

# Unión de los antibióticos tilosina, tilmicosina y oxitetraciclina a proteínas presentes en abejas, larvas y productos de la colmena de *Apis mellifera* L.

F. J. REYNALDI<sup>1,2\*</sup>, J. LACUNZA<sup>3,4</sup>, A. M. ALIPPI<sup>2,4</sup>, R. RULE<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>CCT Conicet La Plata, <sup>2</sup>CIDEFI, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, calle 60 y 119 s/n; <sup>3</sup>Cátedra de Farmacología Aplicada, Facultad de Ciencias Médicas, calle 60 y 120 s/n; Universidad Nacional de La Plata, <sup>4</sup>CIC-PBA calle 526 y 10, La Plata, Prov. Buenos Aires, Argentina.

\*Correspondencia. E-mail: freynaldi@yahoo.com

## RESUMEN

Las abejas melíferas son afectadas por gran cantidad de enfermedades infecciosas principalmente producidas por bacterias, hongos, virus y parásitos eucariotas. Dentro de las ocasionadas por procariotas, la loque americana es una enfermedad extremadamente grave que afecta a larvas y pupas de abejas; su agente causal es la bacteria esporulada *Paenibacillus larvae*. La administración de antibióticos es la principal alternativa para el control de esta enfermedad en colmenares con altos niveles de infección. El objetivo del presente trabajo fue determinar, mediante un método biológico, la unión de los antibióticos tilosina, tilmicosina y oxitetraciclina a las proteínas presentes en abejas adultas, larvas menores de 72 horas, larvas mayores de 72 horas, jalea de obreras, miel y polen, con la finalidad de diseñar un modelo de ruta cinética de los antibióticos. Los límites de sensibilidad de la técnica de valoración de estos antibióticos fueron 0,05 µg/ml para tilosina y tilmicosina, y 0,01 µg/ml para oxitetraciclina. Los coeficientes de correlación fueron superiores a 0,90 y los coeficientes de variación intra e inter-ensayo inferiores al 5%. Tanto tilosina como oxitetraciclina presentaron un porcentaje de unión a proteínas de un 15% en promedio en tejidos y subproductos de la colmena, lo cual resultó inferior a lo observado con tilmicosina (29% en promedio). En conclusión, por sus características químicas, su actividad antimicrobiana y su baja tasa de unión a las abejas, larvas y subproductos de la colmena, la tilosina presenta propiedades farmacocinéticas que podrían representar una ventaja terapéutica para el tratamiento de la loque americana en colmenas.

**Palabras clave:** unión a proteínas, método biológico, abejas, larvas, miel, jalea de obreras

## ABSTRACT

**Binding of tylosin, tilmicosin and oxytetracycline to proteins from honeybees, larvae and beehive products.** American Foulbrood (AFB) caused by the spore-forming bacterium *Paenibacillus larvae* is the most serious disease of bacterial origin affecting larvae and pupae of honeybees. Antibiotics are used in many countries for the control of AFB in high incidence areas, but their misuse may lead to antibiotic resistance of bacterial strains and honey contamination. The objective of the present work was to determine, through a biological method, the protein binding of tylosin, tilmicosin and oxytetracycline to worker jelly; honey; pollen; adult bees and larvae in order to propose their kinetic routes. The sensitivity limit of the technique used was 0.05 µg/ml for tylosin and tilmicosin and 0.01 µg/ml for oxytetracycline, respectively. The method had intra and inter-assay correlation coefficients over 0.90, respectively and a coefficient variation of intra-and inter-assay for all antibiotics and processed samples under 5%. Tylosin and oxytetracycline presented lower percentages of protein binding in tissues and hive products (average 15%) in relation to those observed for tilmicosin (29%). In conclusion, tylosin is useful for AFB control in honey bee colonies due to its chemical characteristics, antimicrobial activity and levels of protein binding in bees, larvae, and beehive products.

**Key words:** protein binding, biological method, bees, larvae, honey, worker jelly

## INTRODUCCIÓN

Las abejas (*Apis mellifera* L.) son afectadas por enfermedades infecciosas producidas por virus, bacterias, hongos y parásitos eucariotas, los que ocasionan reducción en la población de las colmenas (9). La loque americana es una enfermedad bacteriana grave que afecta a larvas y pupas de abejas y que ocasiona importantes pérdidas económicas (21). Su agente etiológico es *Paenibacillus*

*larvae*, una bacteria gram positiva con capacidad de formar esporas que permanecen infectivas y viables durante largos períodos (12).

En la mayoría de los países desarrollados, la quema de colmenas es la única alternativa para el control de loque americana. El empleo de antibióticos, junto con otras pautas de manejo integrado, se emplea en países como Argentina, Estados Unidos y Canadá para el control de la enfermedad en colmenares con altos niveles de infección,

mientras que en lugares como Nueva Zelanda o en los países de la Unión Europea el uso de antibióticos está totalmente restringido (11).

La oxitetraciclina fue durante años el único antibiótico aprobado para su uso en colmenas; su empleo en forma indiscriminada ha favorecido la aparición de cepas bacterianas resistentes (3, 5, 10). Recientemente se aprobó el uso de tartrato de tilosina para su empleo en colmenas afectadas de loque americana en Argentina, Estados Unidos y Canadá; al mismo tiempo, se continúan estudiando otros antibióticos efectivos contra *P. larvae*, como la tilmicosina y la lincomicina (15, 21).

Hasta el presente, las dosis de antibióticos empleadas para el control de la enfermedad se han calculado sobre la base de parámetros de sensibilidad *in vitro* y de los resultados obtenidos en las prácticas experimentales a campo (1, 2, 20), pero las prácticas empíricas de utilización de fármacos podrían llevar al empleo de dosis incorrectas, con riesgos potenciales de toxicidad en abejas, de selección de cepas bacterianas resistentes y de pasaje de antibióticos a la miel y la jalea real.

No existe en la actualidad información que considere en forma integrada la farmacocinética de los antibióticos, la sensibilidad *in vitro* de los microorganismos y la ecología de la microbiota bacteriana causante de enfermedades de las abejas melíferas.

El porcentaje de unión a proteínas de un fármaco depende de su concentración y de su constante de disociación, así como de la concentración de proteínas presentes en los tejidos, los fluidos orgánicos y los subproductos de la colmena (6). La hipotética ruta cinética que tendría que recorrer un fármaco para estar activo en el sitio de acción (larvas menores de 72 horas) comenzaría en el alimento de las abejas nodrizas, encargadas de cuidar a las larvas y producir su alimento. Las nodrizas se alimentan básicamente de miel y polen; éstos son digeridos en el intestino medio y sus nutrientes, por un proceso de absorción, pasan a la hemolinfa y luego a las glándulas hipofaríngeas encargadas de producir la jalea de obreras (18, 19). Esta jalea es luego suministrada a las larvas menores de 72 horas, las cuales constituyen el sitio de localización de la infección (23) y el lugar en donde va a actuar el fármaco (biofase). Habida cuenta del recorrido hipotético del fármaco para llegar al sitio de acción, se propuso como objetivo de este trabajo determinar la unión a proteínas de los antibióticos tilosina, tilmicosina y oxitetraciclina en distintos tejidos y subproductos de la colmena, para establecer potenciales ventajas terapéuticas en el tratamiento de loque americana.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Método biológico

Se puso a punto un método biológico de valoración de concentraciones de tilosina, tilmicosina y oxitetraciclina en abejas adultas, larvas y subproductos de la colmena, utilizando una cepa de *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC 12980). Se

usó la técnica de Herbst con modificaciones (14); brevemente, se emplearon placas de vidrio estériles de 22 cm x 15 cm con 35 ml de agar Müller-Hinton (Britania®) sembrados con esporas de *G. stearothermophilus* (valor 1 en la escala Mc Farland), a una concentración final de 0,5% v/v. Se prepararon soluciones patrones de tilosina (Merck®), tilmicosina (Elanco®) y clorhidrato de oxitetraciclina (Merck®) en solución *buffer* fosfato a pH 7 (PBS), las que se adicionaron a jalea de obreras, miel, polen, abejas adultas y larvas menores y mayores de 72 horas, a las concentraciones de 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 y 10 µg/ml. Se homogeneizaron las muestras (1 g de cada una) en mortero estéril y a continuación se les agregó 1 ml de solución patrón de antibiótico. Las soluciones patrones fueron utilizadas para verificar la exactitud del método. Se seleccionó la concentración final de 10 µg/ml para comparar los halos de inhibición y determinar el porcentaje de unión a proteínas. Las muestras se conservaron a -18 °C hasta su utilización. Posteriormente, sobre las placas con medio de cultivo se realizaron pocillos con sacabocados estéril en 24 posiciones equidistantes entre sí, donde se descargaron 25 µl de los patrones preparados con tejidos, subproductos de la colmena y PBS. Luego de 6 horas de incubación a 65 °C y 60% ±10% de humedad relativa ambiente se midieron con calibre los halos de inhibición bacteriana y se determinó el coeficiente de correlación y el límite de sensibilidad del método. Todas las muestras fueron procesadas por cuadruplicado por placa y durante 4 días a los efectos de evaluar los coeficientes de variación (CV) intra e inter-ensayo, de acuerdo con la fórmula: CV = desvío estándar / media de concentraciones.

### Cuantificación de la unión a proteínas

Para cuantificar la unión de los antibióticos a las proteínas presentes en los tejidos y subproductos de la colmena se usó una técnica de difusión en agar, donde se compararon las zonas de inhibición bacteriana de las soluciones patrones de cada antibiótico probado frente a los halos de inhibición producidos por los antibióticos preparados en solución acuosa. Habida cuenta de que la difusión de los fármacos en el medio de cultivo (método biológico) depende de la concentración de la fracción libre, y que la fracción del fármaco unida a proteínas tiende a producir halos más pequeños, se calculó el porcentaje de unión a proteínas en tejidos de larvas menores de 72 horas y mayores de 72 horas, en miel, en jalea de obrera y en polen utilizando la siguiente fórmula:  $\{ [\text{halo de inhibición de la muestra (mm)} - \text{halo de inhibición control (mm)}] / [\text{halo de inhibición de muestra (mm)}] \} \times 100$  (6).

### Cuantificación de proteínas

La cuantificación de las proteínas en los tejidos de larvas de abejas menores y mayores de 72 horas de vida, en la miel y en la jalea de obreras (1 gramo de muestra) se realizó por triplicado utilizando el método de Bradford (4). Para las muestras de polen, cuya composición es principalmente proteica, se realizó una dilución 1/10 de acuerdo con el método de Lowry (17) y luego se cuantificó por el método de Bradford. La concentración proteica de todas las muestras se midió por espectrofotometría empleando un espectrofotómetro SmartSpec 3000 (BIO-RAD, Hercules, EE.UU.).

### Análisis cuantitativo de la miel y el polen

Con la finalidad de conocer la composición polínica de la miel y el polen empleados en este ensayo, se realizó un análisis cualitativo según el método de microscopía de Louveaux y colaboradores (16).

## RESULTADOS

El método biológico presentó un límite de sensibilidad de 0,05 µg/ml para tilmicosina y tilosina y de 0,01 µg/ml

**Tabla 1.** Contenido de proteínas en tejidos de larvas (menores y mayores de 72 h) y abejas adultas, en jalea de obreras, en miel y en polen. Los datos fueron obtenidos mediante el método de Bradford (con excepción del polen, donde se usó el método de Lowry) y corresponden al valor promedio de 3 repeticiones  $\pm$  la desviación estándar.

	Muestras de tejidos y subproductos de la colmena					
	Larvas menores de 72 h	Larvas mayores de 72 h	Abejas adultas	Jalea de obreras	Miel	Polen
Proteínas (mg/g)	21.2 $\pm$ 2,63	17.9 $\pm$ 1,89	35.8 $\pm$ 2,68	71.0 $\pm$ 5,02	23.0 $\pm$ 1,98	224.0 $\pm$ 16,89

para oxitetraciclina. Los coeficientes de correlación (medias) fueron 0,94 para tilosina; 0,90 para tilmicosina y 0,91 para oxitetraciclina, en tanto que los coeficientes de variación intra e inter-ensayo para todos los antibióticos estuvieron por debajo del 5%. Los resultados de sensibilidad, los valores de coeficientes de correlación y los valores de las variaciones intra e inter-ensayo obtenidos demostraron la confiabilidad del método.

Las concentraciones de proteínas determinadas fueron las siguientes: larvas menores de 72 h, 21,2 mg/g  $\pm$  2,63; larvas mayores de 72 h, 17,9 mg/g  $\pm$  1,89; abejas adultas, 35,8 mg/g  $\pm$  2,68; jalea de obreras, 71,0 mg/g  $\pm$  5,02; miel, 23,0 mg/g  $\pm$  1,98; polen, 224,4 mg/g  $\pm$  16,89.

Los valores de unión a proteínas de los antibióticos tilosina, tilmicosina y oxitetraciclina obtenidos en larvas menores (LCh) y mayores (LG) de 72 horas, en abeja adulta (AA), en miel, en polen y en jalea de obreras (JO) se muestran en la Figura 1. Los valores promedio de unión a proteínas en las abejas adultas, las larvas

y los subproductos de la colmena fueron inferiores con los antibióticos tilosina y oxitetraciclina (15%) con respecto a los obtenidos con tilmicosina (29%) ( $p = 2,62 \times 10^{-5}$ ).

El análisis melisopalínológico de la miel dio como resultado una miel monofloral de *Lotus* spp. L. (56,5%), correspondiente principalmente a la especie *Lotus glaber* Mill., con presencia de polen de la familia *Myrtaceae* (*Eucalyptus* spp. L'Hér) (19,6%) y de la familia *Urticaceae* (14,6%).

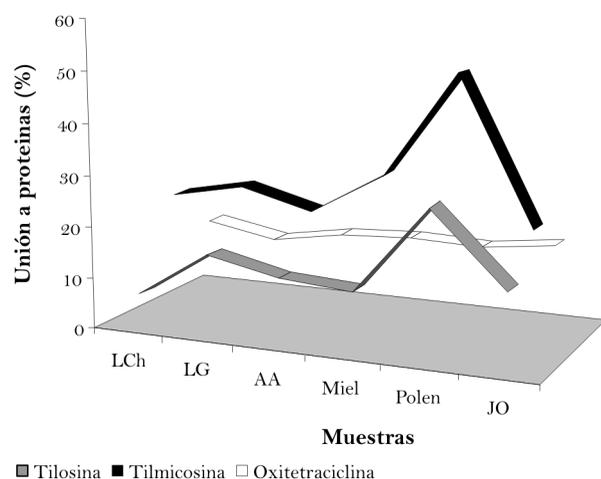
La muestra de polen estuvo compuesta por 75% de ligustro (*Ligustrum sinense* Lour.), un 15% de diente de león (*Taraxacum officinale* Wigg.) y un 10% de aporte de lotus (*Lotus* spp. L.) y cardo (*Cynara cardunculus* L.).

## DISCUSIÓN

La eficacia y toxicidad de los fármacos está en función de las concentraciones libres de medicamento. Las uniones de los antibióticos a las proteínas son reversibles, y en la medida que disminuye el fármaco libre por el pasaje a los tejidos o su eliminación, más fármaco se libera de las proteínas (13).

El pH de la jalea de obrera (alimento de las larvas chicas) es ácido; por lo tanto, los fármacos básicos como la tilosina y la tilmicosina tienden a permanecer en forma disociada (ionizada e hidrosoluble). Luego, cuando dichos antibióticos ingresan en el tubo digestivo de las larvas, la característica química del sitio (pH 6,5, tendiente a la neutralidad) permite que permanezcan en formas no disociadas (liposolubles), lo que facilita el pasaje a través de membranas y provoca la distribución sistémica.

La tilmicosina y la tilosina son antibióticos que poseen actividad tanto *in vivo* como *in vitro* contra microorganismos gram positivos como *P. larvae* (2, 21). Sin embargo, el hecho de que el porcentaje de tilmicosina (29%) unido a proteínas sea el más alto de los estudiados, incluso en jalea de obreras, genera la necesidad en futuros trabajos de cuantificar sus concentraciones en larvas para optimizar y racionalizar las dosis terapéuticas. Además, teniendo en cuenta las características tiempo-dependientes de estos



**Figura 1.** Valores de unión a proteínas de los antibióticos tilosina, tilmicosina y oxitetraciclina en larvas menores (LCh) y mayores (LG) de 72 h, en abeja adulta (AA), en miel, en polen y en jalea de obreras (JO); (n = 3).

macrólidos, se deberá garantizar que las cantidades de fármacos en el sitio de acción permanezcan por encima de la CIM durante un tiempo prolongado (13).

Con respecto al contenido proteico de las muestras de polen, éste difiere entre un 2,5% y un 61% de acuerdo con la especie floral, y permanece altamente conservado dentro de los géneros, familias y especies botánicas. Por ejemplo, en el caso de las leguminosas, el contenido proteico del polen es más alto que en otras especies, razón por la cual los mayores porcentajes de proteína presente en la miel que se empleó en este trabajo pueden deberse a que contenía polen de *Lotus* spp. en alta proporción.

El uso racional de antibióticos para tratar enfermedades infecciosas de origen bacteriano en las colmenas debe considerar los aspectos farmacocinéticos; ello permitirá conseguir resultados terapéuticos y evitará la selección de cepas bacterianas resistentes, a la vez que reducirá la posibilidad de que aparezcan residuos activos en la miel y en los subproductos de la colmena (7).

Por otro lado, tanto la oxitetraciclina como la tilosina presentaron un porcentaje bajo de unión a proteínas comparado con la tilmicosina. Esta particularidad junto con sus características fisicoquímicas hacen que ambos antibióticos sean adecuados para su uso en colmenas. No obstante, las características químicas, la sensibilidad bacteriana y el porcentaje bajo de unión a proteínas tanto en la jalea de obreras (14,8%) como en las larvas menores de 72 h (6,48%) transforman a la tilosina en el antibiótico con las mejores características farmacocinéticas para el tratamiento de la loque americana, particularmente en países donde se ha detectado resistencia a oxitetraciclina (3, 5, 10). En forma paralela deberían continuarse los estudios cinéticos para contemplar la posibilidad de un ajuste de dosis, considerando la penetración a tejidos y subproductos de la colmena. De esta forma se evitaría la subdosificación, que conlleva la posibilidad de caer dentro de la ventana de selección de mutantes (8) (intervalo entre la CIM necesaria para impedir el desarrollo de una cepa y la menor concentración de antimicrobiano que impide el desarrollo de mutantes) y también la sobredosificación, vinculada con posibles efectos tóxicos o residuales en la miel.

En conclusión, debido a sus características químicas, su actividad antimicrobiana y su baja tasa de unión a proteínas de diversos tejidos y subproductos de la colmena, la tilosina constituye una alternativa terapéutica para el control de la loque americana debido a sus ventajas cinéticas. Sin embargo, sería conveniente seguir realizando estudios farmacocinéticos, de sensibilidad y de determinación de ventana de selección de mutantes para calcular las dosis y los momentos óptimos de administración a fin de utilizar más racionalmente dicho antibiótico.

**Agradecimientos** FJR es investigador del CONICET, RR y AMA son investigadores de la CIC (Prov. Bs. As.) y JL es becario

de perfeccionamiento de la CIC. Esta investigación fue parcialmente subsidiada por la CIC y la ANPCyT, Argentina.

## REFERENCIAS

- Alippi AM, Albo GN, Leniz D, Rivera I, Zanelli ML, Roca AE. Comparative study of tylosin, erythromycin and oxytetracycline to control American Foulbrood of honeybees. *J Apic Res* 1999; 38: 149-58.
- Alippi AM, Albo GN, Reynaldi FJ, De Giusti MR. *In vitro* and *in vivo* susceptibility of the honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* to the antibiotic tylosin. *Vet Microbiol* 2005; 109: 47-55.
- Alippi AM, López AC, Reynaldi FJ, Grasso DH, Aguilar AO. Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood (AFB) disease in honeybees. *Vet Microbiol* 2007; 125: 290-303.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- Colter D. Antibiotic resistant American Foulbrood. *Alberta bee news* 2000; February 4.
- Craig WA, Suh B. Protein binding and the antimicrobial effect: methods for the determination of protein binding. En: Lorian V, editor. *Antibiotics in laboratory medicine (second edition)*. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins, 1986, p. 477-514.
- Dieguez S, Soraci A, Bedascarrasbure E, Libonatti C. Metodología analítica para la detección de residuos de oxitetraciclina en miel. *RIA* 2004; 31: 159-66.
- Drilca K. The mutant selection window and antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemoth* 2003; 52: 11-7.
- Ellis JD, Munn PA. The worldwide health status of honey bees. *Bee World* 2005; 86: 88-101.
- Evans JD. Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *J Invert Pathol* 2003; 83: 46-50.
- Foram H. Report on the American Foulbrood National Pest Management Strategy. MAF Biosecurity New Zealand Discussion Paper No: 2008/07. 2008. <http://www.biosecurity.govt.nz/files/biosecconsult/afnpm-strategy-report.pdf> (10/06/2010).
- Genersch E, Forsgren E, Pentikäinen J, Ashiraliev A, Rauch S, Kilwinski J, et al. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvificiens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Inter J Syst Evol Microbiol* 2006; 56: 501-11.
- Hardman JG, Limbrad LE, Chambers HF. Antimicrobianos. Inhibidores de la Síntesis de Proteínas y otros Antimicrobianos. En: Alfred Goodman Gilman, editor. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Mexico D.F., Mc Graw-Hill Interamericana Press, 2001, p. 1257-88.
- Herbst DV. Identification and determination of four  $\beta$ -lactam antibiotics in milk. *J Food Protect* 1982; 45: 450-1.
- Kochansky J, Pettis J. Screening additional antibiotics for efficacy against American Foulbrood. *J Apic Res* 2005; 44: 24-8.
- Louveaux J, Maurizio A, Vorwhol G. *Methods of melisopalinalogy*, *Bee World* 1978; 59: 139-57.
- Lowry OH., Rosebrough NJ, Farr KL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
- Nakajima C, Okayama A, Sakogawa T, Nakamura A, Hayama T. Disposition of ampicillin in honeybees and hives. *J Vet Med Sc* 1997; 59: 765-7.
- Nakajima C, Sakogawa T, Okayama A, Nakamura A, Hayama T. Disposition of mirosamicin in honeybee hives. *J Vet Pharmacol Therap* 1998; 21: 269-73.

20. Pettis JS, Feldlaufer MF. Efficacy of tylosin and lincomycin in controlling american foulbrood in honeybee colonies. *J Apic Res* 2005; 44: 106-8.
21. Reynaldi FJ, Albo AG, Alippi AM. Effectiveness of tilmicosin against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood disease of honeybees. *Vet Microbiol* 2008; 132: 119-28.
22. Spivak M, Reuter GS. Resistance to American Foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* 2001; 32: 555-65.
23. Yue D, Nordhoff M, Wieler LH, Genersch E. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis of the interactions between larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Env Microbiol* 2008; 10: 1612-20.

Recibido: 06/07/2010 – Aceptado: 30/08/2010