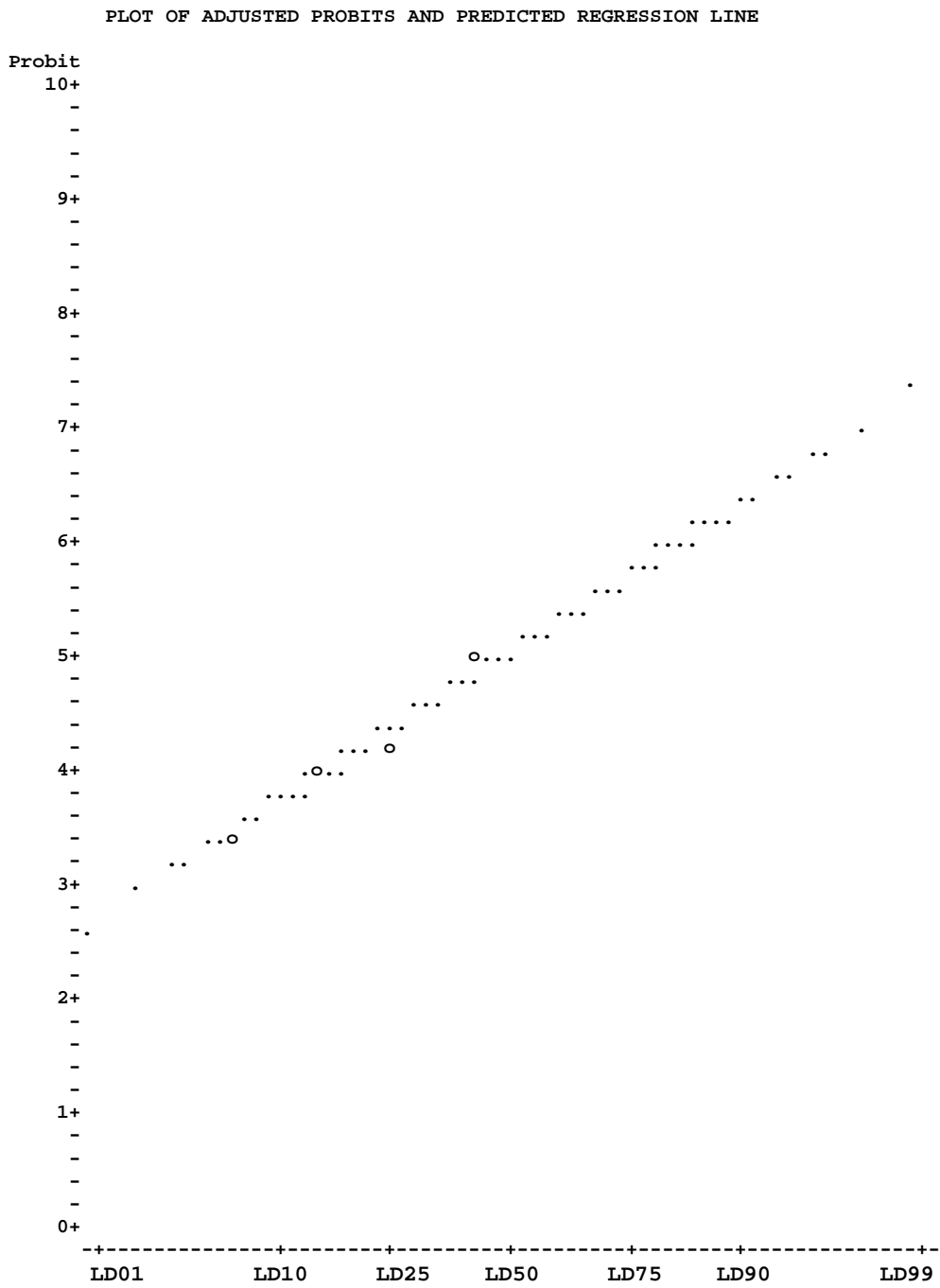
Cálculo de LD_{50} para Tilmicosina 24 hs



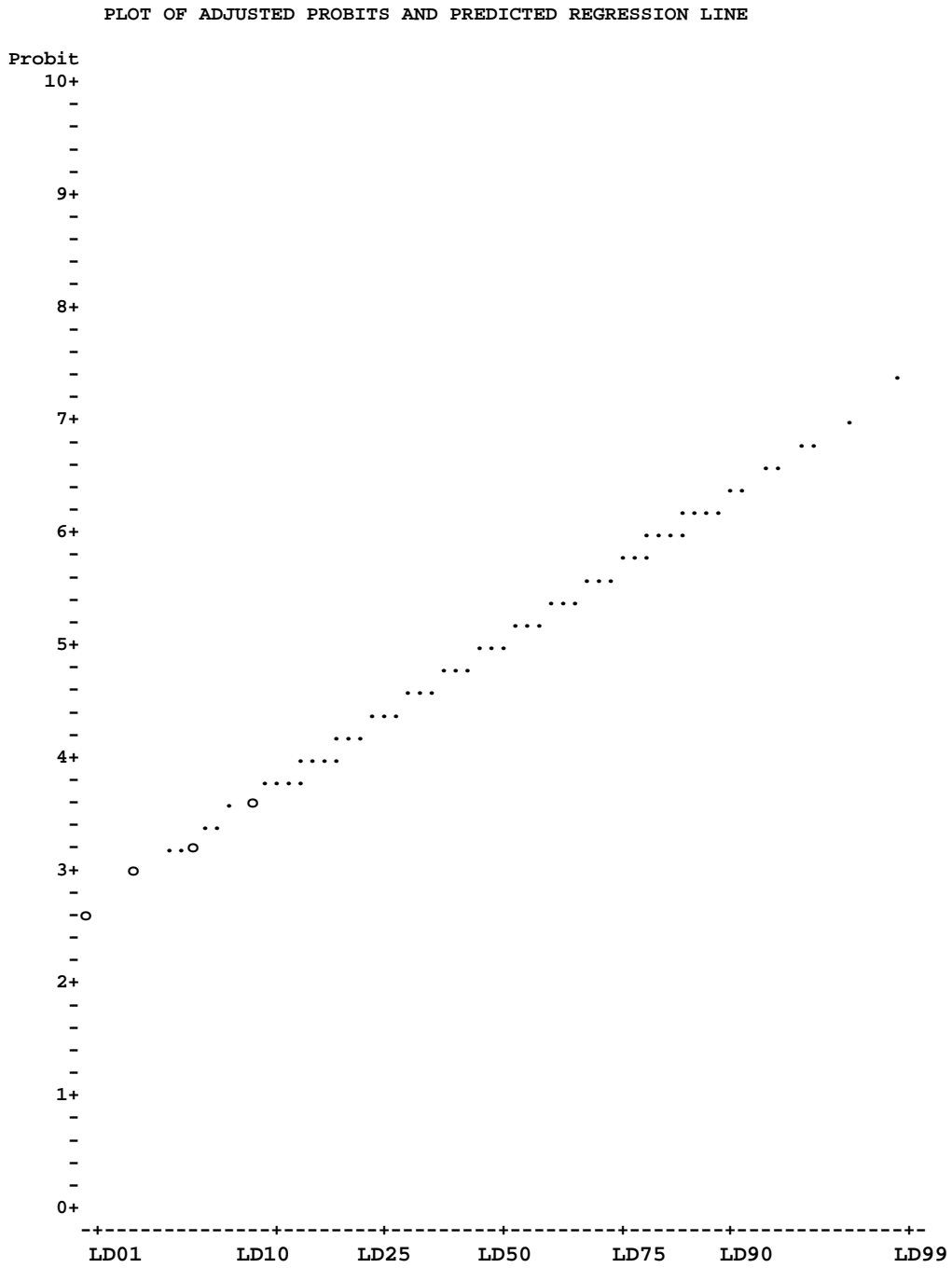
Cálculo de LD_{50} para Dimetoato 48 hs



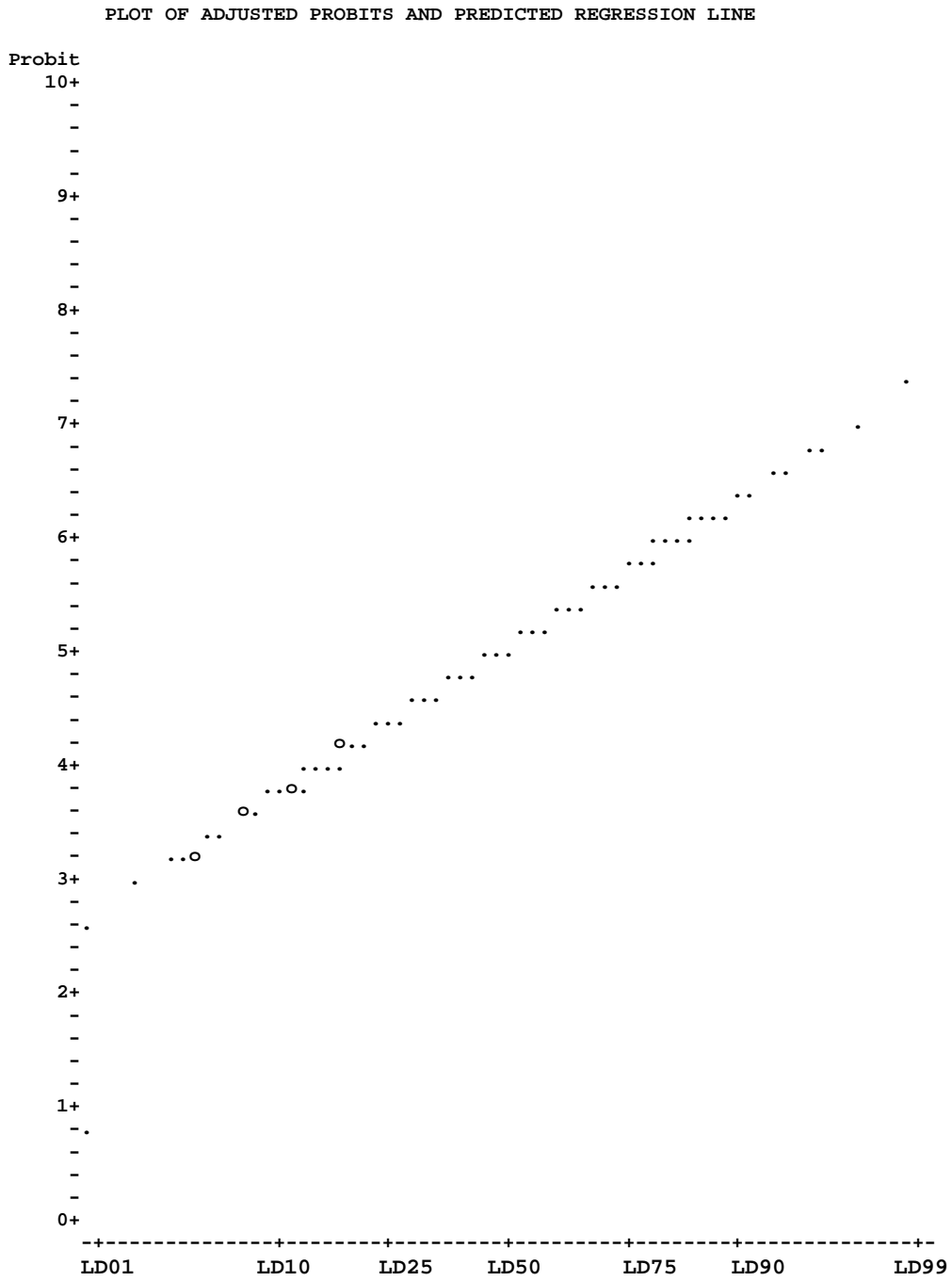
Cálculo de LD_{50} para Oxitetraciclina 48 hs



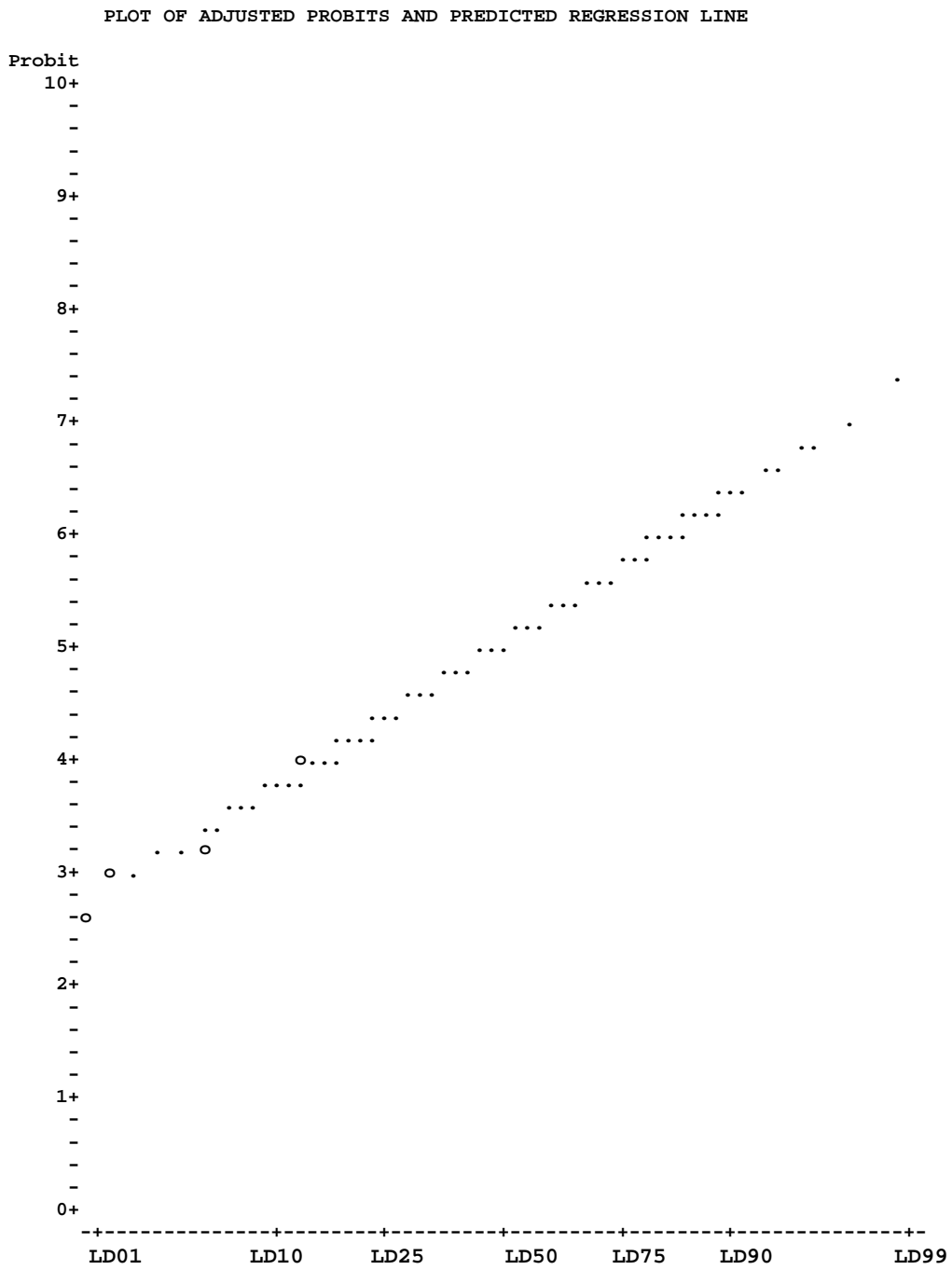
Cálculo de LD_{50} para Lincomicina 48 hs



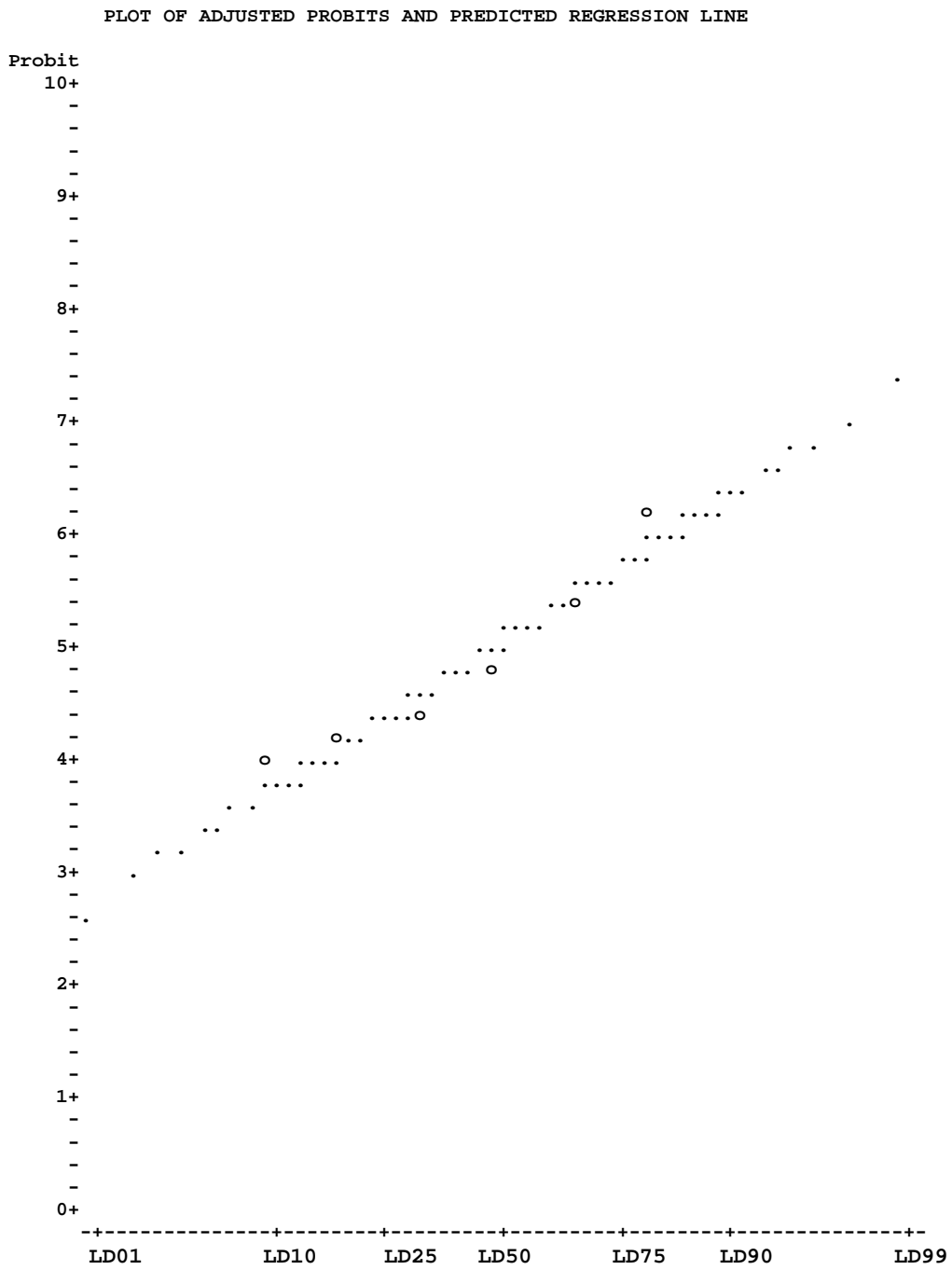
Cálculo de LD_{50} para Tilosina 48 hs



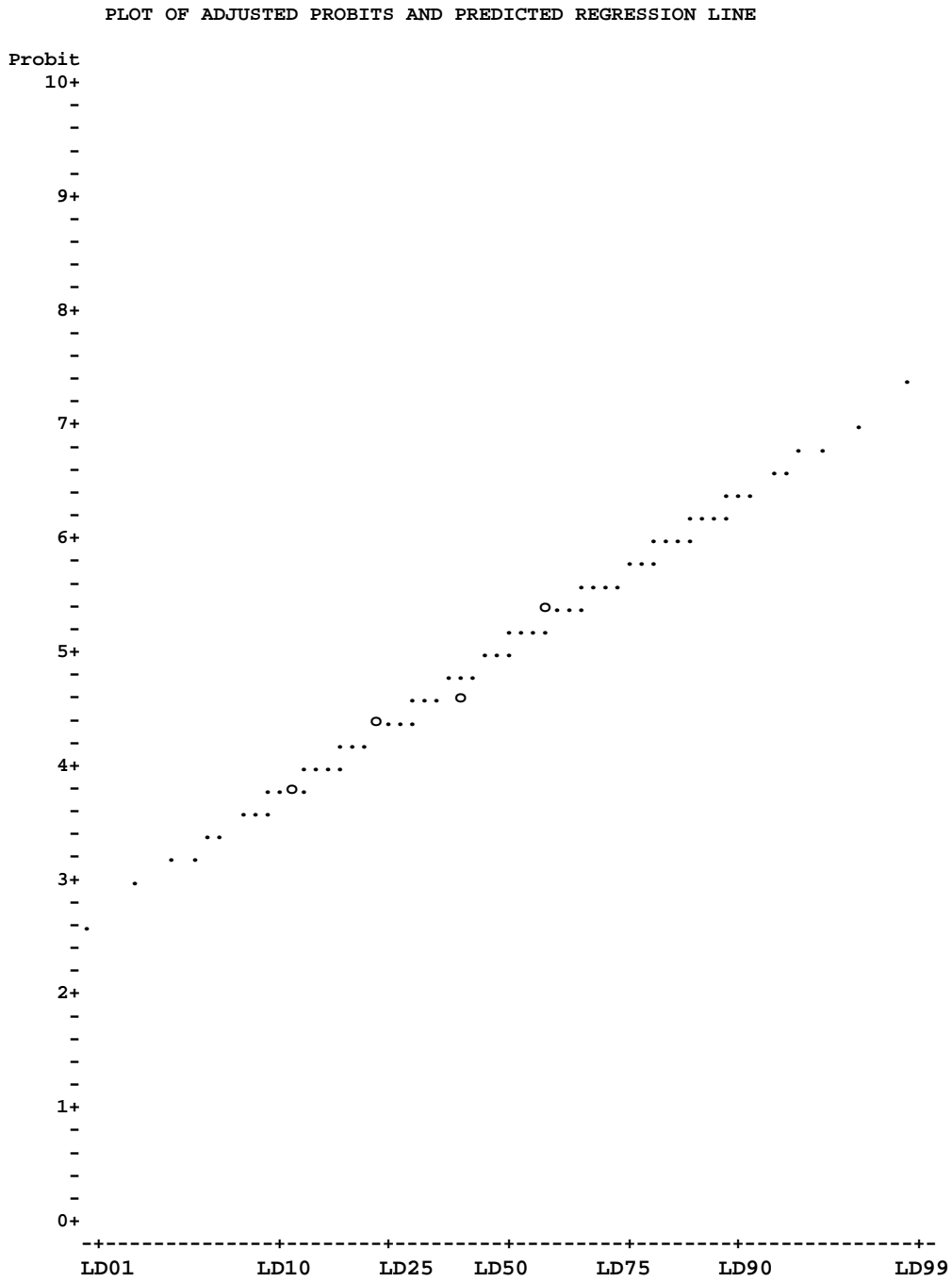
Cálculo de LD_{50} para Tilmicosina 48 hs



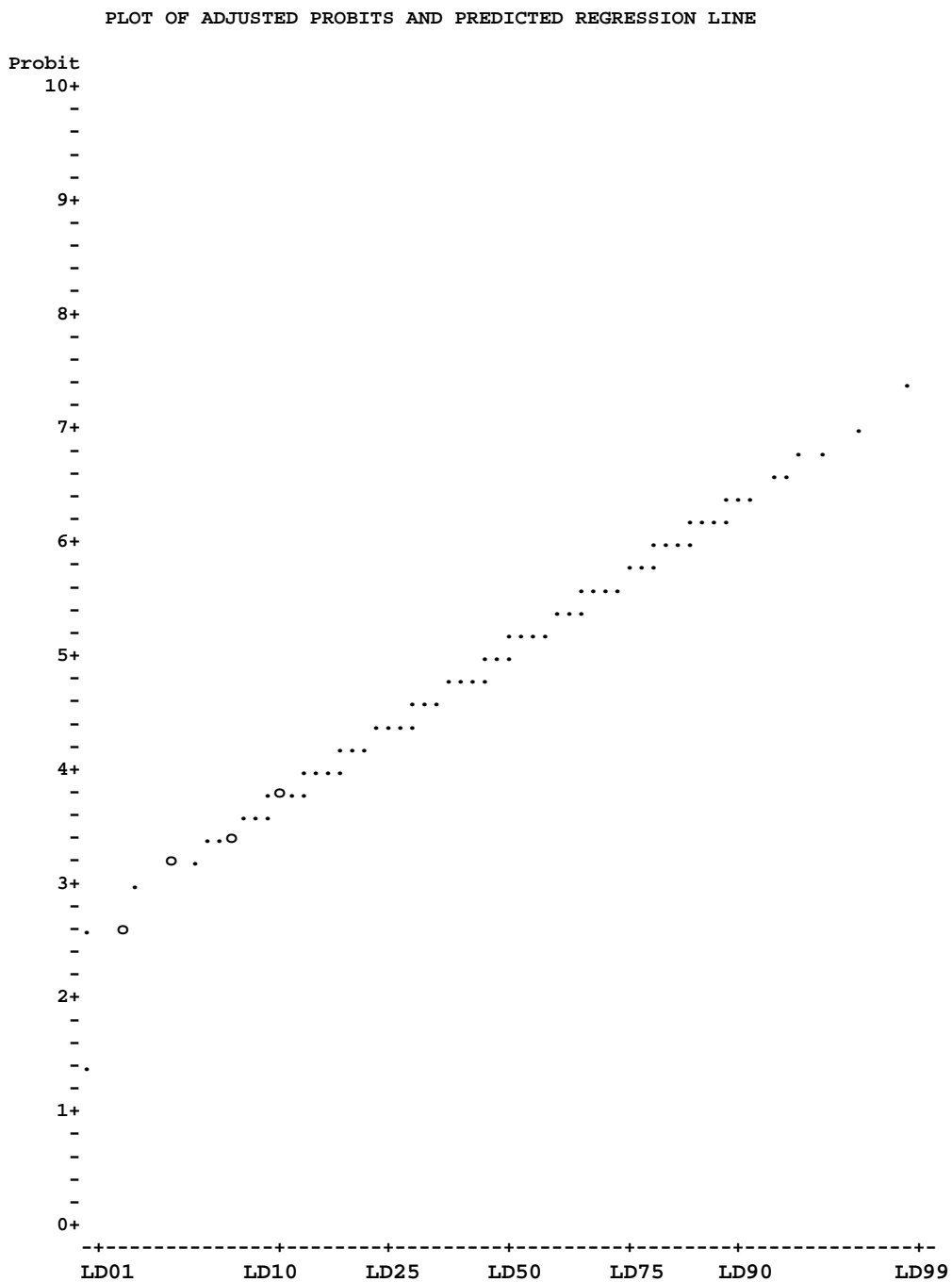
Cálculo de LD_{50} para Dimetoato 72 hs



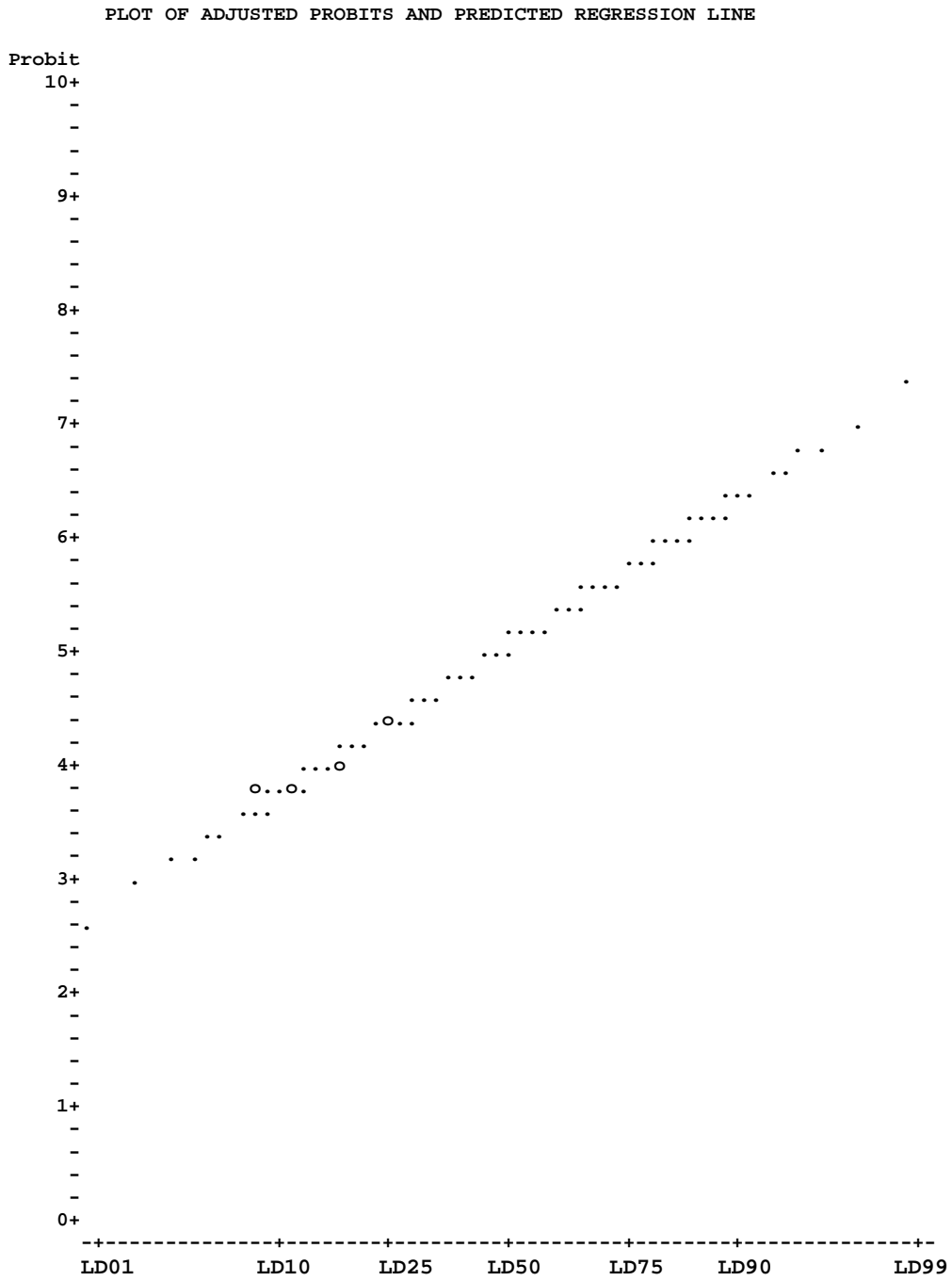
Cálculo de LD_{50} para Oxitetraciclina 72 hs



Cálculo de LD_{50} para Lincomicina 72 hs



Cálculo de LD_{50} para Tilosina 72 hs



Cálculo de LD_{50} para Tilmicosina 72 hs

