



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA GENERAL

“AISLAMIENTO DE CEPAS DE *Paenibacillus larvae* RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS USADOS EN EL TRATAMIENTO DE LOQUE AMERICANA”



Directora: **Finola, Mónica**

Co-Directora: **González, Maria Juliana**

Tesis de grado

GONZÁLEZ NOELIA AYLÉN

Agosto 2011



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO QUÍMICAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA

Tesis de grado para optar al título de MICROBIÓLOGA

Presentado por: GONZÁLEZ, Noelia Ayelén

Directora: Dra.: FINOLA, Mónica

Codirectora: Mic.: GONZÁLEZ, Maria Juliana

Aprobado por el jurado:

Dr.: MARIOLI,
Juan Miguel

Dra.: BETTERA
Susana

Dra.: LASAGNO
Mirta

Dedicado a mis padres: Rosita y Raúl...por confiar en mí y darme la oportunidad de buscar mi destino...

Mamá, no importa cuántas veces me preguntes...gracias por preocuparte y esforzarte en comprender todo lo que hago y me pasa...porque gracias a vos nunca me sentí lejos a pesar de la distancia...porque con tus consejos y tu fe en mí, me ayudaste a mantenerme de pie...

Papá, gracias por transmitirme tu experiencia, por dejarme volar, por respetarme y acompañarme en cada decisión que tomé...porque no hay nadie que me entienda como vos...

GRACIAS POR SER MI FUENTE DE ENERGIA EN LOS MOMENTOS QUE SE ME TERMINA EL COMBUSTIBLE...LOS AMO!!!

Melina, hermana, amiga, casi segunda madre...gracias por dejarme compartir con vos mi entusiasmo por "los bichitos"...porque siempre que te necesite estuviste y vas a seguir estando...TE QUIERO MUCHISIMO!!! y a *Gonza* "el cuña"...gracias por hacerme creer en mi misma...

Nona, porque aun sin entender mucho, a tu forma me hiciste sentir importante y especial. *Nono*, *abuelo* y *abuela*, porque siempre van a estar en mi corazón y son parte de lo que hoy soy...A mis *tios*, *tias*, *primas*, *primos*, *sobrinos segundos*...y a la hermosura de *Santi*, mi ahijada, estar con ellos me hace dar cuenta el verdadero significado de la familia...y lo importante que es tenerlos para llegar a lograr mis objetivos!!!

Nere, "mi reina", mi primer "concubina"...gracias por acompañarme en mis primeros y duros tiempos de la carrera, nada hubiera sido lo mismo sin vos...! *Meli*, "mi princesa", que lindo es saber que no importa lo que pase...siempre vas a estar, gracias por demostrarme que "la locura es el estado más saludable"...LAS QUIERO!!!

MIS ESTRELLITAS: *Lucy*, por bancarme desde el primer día de cursillo y durante estos 5 años incondicionalmente, por tantas horas de estudio juntas...por esas charlas eternas pero súper "fructíferas"...! *Majo*, mi compañera de llantos, risas, grandes esfuerzos y logros juntas... mi compinche de aventuras, gracias por tu lealtad, y gracias por "los mejores mates de los teóricos"...! *Ner*, te transformaste en una personita muy especial para mí...gracias por ser siempre tan sincera, por tu paciencia, y por quererme así de loca como soy...! *Gaby* "Marta"...solo vos entendes muchas cosas de mí...gracias por ser mi confidente y amiga...y un ejemplo de gran persona...! LAS QUIERO CON EL ALMA AMIGAS!!!

Vicky, que hubiera sido de mi vida en Rio Cuarto sin vos "yegua", mil gracias amiga, por cuidarme la pitui cuando viajaba a Neuquén, por tantos momentos de risa y anécdotas, por tanto cariño...! *Aye*, "chiquita", mi tocaya...las mejores salidas...gracias sureña por hacerme sentir que no estoy sola aunque este lejos de mi familia...!

Romi, "C/Q", en un año de tantos cambios, gracias a vos...nuestra casa "la CasaDelPueblo", se transformó en el lugar más lindo...gracias por confiar en mí, por tantas charlas y consejos...! *Silvi A.*, no sabes lo importante que fue para mí poder contar con vos en este último tiempo, gracias por brindarme tu ayuda y enseñarme que con fortaleza se puede llegar tan lejos como uno quiera...!

Silvi G., "la Ghio" ...finalmente descubrí que no solo compartimos la locura por la carrera, sino también por el baile...te quiero! *Juli*, "mi leoncita" ...un orgullo haberte conocido...gracias por todo lo que hiciste por mí, nunca voy a olvidar la gran mano que me diste una vez...y muchas otras...! *Agus*, encontré una más despistada que yo, sos un aparato querible...! *Ceci*, siempre me gusto escucharte y aprender de tu nobleza y autenticidad...! *Vero*, algo siempre nos mantuvo unidas, gracias por confiar en mi...y por compartir lindos momentos!

Mauri, *Chis*, *Emi*, los compañeros de micro...pocos pero buenos...! *Yamil* y *Ale*, gracias por regalarme tantas carcajadas en este último tiempo...son los dos seres más divertidos que conocí...! GRACIAS CHICOS!!!

Mati, gracias por simplificarme tanto las cosas, por enseñarme a disfrutar y valorar mis triunfos, por llenarme de paz y fortaleza...SIMPLEMENTE...."GRACIAS"...

Juliana, mi codirectora y "hermanita", no hay palabras de agradecimiento que alcancen para vos...porque me enseñaste que para ser una buena microbióloga además de un buen desempeño como profesional, se necesita calidad humana...quien mejor que vos para darme el ejemplo...MIL GRACIAS...TE QUIERO!

Mónica, mi directora, gracias por brindarme un lugar para formarme como profesional en el laboratorio, por todo lo que hiciste...y por ser parte del logro de mi título como Microbióloga!

Juan, *Mirta* y *Susana*, mis jurados, gracias por la colaboración brindada para que todo saliera bien.

A la *Universidad Nacional de Rio Cuarto*, por permitirme realizar esta maravillosa carrera que hoy culmino...

...LOS OBSTÁCULOS SON ESAS COSAS QUE LAS PERSONAS VEN CUANDO DEJAN DE MIRAR SUS METAS...

"GRACIAS A TODOS POR AYUDARME A NO PERDER DE VISTA MIS OBJETIVOS"

1-INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Apicultura en la Argentina.....	1
1.2. Miel.....	1
1.3. Abejas melíferas y enfermedades.....	2
1.3.1. Orígenes de la abeja melífera.....	2
1.3.2. Ciclo de vida.....	3
1.3.3. Enfermedades de <i>Apis mellifera</i>	3
1.4. Loque Americana.....	4
1.4.1. Agente causal.....	4
1.4.2. Ciclo infectivo.....	5
1.4.3. Sintomatología.....	7
1.4.4. Difusión de la enfermedad.....	8
1.4.5. Diagnóstico.....	9
1.4.6. Control de Loque Americana.....	10
1.5. Antibióticos.....	12
1.5.1. Tetraciclina.....	14
1.5.2. Macrolidos.....	16
2-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	19
2.1. Hipótesis.....	19
2.2. Objetivos.....	19
2.2.1. Objetivos Generales.....	19
2.2.2. Objetivos Específico.....	19
3-MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1. Materiales.....	20
3.1.1. Medio de cultivo para el aislamiento de <i>P. larvae</i>	20
3.1.2. Reactivos para la identificación de <i>P. larvae</i>	20
3.1.3. Actividad antimicrobiana.....	21
3.1.4. Cepas de <i>P. larvae</i>	22

3.2. Métodos.....	22
3.2.1. Aislamiento.....	22
3.2.2. Identificación.....	23
3.2.3. Mantenimiento y conservación de <i>P. larvae</i>	24
3.2.4. Análisis de la actividad antibacteriana.....	24
3.2.5. Recuperación de cepas de <i>P. larvae</i> resistentes a antibióticos.....	25
4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1. Aislamiento.....	26
4.2. Identificación.....	27
4.2.1. Pruebas confirmatorias.....	27
4.2.2. Caracterización genotípica.....	28
4.3. Mantenimiento.....	28
4.4. Análisis de la actividad antimicrobiana.....	29
4.4.1. Oxitetraciclina.....	29
4.4.2. Tilosina.....	33
4.5. Análisis de cepas resistentes.....	39
4.5.1. Oxitetraciclina.....	39
4.5.2. Tilosina.....	40
5- CONCLUSIONES.....	43
6- BIBLIOGRAFÍA.....	45

Introducción

1.1 Apicultura en la Argentina

La producción mundial de miel es del orden de las 1,4 millones de Tn anuales, de las cuales el 50 % se concentra entre seis países y Argentina representa un 6%, posicionándose en el 4° lugar a nivel mundial, luego de Rusia, China y EE.UU (www.argentinatradenet.gov.ar). La producción por año en nuestro país ronda las 85.000 Tn. de miel y tiende a consolidarse como primer exportador mundial con casi un 25% del total comercializado, siendo EE.UU y Alemania los principales países importadores (www.inta.gov.ar, 2008). Son generalmente países de alto poder adquisitivo y exigentes en materia de calidad, sin embargo, la Argentina cuenta con ventajas competitivas debido a la excelencia en cuanto a características organolépticas y calidad, calificada como "premium", lo cual nos permiten lidiar en los mercados más exigentes (www.made-in-argentina.com). La calidad de nuestras mieles, es debida a las grandes extensiones de pasturas naturales, diversos cultivos agrícolas y la abundante flora autóctona que se encuentran a disposición de la producción apícola (www.agro.uba.ar).

1.2 Miel

La miel es una solución concentrada de azúcares con predominancia de glucosa y fructosa, entre otros hidratos de carbono, enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, minerales, sustancias aromáticas, pigmentos, cera y granos de polen. Es una sustancia producida por las abejas melíferas a partir del néctar de las flores o de las secreciones procedentes de las plantas, que ellas mismas recogen, transforman, combinan con sustancias específicas propias, almacenándola en panales, donde madura hasta completar su formación (Código Alimentario Argentino, 1994).

El término calidad referido a los alimentos, engloba una serie de propiedades organolépticas, en el caso específico de la miel, está determinada por las características sensoriales, físico-químicas y microbiológicas, estos criterios están normatizados por los valores legislados internacionalmente en el Codex Alimentarius (Bogdanov, 1999). En nuestro país, las características de los productos alimentarios aptos para consumo, están regulados a través del Código Alimentario Argentino (Marconi, 1998).

La miel es un producto muy estable desde el punto de vista microbiológico, debido a su baja actividad de agua, que impide el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, a excepción de algunas levaduras y hongos osmófilos u osmotolerantes; y por el pH ácido, debida a la presencia de ácidos orgánicos, que actúan como antimicrobianos (Bogdanov, 1997; Ramirez y col., 2003; Estrada y col., 2005). Además presenta otras sustancias con propiedades

antimicrobianas, como peróxidos de hidrogeno (Estrada y col., 2005), fitoquímicos como flavonoides y ácidos aromáticos, y antioxidantes fenólicos (Cooper y col., 2002; Rodriguez Montoya, 2003, Estrada y col., 2005). Sin embargo, como todo producto de origen natural y al igual que el resto de los alimentos, las mieles de *Apis mellifera*, presentan una flora microbiana propia. Pueden ser vehículo de bacterias del género *Bacillus*, generalmente esporulados, que no presentan acción negativa sobre el producto ni peligro para la salud humana; de hongos como los del género *Penicillium* o *Mucor* y en algunos casos de *Bettsya alvei* u hongo del polen (en forma de esporas) que tampoco ocasionan ningún inconveniente. De levaduras osmófilas o sacarófilas del género *Saccharomyces* que son las responsables de la fermentación cuando las condiciones de humedad lo permiten (Salamanca Grosso y col., 2001).

Existen posibles agentes microbianos contaminantes provenientes del polen, del tracto digestivo de las abejas, del medio ambiente, del néctar, o por mala manipulación y condiciones higiénicas por parte del apicultor. Se han encontrado esporas de *Clostridium botulinum* tipo G que al ser ingerido por bebés y niños pueden pasar a su forma vegetativa en el intestino causando Botulismo infantil, siendo el único alimento reconocido implicado en estos casos (Monetto y col., 1999). Se han detectado otros microorganismo patógenos para el hombre como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* y *Shigella*. Bajo ciertas circunstancias pueden encontrarse en la miel, microorganismos patógenos para abejas como *Melissococcus pluton* agente etiológico de la Loque Europea y esporas de *Paenibacillus larvae* causal de Loque Americana.

1.3 Abejas melíferas y enfermedades

1.3.1. Orígenes de la abeja melífera

Los primeros indicios de abejas sobre la tierra se remontan a 100 millones de años atrás, junto con la aparición de plantas con flor y especialmente adaptadas para la polinización de las abejas. Antes de la conquista, en América existían las meliponas, abejas sin aguijón, bajo el nombre de “abejas americanas o criollas”, luego con la colonización ingresaron desde Europa ejemplares de *Apis mellifera ligustica* o “abejas italianas”. Finalmente se produce la introducción de *Apis mellifera scutelatta* o “abejas africanas asesinas”, provenientes de África, que se cruzaron en forma progresiva con las abejas existentes, adaptándose a los diferentes ambientes y comenzaron a formar verdaderos ecotipos americanos. Por esta razón, las abejas que habitan en Argentina son el resultado de cruzamientos libres a partir de las masivas importaciones de genotipos europeos y del norte africano. (Bedascarrasbure y Palacio, 1998).

1.3.2 Ciclo de vida

Luego de 3 días de la postura de huevo de la reina en las celdas, éstos eclosionan dando origen a las larvas que tienen un tiempo de desarrollo de 3 a 7 días. Durante esta etapa son alimentadas por las abejas obreras y pasan por estadios en los cuales desarrollan su sistema digestivo. Al final se produce la operculación de las celdas y continúan hasta el estadio pupal de 4 a 9 días donde terminan de diferenciarse alcanzando la adultez y emergiendo de la celda (Cabello, 2007) (Figura 1.1).

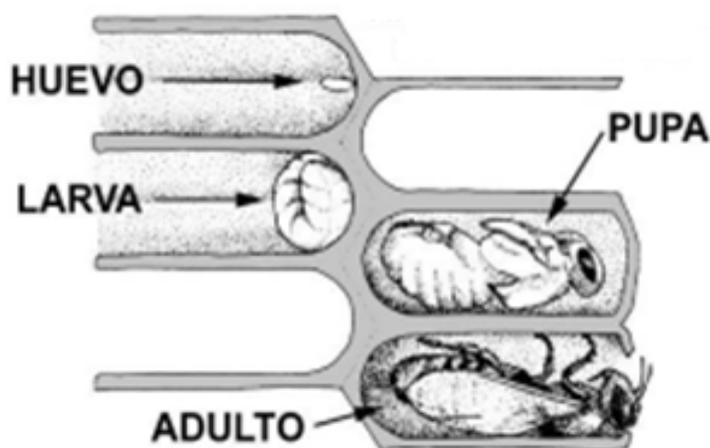


Figura 1.1 Estados del ciclo de vida de *Apis mellifera*

1.3.3 Enfermedades de *Apis mellifera*

Las abejas adultas de la miel son atacadas por numerosos agentes patógenos, ácaros como *Acaropsis woodi* que produce la Acariosis, *Varroa destructor* que ocasiona la Varroosis, (enfermedad de gran importancia económica) y también por protozoarios como *Nosema apis*, agente causal de la Noserosis (Manual de la OIE, 2004); además pueden darse virosis, como la parálisis aguda y la parálisis crónica (Manual de enfermedades apícolas, 2009). Las larvas también pueden verse afectadas, por micosis como la Ascophaerosis o Cria Yesificada causada por el hongo *Ascophaera apis* (www.inta.gov.ar, 2004); o por enfermedades bacterianas como la Loque Europea producida por un conjunto de bacterias, principalmente *Melissococcus pluton* y la Loque Americana o American Foulbrood (AFB), siendo el agente causal *Paenibacillus larvae* (Manual de la OIE, 2004).

1.4 Loque americana

La Loque Americana (LA) es una de las enfermedades más serias e infecciosas de las colmenas por su alto grado de patogenicidad y virulencia. La misma causa severos daños económicos al sector apícola en muchos países productores de mieles, además debido a que las abejas juegan un papel vital en la polinización de cultivos, frutas o flores silvestres, los factores que afecten la salud de las abejas también afectan a la sustentabilidad y rentabilidad de la agricultura (Morse y Calderone, 2000). La enfermedad es motivo de gran preocupación entre los apicultores debido a la posibilidad de difusión del agente causal y a la difícil erradicación de la misma en las colmenas (Alippi, 1992). Los primeros casos de LA registrados en la Argentina fueron en 1989 en Tandil, Buenos Aires y luego se extendió por 11 provincias, Buenos Aires, Entre Ríos, Córdoba, Santa Fe, La Rioja, Chaco, Corrientes, Tucumán, La Pampa, Catamarca y Rio Negro (Alippi, 1995).

1.4.1 Agente causal

Esta enfermedad es producida por un bacilo Gram positivo denominado *Paenibacillus larvae*, este microorganismo mide de 2,5 a 5 μ de largo por 0,4 a 0,8 μ de ancho, es móvil con flagelos periticos. Una característica fundamental de *P. larvae* es la formación de endosporas (Figura 1.2), las cuales pueden ser elipsoidales, centrales o terminales, de 0,6 a 0,7 micras de diámetro y de 1,3 a 1,5 μ de longitud; son extremadamente resistentes al calor, pueden soportar temperaturas de 100 °C por 30 minutos y 120 °C durante 15 minutos; desecación; radiación UV durante 20 minutos; también toleran desinfectantes químicos, cloro, iodados, y agua caliente con cualquier aditivo (Bailey, 1984); pueden permanecer infectivas por más de 40 años, aunque su viabilidad se ve disminuida luego de este periodo. Las endosporas, al poseer doble pared se pueden detectar con coloraciones clásicas para esporas, como la de Shaeffer y Fulton (Baker, 1970). Con la técnica de gota pendiente al teñirlas con fucsina fenicada y observarlas al microscopio de contraste de fase, éstas presentan la particularidad física del clásico movimiento browniano, mientras que las esporas y células vegetativas de otras especies bacterianas permanecen fijas al cubreobjetos, permitiendo una mejor identificación (Alippi, 1990) (Figura 1.3).

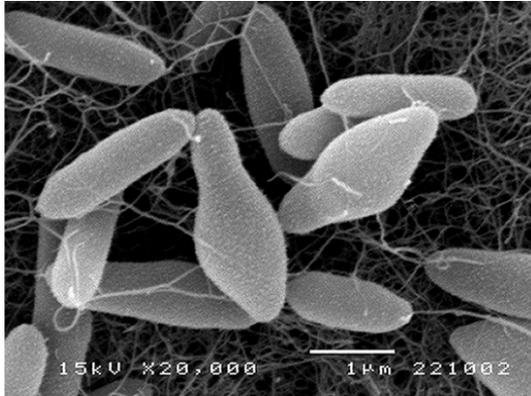


Figura 1.2. *P. larvae*: formación de endosporas



Figura 1.3. *P. larvae*: movimiento browniano de endosporas.

Desde el punto de vista taxonómico antiguamente se demostró que *Bacillus larvae* era el agente causal de la LA. Luego se reclasificó esta especie definiendo un nuevo género, *Paenibacillus* (del latín: casi un *Bacillus*) (Ash y col., 1993). Posteriormente se distinguieron dos subespecies del género, *Paenibacillus larvae pulvifaciens*, causante de la “escama pulverulenta” y *Paenibacillus larvae larvae*, causante de la “escama clásica” (Heyndrickx y col., 1996). El genoma de las dos subespecies poseen una homología del 90%, y un estudio taxonómico polifásico, que comprendió características morfológicas, bioquímicas y estudios genómicos del ADN bacteriano, concluyó que la diferenciación entre las subespecies *Paenibacillus larvae larvae* y *Paenibacillus larvae pulvifaciens* no está justificada, ya que ambas son variantes de la especie *Paenibacillus larvae* sin diferenciación a nivel subespecie (Genersch y col., 2005).

1.4.2 Ciclo infeccioso

Las abejas nodrizas pueden albergar a las esporas tanto sobre la superficie corporal como dentro de su tracto digestivo. De este modo, al alimentar a las larvas, las nodrizas portadores transmiten oralmente la infección o inclusive lo hacen indirectamente contaminando la celda. Las larvas ingieren o consumen alimento contaminado con esporas, que son la única forma infectiva y las responsables del inicio del ciclo de la enfermedad, una vez dentro del intestino de ellas (pH 6,5-oxígeno óptimo), las esporas germinan después de un período variable, que fluctúa entre las 24 y 48 h, originándose así las formas vegetativas. Estos bacilos flagelados se reproducen y desarrollan dentro del tracto digestivo de la larva. Aquí la bacteria comienza un

estilo de vida de comensalismo, alimentándose de lo ingerido por la larva; se sabe que *P. larvae* contiene enzimas activas de vías involucradas en el metabolismo de carbohidratos como glucosa y fructosa (Julian y Bulla, 1971; Neuendorf y col., 2004), como las enolasas citoplasmáticas (Antúnez y col., 2010), que además tienen un papel secundario en la virulencia cuando son secretadas extracelularmente (Lamonica y col., 2005; Moore, 2004). Cuando la larva pasa al siguiente estadio, durante el desarrollo de la pre-pupa (Woodrow y Holst, 1942; Bailey, 1984), estos bacilos penetran activamente las células endoteliales del intestinal, produciendo la invasión bacteriana de la hemolinfa (Bailey y Ball, 1991). Una característica de *P. larvae* es que secreta proteasas extracelulares de gran actividad durante el crecimiento vegetativo y la infección, se especula que son inmunogénicas, ya que están involucradas en la degradación de los polipéptidos antibacterianos del sistema inmunitario de las abejas (Casteels y col., 1989), y serían las responsables de la ruptura de la integridad de la barrera epitelial, al degradar la unión célula-célula y permitiendo que las larvas invadan el hemocele. A partir de ese momento la bacteria sigue desarrollándose y reproduciéndose rápidamente, ocasionando la muerte de la cría por septicemia generalizada (Bambrick, 1964). La muerte puede ocurrir en el estado de pre-pupa o pupa, en esta etapa las enolasas también son necesarias para el proceso de degradación del remanente larval, que va adquiriendo una coloración oscura debido a la pigmentación propia de *P. larvae*, luego la larva muerta se seca dando un aspecto de escama, la cual puede llegar a contener hasta 2,5 billones de esporas (Bailey y Ball, 1991). A partir de la formación de las “escamas” el material se torna muy infectivo y las mismas son una importantísima fuente de diseminación de las esporas (Bambrick y Rothenbuhler, 1961). Las larvas de menos de 24 h. sólo necesitan 6 esporas para infectarse, mientras que una larva de 3 días necesita ingerir millones de esporas para ser infectada. Las esporas bacterianas no pueden germinar tan fácilmente en larvas luego de transcurridas 53 horas después de que el huevo ha eclosionado, normalmente no alcanzan el epitelio, y son eliminadas por las heces fuera del intestino. Tampoco pueden germinar en el tracto digestivo de las abejas adultas debido a la acidez del mismo (pH: 3-3,5). (Hansen y Brodsgaard, 1999).

Las larvas de reinas son más susceptibles a la enfermedad que las larvas de obreras y estas a su vez son más susceptibles que las larvas de zánganos. Esto se relaciona directamente con la proporción de polen que ingiere cada uno, ya que éste contiene microorganismos que son antagonistas de *P. larvae* (Rinderer y Rothenbuhler, 1969).

1.4.3. Sintomatología

La enfermedad se puede identificar claramente en el campo observando los marcos de cría de los panales afectados, presentando una distribución irregular, así se pueden encontrar infectados y sanos en el mismo panal (Figura 1.4) y de acuerdo con el grado de infección que presenten, suele visualizarse un aspecto de cría salteada o de mosaico, con celdas operculadas sanas, celdas no operculadas con restos de larvas enfermas y celdas vacías. El opérculo de una celda que contiene una larva enferma aparece húmedo y oscurecido, el cual comienza a ponerse cóncavo y perforado a medida que avanza la infección (Manual de la OIE, 2004) (Figura 1.5).

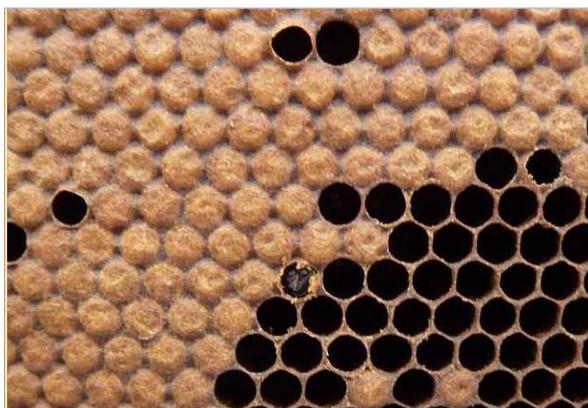


Figura 1.4. Marco sin sintomatología



Figura 1.5. Marco con sintomatología de LA

La cría muere una vez finalizada su etapa larval, luego de ser operculada la celda principalmente durante el estadio de pre-pupas y en segundo lugar de pupas. Va cambiando de color y consistencia, primero desde el pardo amarillento, luego un pardo oscuro y por último un negro pardusco; durante este cambio de coloración la larva se va achicando, deformando y finalmente se adhiere hacia uno de los lados de la celda (Figura 1.6), hasta adquirir el aspecto de una costra o escama, la cual es de difícil extracción. En algunos casos si la muerte ocurre pasado el estadio de pre-pupa se forma una lengua, una protuberancia que permanece adherida en forma vertical cruzando la celda (www.inta.gov.ar, 2004).

Al localizarse los cuadros de cría con el aspecto y los síntomas clásicos de LA que fueron descritos anteriormente, si se introduce un palillo a través del opérculo se extrae una masa de color variable y apariencia viscosa o chiclosa, que al estirla se forma un largo filamento de 2,5 hasta 4 cm, esto se conoce como “prueba de la cerilla” (Figura 1.7). Si se abre la colmena en los casos avanzados de esta enfermedad, es muy notable percibir un fuerte olor pútrido y penetrante que es similar al de la cola de carpintero (www.inta.gov.ar, 2004).

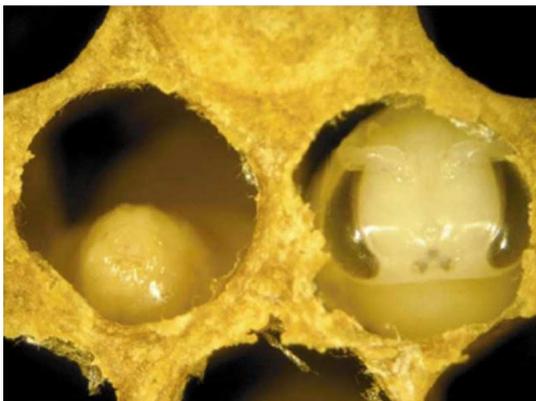


Figura 1.6. Masa viscosa de larva infectada (izq) Pupa sana con ojos oscuros (der).



Figura 1.7 Prueba de la cerilla, donde se observa el aspecto viscoso de la larva muerta.

1.4.4 Difusión de la enfermedad

La difusión de la enfermedad puede darse por la diseminación de las esporas 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 entre otros productos (Matheson y Reid, 1992). Entre las colmenas se da por medio del pillaje, cuando hurtan alimento de otras colmenas, o deriva de abejas, al ingresar a una colmena equivocada por desorientación (Hornitzky, 1998). Una forma común de propagación de la enfermedad es la causada por el apicultor, mediante el intercambio de marcos, la compra-venta de reinas, crías o enjambres artificiales sin control sanitario. También por el uso de ceras y polen sin esterilizar y el mal uso de antibióticos (Manual de la OIE, 2004). Además con las condiciones actuales de manejo comercial de las explotaciones apícolas, en las cuales es común el traslado de materiales entre diversas regiones y países, el hombre constituye un eslabón fundamental en la diseminación de LA (www.inta.gov.ar, 2004).

Un brote puede aparecer y luego desaparecer, sin embargo, es improbable que las abejas puedan retirar de esa colonia todas las esporas formadas durante esa primera infección, por consiguiente, en algún momento esas esporas pueden comenzar otra vez el ciclo.

Las abejas adultas pueden identificar la infección muy poco después que esta se produce; en las colonias muy afectadas, se observa disminuida gradualmente su población hasta el punto que la reina con unas pocas abejas abandonan las mismas.

En la mayoría de los casos las colonias enfermas que se recuperan parecen sanar abruptamente durante la temporada de miel. Esto se debe fundamentalmente a:

- Los esporos pueden diluirse en el néctar recién recolectado hasta tal punto que las larvas jóvenes susceptibles tienen pocas probabilidades de recibirlas con el alimento.
- Las abejas evitan almacenar miel o polen en celdas que contengan restos larvales de larvas muertas por LA.
- El flujo del néctar estimula el comportamiento higiénico de las nodrizas.
- El polen recolectado protege en cierta medida a las larvas jóvenes de la infección cuando se añade a su alimento.
- Hasta el 80% de las esporas que contaminan el néctar son eliminadas por el proventrículo de la abeja adulta.

1.4.5 Diagnóstico

Esta enfermedad es tan típica que su detección puede efectuarse directamente en el campo, aunque con la ayuda del laboratorio se puede obtener una confirmación inequívoca del diagnóstico. El mismo utiliza técnicas para detección, aislamiento e identificación de *P. larvae* a partir de cultivos realizados con restos larvales o esporas contenidas en miel. Mientras que *P. larvae* esporula y se multiplica de manera eficiente en la hemocele de las larvas de abejas, crece pobremente en medios de cultivo. Por esto, los mismos, han sido desarrollados en base a residuos de larvas, miel, cera y abejas adultas con el fin de aislar a este agente patógeno. Es incapaz de desarrollar en medios de cultivo simples, son indispensables para su crecimiento la tiamina o vitamina B1, el extracto de levadura y varias peptonas. Es por ello adecuado el uso de una base rica como agar MYPGP que tiene como base al medio Müller-Hinton. Por ser un microorganismo anaerobio facultativo, se desarrolla mejor en condiciones de microaerofilia, por lo cual se incuba en una atmosfera de 5% de CO₂, durante 48-72 h debido a que presenta un crecimiento lento (www.inta.gov.ar, 2004).

En caso de enfermedad clínica, se requiere del aislamiento del agente patógeno por subcultivo y se dispone de varias técnicas sencillas de laboratorio para confirmarla como la presencia de esporas resistentes al calor, la velocidad de crecimiento de la bacteria, la morfología de la colonia, combinadas con la tinción de Gram, la prueba de la catalasa y la prueba de la reducción de nitratos (facultativa). También puede ir acompañado de otro método de examen directo de los restos de la larva, como es la técnica de la gota pendiente, donde se observan los movimientos brownianos de las esporas de *P. larvae*.

Cuando el analista no puede basarse en la presencia de signos clínicos o cuando la enfermedad está aún en su fase subclínica, se recomienda una identificación más completa del agente patógeno. Puede considerarse como concluyente el establecimiento del perfil bioquímico de las colonias aisladas sospechosas. Además de las características básicas previamente mencionadas, se acompañan de la prueba de producción de ácido a partir de carbohidratos, el crecimiento en caldo nutritivo, la hidrólisis de almidón y caseína, la utilización de citrato y la licuación de gelatina.

Un método rápido para la detección consiste en emplear la técnica de PCR, la cual se lleva a cabo a partir, del aislamiento o directamente de los restos de la larva sin la etapa de cultivo previo (Manual de la OIE, 2004).

1.4.6 Control de Loque Americana

Medidas profilácticas

1. Examinar periódicamente las colmenas a efectos de detectar sintomatología.
2. Examinar las colmenas vecinas a los focos de infección.
3. Manejar con cuidado las colmenas infectadas y limpiar adecuadamente todos los materiales que hayan estado en contacto.
4. No alimentar colonias con miel o polen provenientes de panales contaminados. Usar sustitutos.
5. No deben incorporarse al apiario, núcleos, colmenas, paquetes, celdas reales y reinas capturadas de origen desconocido hasta tanto sea verificada su condición sanitaria.
6. Evitar la deriva de abejas entre colmenas y la exposición de miel o marcos con riesgo de pillaje
7. Comprar cera estampada previamente esterilizada (por radiación gamma o en autoclave).

Tratamientos

La forma de mayor efectividad para lograr la erradicación total de la enfermedad es mediante la quema de colmenas, que consiste en incinerar en un pozo todo el material contaminado (Morse y Shimanuki, 1990; Matheson y Reid, 1992; Alippi y Albo, 1998). También se puede realizar una desinfección del material contaminado, logrando una erradicación parcial de la enfermedad y una recuperación de pisos, techos, alzas y marcos de las colmenas. Puede hacerse mediante el chamuscado, donde se prende fuego durante 20 a 60 segundos y luego se ahoga para lograr quemar unos 2 mm de la madera; una esterilización con radiación gamma (Matheson y Reid, 1992; Alippi y Albo, 1998) o por inmersión en un baño de parafina a 160 °C

durante 20 minutos (Matheson, 1986; Goodwin y Van Eaton, 1999). También pueden utilizarse métodos químicos, mediante el uso óxido de etileno, bromuro de metilo, un baño con soda caustica caliente o hipoclorito de sodio para desinfectar herramientas y vestimentas (Faucon y col., 1980; Morse y Shimanuki, 1990).

Existen métodos alternativos de manejo con los cuales se puede preservar el material vivo. Uno de ellos es el mejoramiento genético de las abejas. Se han hallado líneas de abejas resistentes a la infección de LA, las cuales manifiestan un comportamiento higiénico diferente. Poseen una fuerte tendencia a desopercular las celdas que contienen larvas o pupas muertas y removerlas rápidamente, mientras que las abejas no higiénicas dejan las escamas en las celdas. El comportamiento está determinado por varios genes que se expresan como recesivos, razón por la cual esta conducta se manifiesta a muy baja frecuencia en poblaciones naturales. (Rothenbuhler, 1964). También ha comenzado a ensayarse el biocontrol utilizando bacterias antagonistas (Generesch, 2010).

Una forma de control de LA que resulta económica y ecológicamente atractiva cuando la enfermedad se halla ampliamente diseminada en los colmenares de una zona, es el tratamiento quimioterápico con sustancias naturales (Bailey y Ball, 1991). Existen estudios *in vitro* sobre la eficacia del propóleo y de algunos extractos o aceites esenciales de origen vegetal (Calderone y col., 1994, Alippi y col., 1996) en la inhibición del desarrollo de *P. larvae*, pero se necesita una experiencia más amplia para determinar su efectividad, dosis y modos de aplicación más adecuados en colmenas infectadas (Alippi y col., 2001).

Por otro lado, el uso de antibióticos es una buena alternativa para el control de LA, comúnmente son empleados la oxitetraciclina (como clorhidrato) y el sulfatiazol sódico (Bailey y Ball, 1991; Morse y Shimanuki, 1990). En algunos países, como EE.UU. y Argentina, el empleo de sulfatiazol sódico se ha dejado de lado debido a la alta residualidad del producto en miel. Con respecto a la oxitetraciclina, se han detectado casos de resistencia *in vitro* en las cepas bacterianas (Alippi, 1999; Miyagi y col., 2000; Evans, 2003) como así también recurrencia de la enfermedad y toxicidad del antibiótico para las abejas adultas. El empleo de tartrato de tilosina es una alternativa efectiva para el control de la enfermedad porque no es tóxico para las abejas, su residualidad en miel es baja y la enfermedad no presenta recurrencia hasta un año después de efectuado el tratamiento (Hitchcock y col., 1970; Peng y col., 1996; Alippi y col., 1999). En 2005, Food and Drugs Administration (FDA) luego de haber examinado datos compilados por los científicos del Laboratorio de Investigación de Abejas de Miel mantenido por el Servicio de Investigación Agrícola en Beltsville, Maryland, permitió la aprobación de la tilosina para uso veterinario (www.ars.usda.gov).

1.5 Antibióticos

Un agente antimicrobiano es un compuesto químico, capaz de actuar sobre microorganismos, destruyéndolos o inhibiendo su crecimiento. Pueden ser producidos de manera sintética y se los llama quimioterápicos, o ser obtenidos de forma natural, a partir del metabolismo de organismos vivos, principalmente hongos y bacterias, los cuales son llamados antibióticos. Un buen antimicrobiano debe cumplir con requisitos claves como, toxicidad selectiva, es decir, la capacidad de inhibir al agente patógeno sin afectar al hospedador; especificidad, la capacidad de unirse a un sitio en particular de la bacteria; y potencia biológica, referida a la menor concentración posible del antibiótico que ejerza la acción requerida.

Para que un antibacteriano (ATB) pueda ejercer su acción requiere que las bacterias se encuentren en división activa, ya que lo hacen interfiriendo en sus mecanismos fisiológicos. Se los agrupa según cual sea el blanco de acción. Los que actúan sobre síntesis de pared celular; los que alteran la estructura de la membrana citoplasmática o los análogos de factores de crecimiento que intervienen en el metabolismo. Algunos ejercen su acción a nivel de síntesis de ácido nucleicos y otros inhiben la síntesis de proteínas a nivel de subunidad 30 S, como las tetraciclinas, o uniéndose a la subunidad 50 S, como los macrólidos (Figura 1.8) (Sanchez de Rivas, 2006; Brock y col.,2004).

Los diferentes modos de acción de los antibacterianos producen efectos sobre el crecimiento de la bacteria. Pueden ser bacteriolíticos, si provocan la muerte celular por lisis, bactericidas, si matan la bacteria sin ruptura celular, uniéndose fuertemente a sus dianas, o bacteriostáticos, si inhiben el crecimiento pero la célula no muere, interfiriendo en la síntesis proteica mediante la unión a los ribosomas, la cual no es fuerte y cuando la concentración del antibacteriano disminuye se desprende de los ribosomas y se reanuda el crecimiento (Brock y col., 2004).

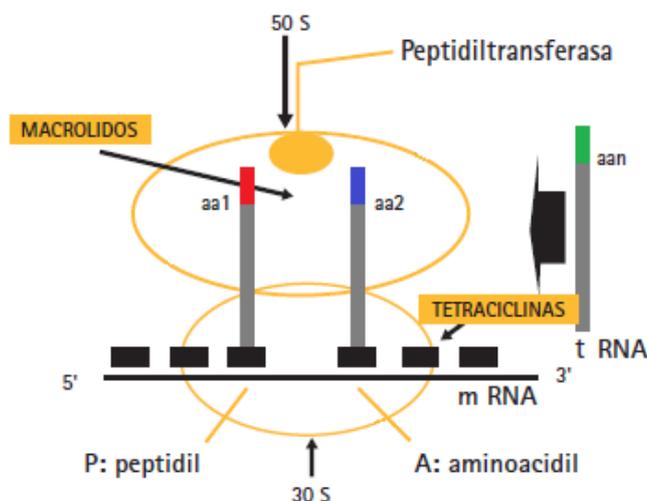


Figura 1.8 Sitios de acción en el ribosoma bacteriano de los ATB inhibidores de la síntesis proteica.

En muchos casos las bacterias han desarrollado mecanismos, con los cuales logran la interrupción o alteración de uno o más de los pasos esenciales para una acción antimicrobiana eficaz. Entre los diferentes mecanismos de resistencias, se destacan, la *biológica o clínica*; *la influida por factores ambientales*, como el pH, la atmosfera anaeróbica, la concentración de cationes o el contenido de timidina; y *la mediada por microorganismos*, producida por rasgos codificados genéticamente y puede ser de tipo intrínseca o adquirida.

La *resistencia intrínseca* es una característica natural y heredada en forma invariable de todas las cepas que constituyen un grupo, un género o una especie específica. Es una resistencia predecible una vez conocida la identidad del microorganismo, ya que también se conocen ciertos aspectos de su perfil de resistencia a los antimicrobianos.

Las alteraciones fisiológicas y en la estructura de las células a causa de cambios en la composición genética habitual de un microorganismo, dan como resultado una *resistencia adquirida*. En este caso es un rasgo asociado con algunas cepas específicas de un grupo o especie y no a otras, por lo tanto la presencia de este tipo de resistencia es imprevisible en los aislamientos. Estas resistencias pueden ser originadas por mutaciones de genes normales de la bacteria que hacen que el antibiótico ya no pueda actuar o por adquisición de genes de otros microorganismos mediante mecanismos de transferencia horizontal génica, como pueden ser, la conjugación entre microorganismos emparentados o no, donde la presencia de plásmidos conjugativos promiscuos portadores de resistencias es un buen aliado, por transducción mediada por bacteriófagos, o por transformación donde la simple lisis libera el ADN que es captado por una bacteria receptora (Figura 1.9).

Independientemente de si el tipo de resistencia sea intrínseca o adquirida, las estrategias utilizadas para resistir la acción del antibiótico son similares (Figura 1.10). Pueden ser, la degradación enzimática o alteración del antibiótico, la modificación química de la molécula blanco, la disminución de la disponibilidad intracelular del antibiótico mediante la restricción de la entrada o aumento del eflujo, o por establecimiento de una ruta metabólica alternativa. (Bailey y Scott, 2009).

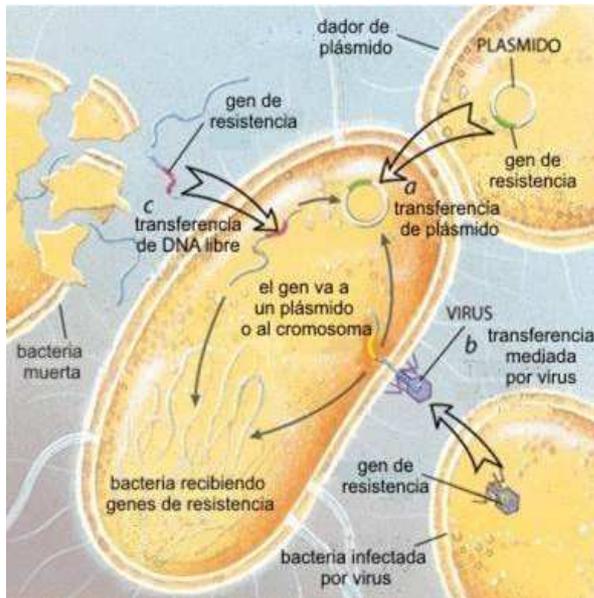


Figura 1.9. Transferencia de resistencia a ATB
 Conjugación con plásmidos (a)
 Traducción mediada por bacteriófagos (b)
 Transformación con DNA libre (c)

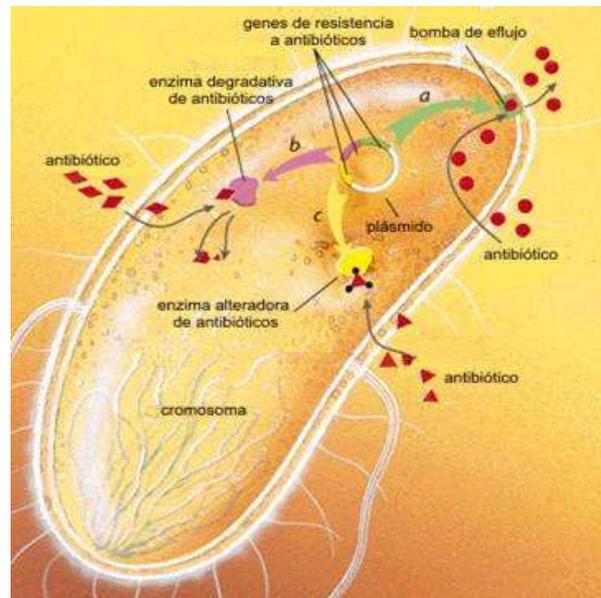


Figura 1.10. Mecanismos de resistencia a ATB.
 Aumento del eflujo (a)
 Degradación enzimática (b)
 Alteración enzimática(c)

1.5.1 Tetraciclinas

Es una de las familias de antibióticos más antigua. La estructura química de este grupo es tetra-cíclica, de ahí su denominación, siendo su núcleo central un octa-hidro-9-naftaceno. El primer antibiótico de este grupo, la clortetraciclina (CTC), fue obtenido en 1948 a partir de *Streptomyces aureofaciens* por el profesor Duggar, recibiendo por ello el nombre de aureomicina. En 1950 Sobón y colaboradores lograron aislar de *Streptomyces rimosus* la oxitetraciclina (OTC), comercialmente conocida como terramicina, y más tarde en 1953 mediante la eliminación del átomo de cloro de la clortetraciclina se obtuvo la tetraciclina (TC) (Alippi y col., 2006). Son antibióticos de amplio espectro, presentan actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivo, Gram negativo, aerobias y anaerobias.

Oxitetraciclina

La oxitetraciclina (OTC) es un análogo de la tetraciclina. La estructura básica de la tetraciclina poseen en una parte, una serie de grupos funcionales de oxígeno, modificaciones en esta región implica una pérdida de la actividad biológica. Sin embargo, las modificaciones sintéticas de los grupos funcionales en la región contraria de la molécula, dan lugar a nuevos compuestos con una mayor actividad biológica, además estas alteración induce cambios en el tamaño, forma, carga, densidad electrónica y polaridad, que favorecen a propiedades como la solubilidad, lipofilia e incluso la afinidad con las moléculas diana. En el caso de la OTC presenta un grupo hidroxilo (OH) adicional (Figura 1.11).

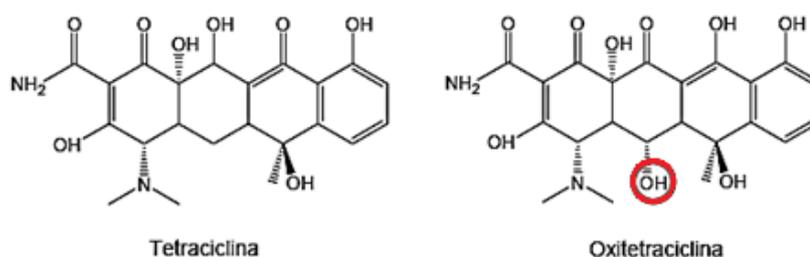


Figura 1.11. Estructura química de la tetraciclina y la oxitetraciclina.

Como toda tetraciclina, la OTC, para que ejerzan su acción, en las bacterias Gram negativas requieren penetrar la membrana externa por mecanismos de difusión pasiva a través de los canales hidrófilos o porinas, y la membrana citoplasmática, tanto en Gram negativo como en Gram positivo, la atraviesan por procesos de transporte activo dependiente de energía, lo cual determina que la concentración intracelular sea mayor que la extracelular. Una vez dentro de la célula la OTC se unen de manera reversible a los receptores en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano y de esta manera pueden bloquear la fijación del aminoacil-tRNA al sitio aceptor A, en el complejo mRNA-ribosoma, esto evita la incorporación de nuevos aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento, inhibiendo la síntesis proteica (Mendoza Patiño y Campos Sepulveda, 2008). Además de este mecanismo básico, tienen la capacidad de quelar metales di o trivalentes, como el Mg^{2+} , necesario para que se produzca la unión ribosómica e inhibir algunos sistemas bacterianos, como los implicados en la fosforilación oxidativa. A través de este mecanismo, la OTC produce un efecto bacteriostático (Rang y col., 2000). La selectividad de este antibiótico para inhibir la síntesis de proteínas en las bacterias, radica en el hecho de que las células eucariotas carecen del sistema de transporte activo y, además, las características del ribosoma bacteriano son diferentes a las del ribosoma eucariota (Mendoza Patiño y Campos Sepulveda, 2008).

La resistencia a las tetraciclinas por parte de las bacterias, puede ser consecuencia de una disminución de la penetración del antibiótico al interior de ella y puede ir acompañada de la expulsión del ATB al exterior de la célula, mediante transportadores de membrana energía dependientes, codificados por el gen *tet* proveniente de plásmidos transmisibles. Otro mecanismo causado por mutaciones cromosomales, se evidencia por la modificación de las proteínas ribosomales que disminuyen su afinidad por el complejo TC-Mg²⁺ (Murray y col., 2009).

La presencia de antibióticos en los alimentos genera creciente preocupación en los consumidores debido a los riesgos de toxicidad o reacciones alérgicas en personas hipersensibles y a la posibilidad de generación de resistencia por parte de microorganismos patógenos. El plan nacional de Control de Residuos E Higiene en Alimentos (CREHA), puesto en marcha por el SENASA, exige que las mieles no puedan superar 30 µg/Kg como límite máximo de residuo permitido de OTC. Existen diversas técnicas de detección de OTC en miel, las primeras desarrolladas fueron biológicas, también inmunoquímicas, pero posteriormente se buscaron metodologías más selectivas como la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detector UV con un límite de detección de 10 µg/Kg, debido a que las tetraciclinas presentan la propiedad fluorescer a la luz ultravioleta, (Bedascarrasbure y col.,2002).

1.5.2 Macrólidos

Bajo esta denominación se agrupan una serie de antibióticos que se caracterizan por tener un anillo macrocíclico lactónico unido mediante enlaces glucosídicos a diversos desoxiazúcares aminados, estas azúcares son las responsables de la actividad antimicrobiana, y las diversas sustituciones en dicho anillo han dado lugar a una clasificación de acuerdo tengan 14, 15 y 16 átomos de carbono. Los que disponen de 14 y 15 carbonos pertenecen al grupo de la eritromicina, descubierta en los productos metabólicos de una cepa de *Streptomyces erytherus*, por Manuel Alexander McGuire y colaboradores en 1952, de la cual, por producción sintética derivaron la claritromicina y la azitromicina. Por otro lado, los fármacos que presentan un anillo lacónico de 16 átomos, se agruparon dentro de las espiramicinas, como la tilosina aislada a partir de *Streptomyces fradiae*, y la tilmicosina producida sintéticamente a partir de la tilosina (Rodilla y col., 1995).

Los macrólidos ejercen su efecto solo en los microorganismos que se encuentran en proceso de replicación. Se los considera de espectro intermedio, ya que penetran más fácilmente en las bacterias Gram positivo que en las Gram negativo.

Tilosina

La tilosina (TLS) es uno de los antibióticos de la familia de macrólidos, se encuentra en forma de mezcla de varias tilosinas como la A (Figura 1.13), en mayor proporción, la B, la C y la D. Todas tienen en común el anillo lacto macrocíclico y unidos a él tres azúcares, micinosa, micaminosa y micarosa, el sitio de unión de esta última es la que diferencia los tipos de TLS.

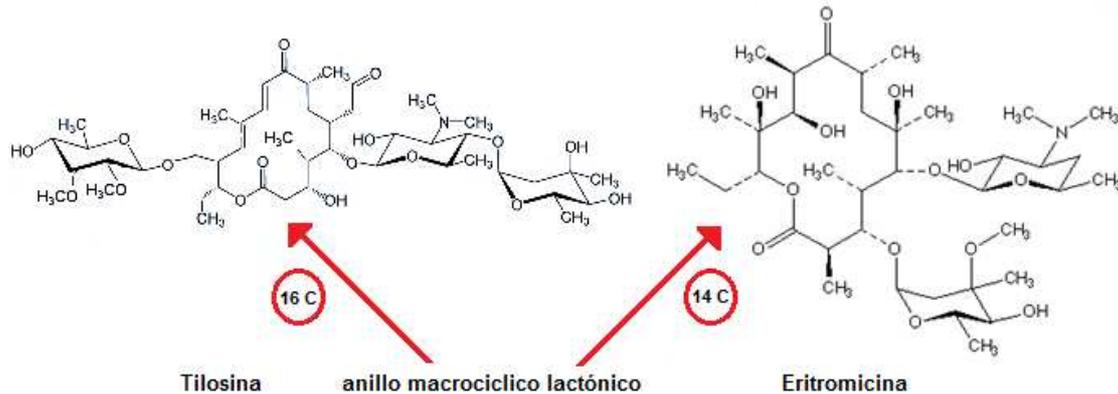


Figura 1.13. Estructura química de la tilosina A y de la eritromicina.

La entrada de la TLS a la célula bacteriana se produce por difusión pasiva, haciéndolo a mayor velocidad en su forma no ionizada para la cual la membrana celular es más permeable; esta característica explica el incremento de la actividad antibacteriana observada a pH alcalino. Actúan fijándose a una proteína de la subunidad ribosomal 50S, impidiendo la formación de la cadena peptídica mediante la inhibición de la enzima que cataliza el enlace peptídico, es decir, la peptidil transferas (Escolar y col., 1998). Estos antibacterianos, considerados primariamente bacteriostáticos, también pueden comportarse como bactericidas, dependiendo del microorganismo, de las concentraciones del antibiótico y del tiempo de exposición.

La resistencia a la TLS, como a otros macrólidos, suele ser consecuencia de la metilación del ARN ribosomal que origina una menor afinidad por la droga, esta resistencia puede ser constitutiva o inducible y es de origen plasmídico que contiene el gen de una ARN-metilasa. Entre otros mecanismos de resistencia también figura la inactivación enzimática del antibiótico (estearasas, fosforilasas, glucosidasas) (Murray, 2009).

En Argentina el plan CREHA, establece que las mieles no puedan superar 10 µg/Kg como límite máximo permitido de residuo de TLS. Para la determinación cuantitativa de residuos de TLS en miel se utiliza la técnica HPLC, con dos detectores distintos DAD y MS, permite no sólo llegar a límites de detección muy bajos, de 2 a 3 µg/Kg del antibiótico en la miel, sino también evaluar los 4 isómeros de tilosina encontrados en la formulación técnica (Bernal del Nozal, 2007).



Cabe destacar que los antibióticos empleados en el tratamiento de Loque Americana eliminan los síntomas de la enfermedad en las colmenas, controlando las formas vegetativas de la bacteria, pero no así las esporas. No obstante, cuando dichas esporas están presentes en bajas concentraciones en el alimento de las larvas susceptibles, los antibióticos impiden su germinación y retrasan su multiplicación.

Si el tratamiento se realizara de la forma adecuada, permitiría la supervivencia de las larvas individuales, la recuperación y mejoramiento del estado sanitario de las colmenas, incrementando la producción y la calidad de sus productos. En cambio, si el tratamiento no se realiza correctamente, en cuanto a dosis y períodos de administración, la enfermedad puede volver a desarrollarse y es necesario repetirlo a medida que reaparecen los síntomas, con el riesgo de aparición de cepas bacterianas resistentes.

Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

Tratamientos incorrectos de Loque Americana generan la aparición de cepas de *Paenibacillus larvae* resistentes a antibióticos.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo General

Evaluar la actividad antibacteriana de los antibióticos oxitetraciclina y tilosina, usados frecuentemente en la colmena, frente a *Paenibacillus larvae*.

2.2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Aislar, Identificar y conservar cepas de *P. larvae* aisladas a partir de cuadros de colmenas infectadas con Loque Americana.
- ✓ Analizar la actividad antibacteriana de oxitetraciclina y tilosina frente a las cepas de *P. larvae* aisladas.
- ✓ Recuperar cepas de *P. larvae* resistentes a los antibióticos probados y evaluar la actividad de los mismos.

Materiales y Métodos

3.1 **Materiales**

3.1.1 Medio de cultivo para el aislamiento de *P. larvae*

Medio MYPGP

Medio Muller-Hinton caldo.....	1,0 g.
Extracto de Levadura	1,5 g.
K ₂ HPO ₄	0,3 g.
Glucosa.....	0,2 g.
Piruvato de sodio.....	0,2 g.
Agua destilada	100 mL.
Agar.....	2,0 g
pH Final.....	7

3.1.2 Reactivos para la identificación de *P. larvae*

Colorantes para la coloración de Gram

Violeta de genciana

Lugol (I₃K)

Alcohol

Fuscina básica o safranina

Reactivo para la prueba de la catalasa

Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 10%

3.1.3 Actividad antimicrobiana

Antibióticos

Oxitetraciclina (OTC)

Tilosina (TLS)

Diluyentes

Agua destilada estéril

Dimetilsulfóxido (DMSO)

Solución fisiológica

Cloruro de sodio (NaCl) -----0,9 g.

Agua -----100 mL.

Escala de Mac Farland

Tabla 3.1. Preparación de los tubos de la escala de Mac Farland

TUBO	Cl ₂ Ba 1%	H ₂ SO ₄ 1%	u.f.c /mL
0,5	0,05	9,95	1,5 x 10 ⁸
1	0,1	9,9	3,0x10 ⁸
2	0,2	9,8	6,0x10 ⁸
3	0,3	9,7	9,0x10 ⁸
4	0,4	9,6	1,2x10 ⁹
5	0,5	9,5	1,5x10 ⁹
6	0,6	9,4	1,8x10 ⁹
7	0,7	9,3	2,1x10 ⁹
8	0,8	9,2	2,4x10 ⁹
9	0,9	9,1	2,7x10 ⁹
10	1	9	3,0x10 ⁹

Es una escala de turbidez elaborada con una mezcla de BaCl_2 0,048 M (1% v/v) y H_2SO_4 0,36 M (1% v/v). El cloruro de bario va en cantidad creciente mientras el ácido sulfúrico va disminuyendo su proporción, de modo que el sulfato de bario formado, por ser una sal insoluble, es el que proporciona la turbidez (Tabla 3.1). La lectura se realiza por medio de espectrofotometría a una longitud de onda de 620 nm, para determinar la absorbancia (A). Cada uno de los tubos patrón tiene una absorbancia equivalente a una concentración conocida de bacterias. Esto hace posible comparar una suspensión bacteriana en la que no se conoce su número, con el tubo del patrón de Mac Farland que más se asemeje en turbidez (Koneman, 1999)

En la presente investigación se utilizó como referencia para la preparación de las suspensiones bacterianas el tubo número 0,5 en la escala de Mac Farland el cual tiene una absorbancia entre 0,250 y 0,300 y equivale a 1.5×10^8 ufc/mL.

3.1.4 Cepas de *P. larvae*

Seis cepas bacterianas (1, 2, 3, 4, 5 y 6) fueron provistas por el INTA Balcarce, provincia de Buenos Aires. Por otro lado, cinco cepas (7, 8, 9, 10 y 11) aisladas de cuadros de colmenas con síntomas de Loque Americana, de la zona sur de la provincia de Córdoba (La Carlota, Alcira Gigena, San Basilio, Coronel Moldes, Río Cuarto). Además, se utilizaron cepas del mismo microorganismo (12 y 13) cedidas por el Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI) y una cepa de referencia (14) proveniente de Concordia, Entre Ríos.

3.2 Métodos

La metodología de aislamiento, identificación, mantenimiento y conservación desarrollada en este trabajo fue la sugerida por Alippi (1990) y Bailey y col. (2009)

3.2.1 Aislamiento

El aislamiento de *P. larvae* se realizó con la técnica de estrías por agotamiento en placas con medio de cultivo MYPGP agarizado, incubando en posición invertida a 37 °C en atmósfera de microaerofilia con 5% de CO_2 durante 48-72 h.

3.2.2 Identificación

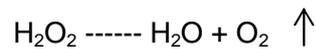
Coloración de Gram

A partir de las cepas aisladas en medio de cultivo MYPGP agarizado, se extendió sobre un portaobjetos una delgada película bacteriana, de cada una de las cepas de *P. larvae*, se fijó con calor, luego se realizó la coloración de Gram y se observó en microscopio con un aumento de 100 x utilizando aceite de inmersión.

Prueba de la catalasa

Esta prueba se realizó a partir de cultivos de 48 h desarrollados en medio de cultivo MYPGP agarizado. Se colocaron 2 gotas de peróxido de hidrogeno al 10 % y una colonia sospechosa sobre un portaobjetos seco y limpio.

La aparición de burbujas son evidencia de una reacción positiva, debida a la acción de la catalasa, una enzima presente en el microorganismo que transforma el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno.



Cuando no se observan burbujas, es decir, que no se produce desprendimiento de oxígeno, la reacción se considera negativa.

Caracterización genotípica

Para la identificación y confirmación molecular, las cepas fueron enviadas a Macrogen, Corea, para su secuenciamiento mediante ARNr 16S. Los datos obtenidos fueron incorporados a la base de datos del GenBank para obtener los porcentajes de cobertura y de similitud para cada cepa estudiada.

3.2.3 Mantenimiento y conservación de *P. larvae*

Para el mantenimiento y conservación de la viabilidad de las cepas de *P. larvae*, se les realizó a las mismas pasajes en placas de Petri con medio de cultivo MYPGP agarizado fresco, cada semana y se las conservo a 4 °C en las placas, selladas con para-film para evitar la deshidratación del medio de cultivo.

3.2.4 Análisis de la actividad antibacteriana

La metodología de este trabajo se desarrolló según De Pooter y col. (1995) y Tiziana Barata y col. (1998).

Técnica de difusión en pozo

1. Preparación de las diluciones del antibiótico:

Se pesó 1 mg del antibiótico en un tubo eppendorf estéril al que se le agregó 1 mL de diluyente. A partir de esta solución se realizó diluciones seriadas al medio (1:2).

2. Preparación del inóculo:

A partir de un cultivo desarrollado en medio de cultivo MYPGP agarizado, incubado a 37 °C en atmósfera de microaerofilia durante 48-72 h, se preparó una suspensión en un tubo con solución fisiológica hasta alcanzar una turbidez correspondiente al tubo 0,5 de la escala de Mac Farland; que presenta una $A_{620nm} = 0,290$ equivalente a una concentración de $1,5 \times 10^8$ bacterias/mL (FDA, 1998).

3. Técnica:

-Se colocó 100 µL de la suspensión celular en cajas de Petri con medio de cultivo agarizado, y la misma se distribuyó con espátula de Drigalsky o hisopo hasta que el inóculo fue absorbido completamente.

-Sobre las cajas sembradas se realizó orificios con un sorbete estéril en la superficie del agar y se colocó en él 50 µL de cada dilución del antibiótico, en concentraciones decrecientes entre 1 mg/mL y 0,005 mg/mL para OTC, y entre 0,06 mg/mL y 0,0005 mg/mL para TLS. El ensayo se realizó por triplicado.

-Para cada cepa se realizó un control negativo colocando 50 μ L del diluyente en el pozo, para verificar la ausencia de contaminantes. Y uno solamente inoculado, para control de viabilidad del microorganismo.

-Se incubaron las cajas de Petri sin invertir a 37 °C en atmósfera de microaerofilia durante 48-72 h.

-Se midieron los halos de inhibición del crecimiento del microorganismo de cada una de las diluciones, para calcular la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del antibiótico probado.

3.2.5 Recuperación de posibles cepas de *P. larvae* resistentes a antibióticos

A partir de los resultados obtenidos de las pruebas de CIM, se recuperaron las colonias que aparecieron dentro de los halos de inhibición de crecimiento de algunas cepas de *P. larvae*, considerándolas posibles resistentes a los antibióticos probados. Se las aisló como se indicó en el inciso **3.2.1**, se las identificó según **3.2.2**, se las mantuvo y se las conservó como indica el punto **3.2.3** y se les midió nuevamente el CIM como se establece en **3.2.4** para su comparación con las cepas originales.

Resultados y Discusión

4.1 Aislamiento

Luego de la incubación a 37 °C en condiciones de microaerofilia durante 48 a 72 h, todas las cepas mostraron la morfología típica de las colonias de *P. larvae* en medio MYPGP; planas, translúcidas algo blanquecinas-grisáceas, con aspecto mucoso y bordes irregulares, en su mayoría pequeñas, con un diámetro de aproximadamente 1 a 3 mm (Figura 4.1). Además se pudieron observar características propias de este microorganismo como el crecimiento lento, es decir, se evidenció el desarrollo de las mismas a partir de las 48 h.



Figura 4.1. Colonias de *Paenibacillus larvae* en medio de cultivo MYPGP

Dado que el *P. larvae* es un agente patógeno que se desarrolla en la hemolinfa de larvas de abeja, para lograr el crecimiento in vitro, son necesarios medios de cultivo muy ricos en elementos nutritivos. Los componentes indispensables para el crecimiento de *P. larvae* son la tiamina o vitamina B1, el extracto de levadura y varias peptonas. Para la esporulación se recomienda el agregado de glucosa y piruvato de sodio. Resulta por ello adecuado el uso de un medio como MYPGP que contiene Müller-Hinton como base rica (Dingman y Stahly, 1983). Además de ser un medio con una calidad nutricional que favorece en crecimiento de *P. larvae*, fue elegido para realizar este trabajo, ya que su coloración translúcida permitió la evaluación de la actividad antimicrobiana. Sin embargo, otros medios también permiten el desarrollo de *P. larvae*, como agar Columbia (Heyndrickx y col., 1996); o el medio de Michael (Carpana y col., 1995).

4.2 Identificación

4.2.1 Pruebas confirmatorias

Coloración de Gram

Las 14 cepas de *P. larvae* mostraron un comportamiento tintorial de Gram positivo y morfología de bacilos cortos y delgados, con extremos redondeados. Se observó una tendencia a agruparse de a pares, y en todos los casos a formar cadenas largas (Figura 4.2).

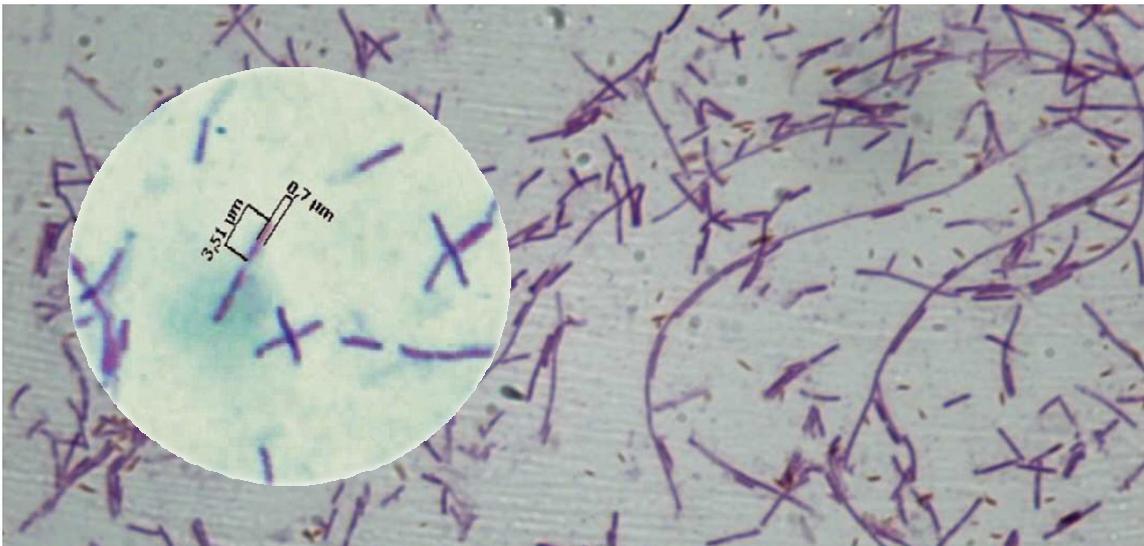


Figura 4.2. Coloración de Gram: morfología y disposición en cadenas de *P. larvae*.

Debido a que la coloración se realizó con aislamientos jóvenes se evidenció la forma vegetativa de este microorganismo, sin embargo, en algunos casos se lograron reconocer las estructuras de resistencia del *P. larvae*, las endosporas, distinguiéndose de las células vegetativas por su refringencia, siendo éstas en algunos casos centrales y en otros terminales (Figura 4.3).

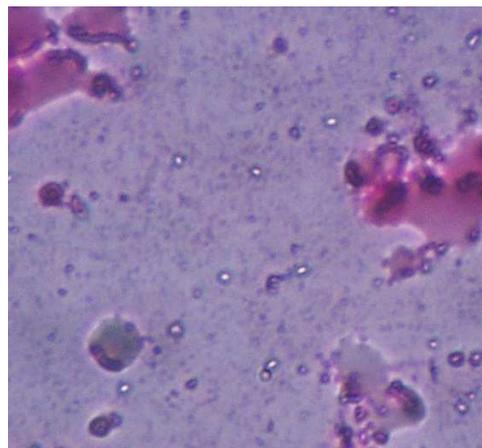


Figura 4.3. Endosporas de *P. larvae*.

Prueba de catalasa

Todas las cepas mostraron ser catalasa negativo, ya que no se detectó la formación de burbujas (Figura 4.4). Es de suma importancia destacar la utilidad de este test para la diferenciación preliminar rápida del *P. larvae* de otras especies de *Paenibacillus* u otros géneros también patógenos para las abejas como *Bacillus*. Los bacilos formadores de esporas, que pueden estar presentes en la colmena, son catalasa positivo, mientras que el agente causal de Loque Americana es el único catalasa negativo (Alippi, 1990).



Figura 4.4. Prueba de la catalasa *P. larvae* (-) (Izq). Control (+) (der)

4.2.2 Caracterización genotípica

Para la identificación y confirmación molecular de las cepas, luego del secuenciamiento mediante ARNr 16S, los datos obtenidos fueron incorporados a la base de datos del GenBank obteniendo los porcentajes de cobertura y de similitud para cada una de las cepas analizadas. Las cepas estudiadas corresponden al perfil genético de la especie *P. larvae*, con porcentajes de cobertura del 99% y del 100% y porcentajes de similitud de 97% y 98%, con cepas de referencia del microorganismo que fueron incorporadas a la base de datos con anterioridad.

4.3 Mantenimiento

El método utilizado para la conservación de las cepas de *P. larvae*, como se describió en el punto 3.2.3, resultó adecuado para las 14 cepas, ya que se pudieron recuperar mediante repiques periódicos en medio MYPGP para sus posteriores estudios, sin pérdida de su viabilidad. Sin embargo, algunas cepas aisladas, provenientes de colonias presuntamente resistentes, que desarrollaron dentro de los halos de inhibición del crecimiento, no lograron mantener su viabilidad, ya que no se las pudo recuperar a través de los repiques, y por lo tanto no pudieron ser estudiadas.

4.4 Análisis de la actividad antimicrobiana

4.4.1 Oxitetraciclina

Para comparar y establecer cuál era el diluyente más adecuado para la disolución del antibiótico, se realizó la técnica con una de las cepas, usando como disolventes DMSO y agua destilada estéril. Los resultados se muestran en la tabla y gráfico 4.1.

Tabla 4.1. Comparación de disolventes de la oxitetraciclina

OTC mg/mL - disolvente	Halos de inhibición de crecimiento (mm \pm D.S)		T del test	
	agua	DMSO		
0,50	40,7 \pm 3,1	49,3 \pm 3,1	1,34	=
0,25	36,7 \pm 3,1	35,3 \pm 1,2	0,73	=
0,13	29,3 \pm 6,1	31,3 \pm 2,3	0,53	=
0,06	25,3 \pm 5,0	24,0 \pm 4,0	0,35	=
0,03	21,0 \pm 0,0	15,0 \pm 1,0	10,4	\neq

= No existen diferencias significativas entre los promedio.

\neq Existen diferencias significativas entre los promedio

Como se observa en el gráfico 4.1, no se muestran grandes diferencias en cuanto a los halos de inhibición del crecimiento formados. Luego de hacer un análisis estadístico con los datos aportados por la tabla 4.1, entre las medias muestrales de ambos diluyente, en cada concentración del ATB, se concluye con un nivel de confianza del 95%, que los valores promedio de los halos de inhibición del crecimiento formados usando DMSO, no presentan diferencias estadísticamente significativas, de los valores promedios de los halos de inhibición de crecimiento formados utilizando agua. Por lo tanto, los siguientes ensayos de la CIM de OTC para las cepas, se realizaron utilizando agua destilada estéril como diluyente, ya que es más económica y más sencilla su manipulación.

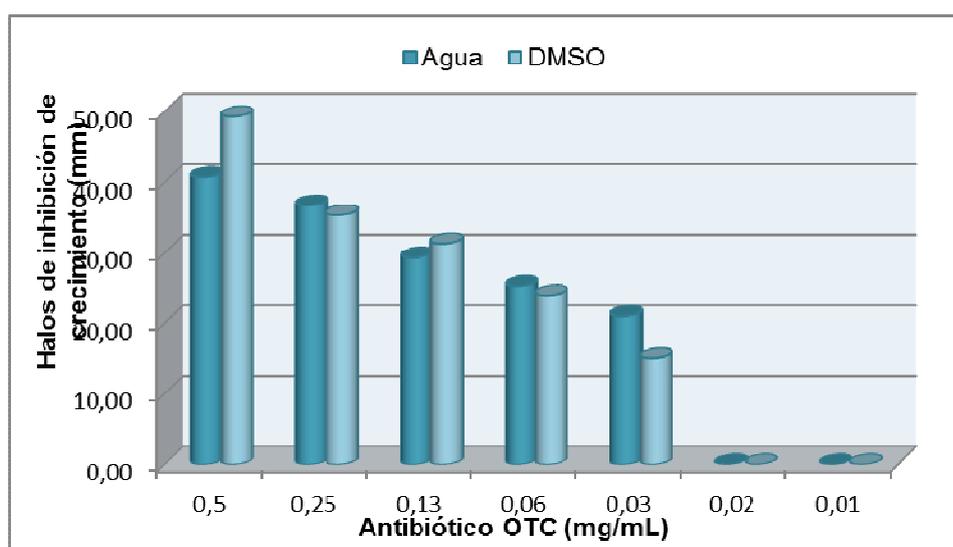


Gráfico 4.1. Comparación de disolventes de la Oxitetraciclina.

Posteriormente se realizó la técnica para todas las cepas, con diluciones seriadas del antibiótico (1mg/mL a 0,005 mg/mL) para llegar al punto de corte, es decir, la concentración a la cual el antibiótico ya no inhibe el crecimiento, y de esta forma poder establecer la CIM. Los resultados se muestran en la tabla y el gráfico 4.2.

Tabla 4.2. Valores de CIM para OTC (mg/mL). Diámetros de zonas de inhibición del crecimiento (mm \pm D.S.) de las 14 cepas de *P. larvae*.

Cepa - OTC mg/mL	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	0,01	0,005
1	-----	16,7 \pm 3,1	10,0 \pm 0,0	NI	NI	NI	NI	NI
2	-----	22,7 \pm 6,1	8,7 \pm 1,2	DISM	NI	NI	NI	NI
3	41,5 \pm 1,4	35,0 \pm 1,4	23,7 \pm 3,2	18,0 \pm 2,0	NI	NI	NI	NI
4	-----	-----	34,7 \pm 5,3	30,7 \pm 1,2	26,7 \pm 3,1	23,3 \pm 1,2	15,3 \pm 3,1	NI
5	35,5 \pm 0,7	31,5 \pm 1,1	25,0 \pm 0,0	DISM	NI	NI	NI	NI
6	55,0 \pm 1,0	40,7 \pm 3,1	36,7 \pm 3,1	29,3 \pm 6,1	25,3 \pm 5,0	21,0 \pm 0,0	NI	NI
7	-----	-----	21,3 \pm 2,3	DISM	NI	NI	NI	NI
8	-----	30,7 \pm 7,0	14,0 \pm 4,0	8,0 \pm 2,0	NI	NI	NI	NI
9	-----	31,7 \pm 1,2	22,0 \pm 2,0	DISM	NI	NI	NI	NI
10	-----	35,0 \pm 1,1	26,0 \pm 4,0	DISM	NI	NI	NI	NI
11	-----	30,0 \pm 2,0	23,3 \pm 1,2	DISM	NI	NI	NI	NI
12	-----	34,7 \pm 1,2	23,3 \pm 1,2	DISM	NI	NI	NI	NI
13	-----	26,7 \pm 3,1	25,3 \pm 5,8	DISM	NI	NI	NI	NI
14	-----	24,0 \pm 3,1	DISM	NI	NI	NI	NI	NI
Promedio halos (mm)	44,0 \pm 10,0	29,9 \pm 6,5	22,6 \pm 8,2	21,5 \pm 10,6	2,0 \pm 1,0	22,1 \pm 1,6	15,3 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0

NI: No inhibió el crecimiento

OTC: Oxitetraciclina

D.S: Desviación Standard

Posibles cepas resistentes

Promedio de halo de inhibición de crecimiento a la CIM más frecuente

CIM: Concentración Mínima Inhibitoria

DISM: disminución del crecimiento

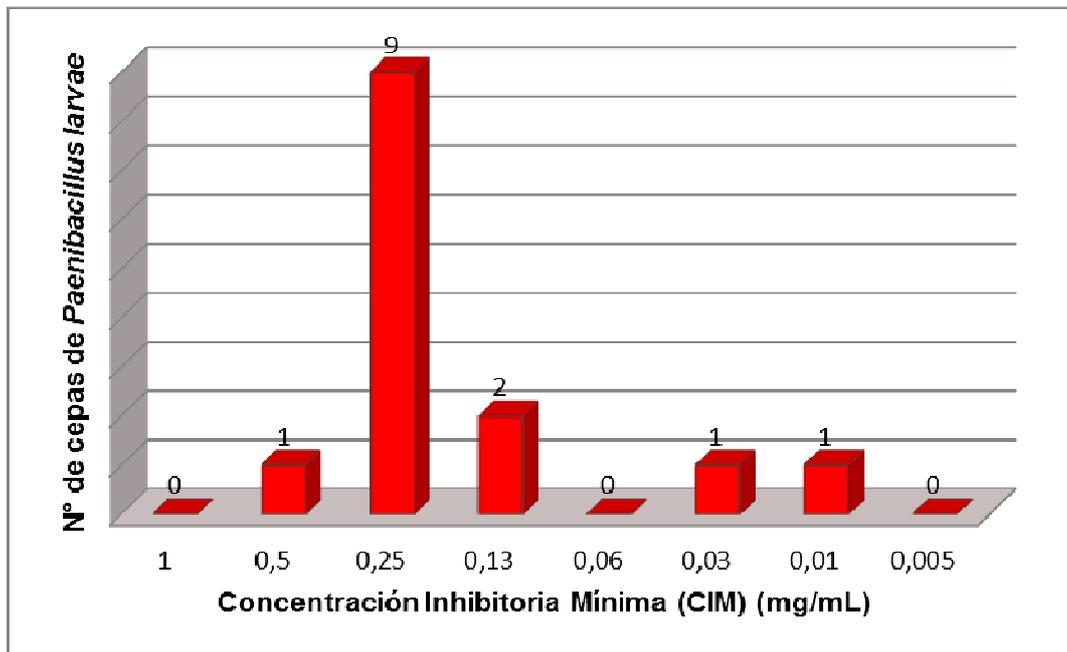


Gráfico 4.2. Frecuencia de Concentración Inhibitoria Mínima para OTC de las 14 cepas de *P. larvae*

Como se observa en la tabla y el gráfico 4.2, de las 14 cepas probadas la CIM más frecuente se encuentra a 0,25 mg/mL, con un tamaño de halo de inhibición del crecimiento promedio de $22,6 \pm 8,2$ mm. Es decir que para inhibir el crecimiento de *P. larvae* se necesitan como mínimo 0,25 mg/mL de OTC.

También se puede observar en la tabla 4.2, que de las 14 cepas de *P. larvae* probadas con OTC, se deduce que la cepa 4 fue la más sensible, debido a que tuvo una CIM de 0,01 mg/mL, con un halo de inhibición del crecimiento de $15,3 \pm 3,1$ mm de diámetro (Figura 4.5); mientras que la cepa 14 fue la que mostró mayor resistencia al antibiótico, porque se necesitó una alta concentración (0,5 mg/mL) para lograr inhibir su crecimiento, con un halo de inhibición de $24,0 \pm 3,1$ mm de diámetro (Figura 4.6).

Por otro lado, las cepas 2, 5, 7 y de la 9 a la 14 (señaladas con amarillo en la tabla 4.2), presentaron un fenómeno de disminución del crecimiento a una concentración más baja a la CIM, observándose el desarrollo de colonias dentro del halo de inhibición del crecimiento producido por el antibiótico, lo cual nos llevó a estimar en una posible resistencia adquirida por estas cepas; por lo tanto, se procedió a la recuperación mediante el aislamiento y su posterior identificación.

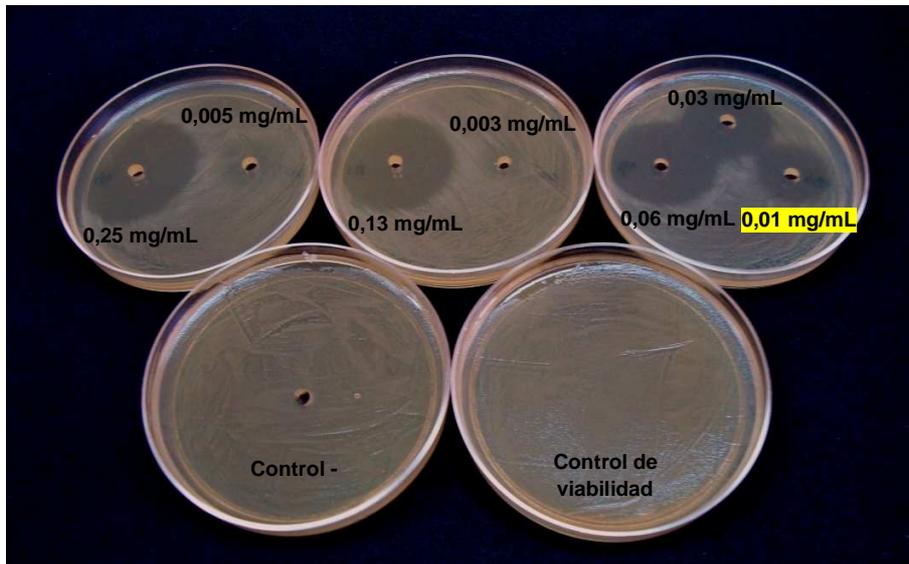


Figura 4.5. Actividad antimicrobiana de OTC frente a la cepa 4 de *P. larvae*.

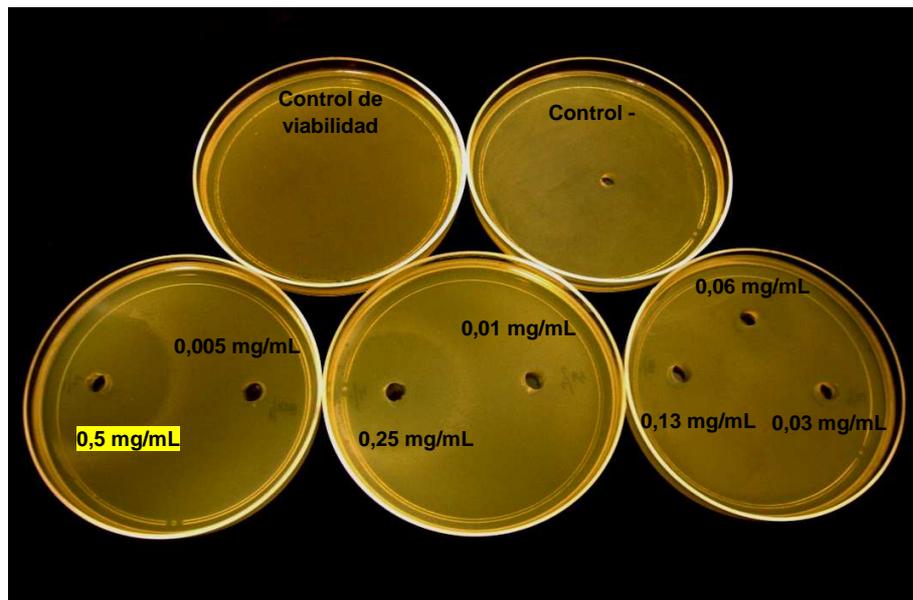


Figura 4.6. Actividad antimicrobiana de OTC frente a la cepa 14 de *P. larvae*.

4.4.2 Tilosina

Debido a que algunos resultados obtenidos con la OTC presentaron halos de inhibición del crecimiento pocos definidos, que se confundían con los halos de difusión del propio antibiótico, y además el crecimiento del microorganismo no era homogéneo (dificultando la medición y su posterior interpretación) previo a los ensayos de actividad antibacteriana de la TLS, se realizó una comparación de la técnica usando para la dispersión del inóculo hisopo estéril y espátula de Drigalsky. Para este ensayo se probó una de las cepas, utilizando agua como disolvente para preparar las diluciones de TLS (1mg/mL a 0,016 mg/mL). En este caso se emplearon altas concentraciones para conseguir halos de inhibición grandes, facilitando la visualización y la comparación. Los resultados se muestran en la tabla y el gráfico 4.3.

Tabla 4.3. Comparación técnica con espátula de Drigalsky y con hisopo

TLS mg/mL	Halos de inhibición de crecimiento (mm \pm D.S)		T del Test	
	espátula	hisopo		
1,00	44,0 \pm 4,2	51,0 \pm 1,0	2,81	\neq
0,50	43,7 \pm 1,2	49,3 \pm 1,2	5,72	\neq
0,25	39,7 \pm 1,5	48,0 \pm 1,7	6,35	\neq
0,13	36,0 \pm 1,0	41,7 \pm 1,5	5,50	\neq
0,06	33,3 \pm 1,2	39,3 \pm 1,2	6,13	\neq
0,03	29,3 \pm 2,1	34,7 \pm 2,5	1,24	=
0,01	26,0 \pm 1,0	30,0 \pm 1,0	4,90	\neq

= No existen diferencias significativas entre los promedio.

\neq Existen diferencias significativas entre los promedio

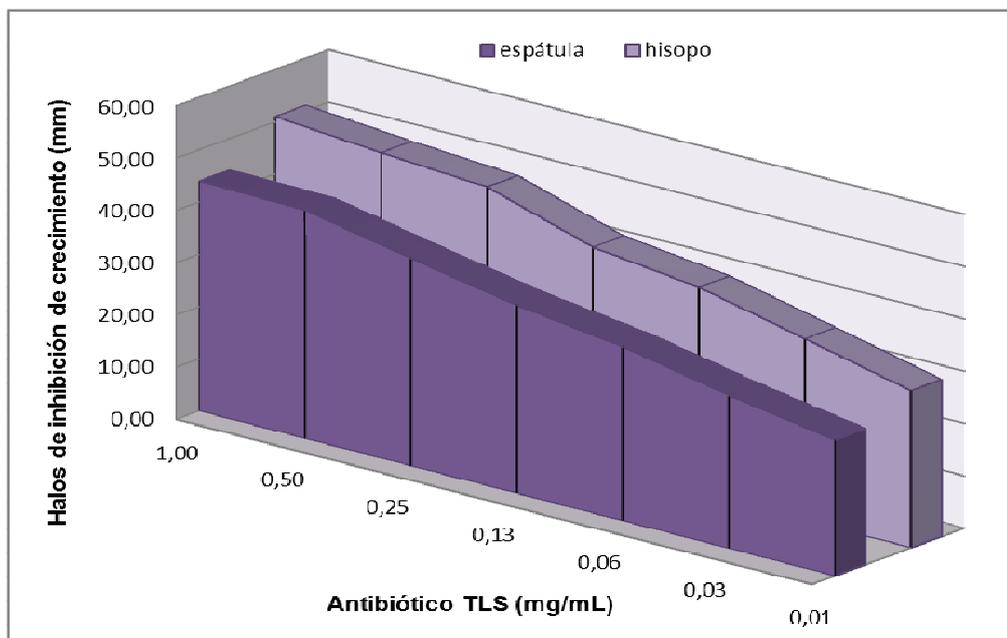


Gráfico 4.3. Comparación de uso de hisopo y espátula de Drigalsky para la dispersión del inóculo.

Como se observa en el gráfico 4.3, al usar hisopo los halos de inhibición del crecimiento fueron de mayor diámetro que usando espátula, sin embargo, usando ésta última los halos formados fueron más uniformes de una dilución a la otra. Luego de hacer un análisis estadístico con los datos aportados por la tabla 4.3, entre las medias muestrales de ambas técnicas de dispersión del inóculo, en cada concentración del ATB, se concluye con un nivel de confianza del 95% que los valores promedio de los halos de inhibición del crecimiento formados usando hisopo, presentan diferencias estadísticamente significativas, de los valores promedio de los halos formados con espátula. En base a estos resultados, se decidió hacer los siguientes ensayos de la CIM de TLS para las cepas, utilizando espátula de Drigalsky, ya que realizando el hisopado los halos no se observaban con claridad debido a los trazos marcados sobre el agar (Figura 4.7) y a que el volumen de inóculo sembrado no es siempre el mismo, por quedar parte absorbido en el hisopo, mientras el espatulado es menos variable (Figura 4.7).

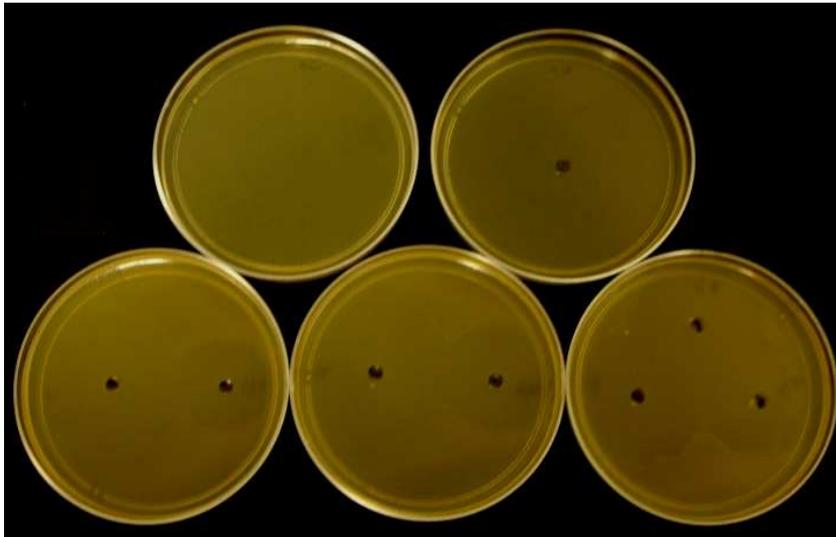
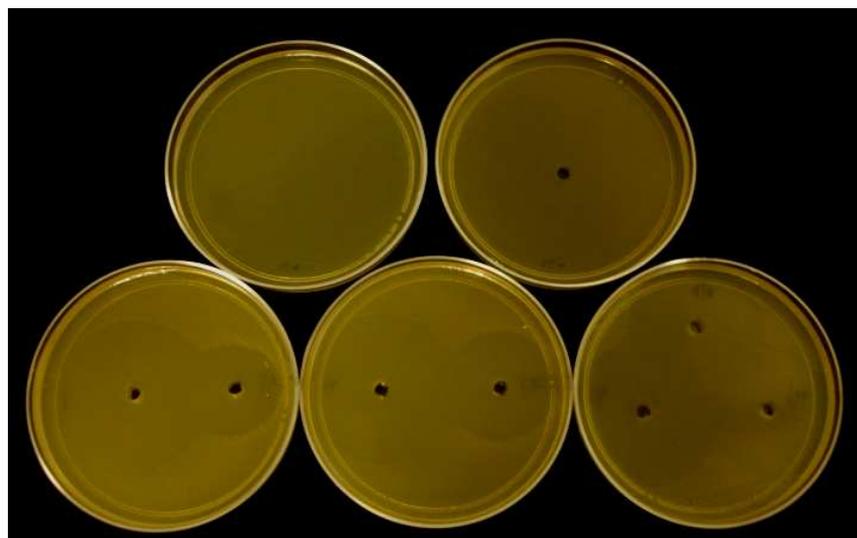


Figura 4.7. Técnica de difusión en pozo usando hisopo estéril.

Figura 4.8. Técnica de difusión en pozo usando espátula



Para el ensayo de la CIM de las cepas utilizando TLS, también se realizó la técnica con una cepa, utilizando dos tipos de disolventes del antibiótico (DMSO y agua destilada estéril) para compararlos y establecer cuál era el más adecuado para la disolución del mismo y su mejor difusión en el medio. Los resultados se detallan en la tabla y gráfico 4.4.

Tabla 4.4. Comparación de disolventes de la tilosina

TLS µg/mL - disolvente	Halos de inhibición de crecimiento (mm ± D.S)		T del test	
	agua	DMSO		
62,50	35,7 ± 1,2	38,0 ± 0,0	3,92	≠
31,25	30,0 ± 0,0	34,5 ± 0,7	22,61	≠
15,62	25,0 ± 0,0	27,5 ± 0,7	12,56	≠
7,81	NI	23,5 ± 0,7		
3,90	NI	15,0 ± 0,0		

≠ Existen diferencias significativas entre los promedio de los halos de inhibición del crecimiento formados usando DMSO y los formados usando AGUA como diluyente del antibiótico.

Como se observa en la tabla 4.4, luego de hacer un análisis estadístico entre las medias muestrales de ambos diluyente, en cada concentración del ATB, se concluye con un nivel de confianza del 95%, que los valores promedio de los halos de inhibición del crecimiento formados usando DMSO, presentan diferencias estadísticamente significativas, de los valores promedios formados utilizando agua. Además los halos formados usando DMSO presentaban una circunferencia más circunscripta y definida, lo cual hizo más fácil la medición. Posiblemente este solubiliza mejor la TLS que el agua, favoreciendo su difusión a través del medio sólido, permitiendo que pueda inhibirse el crecimiento de *P. larvae* con concentraciones más bajas del antibiótico.

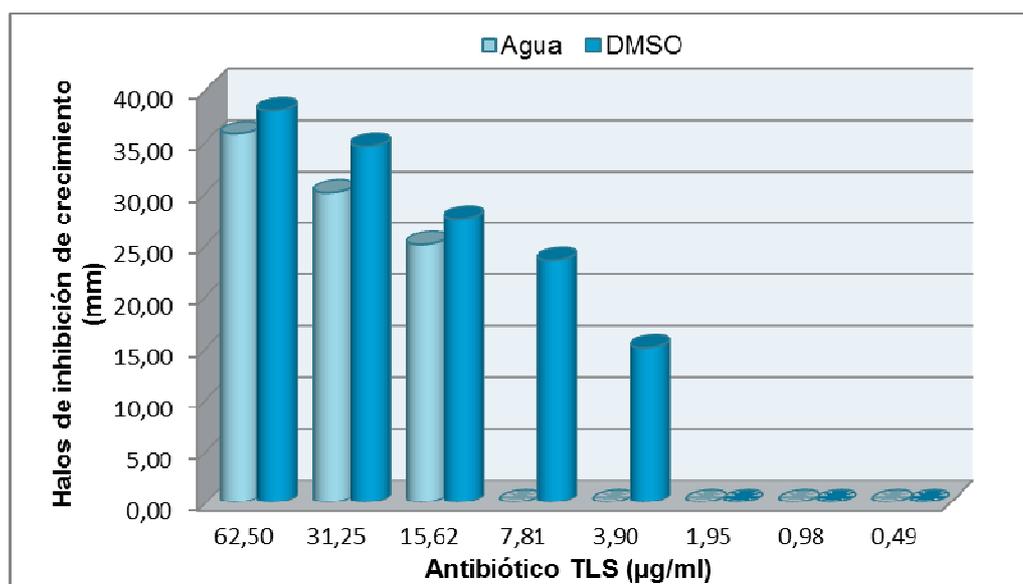


Gráfico 4.4. Comparación de usos de disolventes de la tilosina.

Posteriormente se realizó la técnica, con espátula de Drigalsky, para cada una de las cepas, con diluciones seriadas, usando DMSO como diluyente del antibiótico (0,0625 mg/mL a 0,0005 mg/mL) para asegurar el punto de corte, es decir, la concentración a la cual el antibiótico ya no inhibe el crecimiento, y de esta forma poder establecer la CIM. Los resultados se muestran en la tabla y el gráfico 4.5.

Tabla 4.5. Valores de CIM para TLS (mg/mL). Diámetros de zonas de inhibición del crecimiento (mm \pm D.S) de las 14 cepas de *P. larvae*.

Cepa - TLS mg/mL	0,06	0,03	0,016	0,008	0,004	0,002	0,001	0,0005
1	25,0 \pm 0,0	23,3 \pm 1,5	20,0 \pm 0,0	17,7 \pm 2,5	DISM	NI	NI	NI
2	38,0 \pm 0,0	34,5 \pm 0,7	27,5 \pm 0,7	23,5 \pm 2,1	DISM	NI	NI	NI
3	34,3 \pm 0,6	30,7 \pm 0,6	26,7 \pm 0,6	24,0 \pm 1,7	19,0 \pm 1,7	DISM	NI	NI
4	33,5 \pm 2,1	28,7 \pm 1,2	24,0 \pm 2,3	22,3 \pm 2,5	19,7 \pm 1,5	DISM	NI	NI
5	30,3 \pm 0,6	26,3 \pm 1,2	23,3 \pm 1,5	20,0 \pm 0,0	15,7 \pm 1,2	DISM	NI	NI
6	33,3 \pm 1,5	27,5 \pm 3,5	25,0 \pm 0,0	25,0 \pm 0,0	20,7 \pm 1,2	DISM	NI	NI
7	31,0 \pm 0,0	26,7 \pm 0,6	25,0 \pm 0,0	20,0 \pm 0,0	15,0 \pm 0,0	NI	NI	NI
8	36,5 \pm 0,7	33,3 \pm 2,9	30,0 \pm 0,0	25,0 \pm 0,0	20,0 \pm 0,0	DISM	NI	NI
9	30,0 \pm 0,0	25,0 \pm 0,0	21,0 \pm 1,1	20,7 \pm 1,2	13,7 \pm 3,2	10,7 \pm 1,2	NI	NI
10	36,0 \pm 1,4	31,3 \pm 1,5	26,3 \pm 1,2	26,7 \pm 1,5	22,0 \pm 1,7	18,7 \pm 1,2	11,2 \pm 1,2	NI
11	40,0 \pm 0,0	35,0 \pm 0,0	33,0 \pm 0,0	30,0 \pm 0,0	26,0 \pm 1,7	22,3 \pm 2,1	15,0 \pm 0,0	NI
12	28,0 \pm 3,5	24,0 \pm 0,0	20,0 \pm 0,0	14,7 \pm 1,2	10,0 \pm 0,0	4,0 \pm 0,0	NI	NI
13	26,7 \pm 1,2	22,7 \pm 1,2	20,0 \pm 0,0	14,0 \pm 0,0	DISM	NI	NI	NI
14	21,3 \pm 2,3	19,3 \pm 1,2	15,3 \pm 1,2	12,0 \pm 2,0	9,0 \pm 1,1	8,0 \pm 0,0	NI	NI
Promedio halos (mm)	31,8 \pm 5,3	27,7 \pm 4,7	24,1 \pm 4,6	21,1 \pm 5,2	17,1 \pm 5,4	12,7 \pm 7,6	13,1 \pm 2,7	0,0 \pm 0,0

NI: No inhibió el crecimiento

TLS: Tioleína

D.S: Desviación Standar

Posibles cepas resistentes

Promedio de halo de inhibición de crecimiento a la CIM más frecuente

CIM: Concentración Mínima Inhibitoria

DISM: disminución del crecimiento

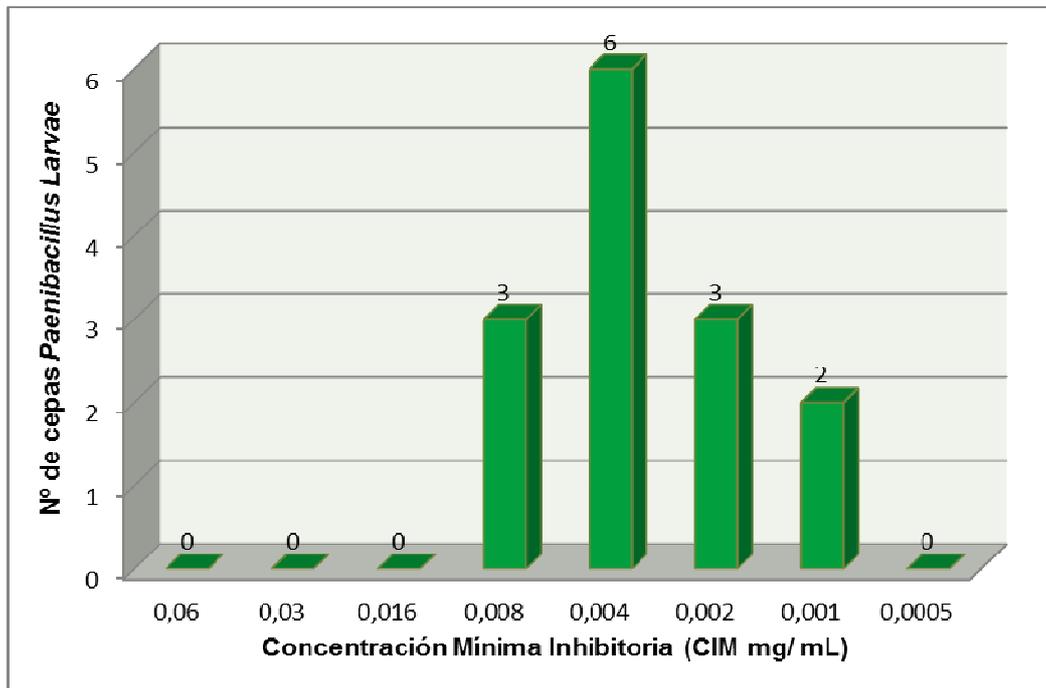


Gráfico 4.5. Frecuencia de Concentración Inhibitoria Mínima para TLS de las 14 cepas de *P. larvae*

Como se observa en el gráfico y la tabla 4.5, de las 14 cepas probadas la CIM más frecuente se encontró a 0,004 mg/mL, con un tamaño de halo de inhibición del crecimiento promedio de $17,1 \pm 5,4$ mm de diámetro. Por lo tanto, para inhibir el crecimiento de *P. larvae* se necesitan alrededor 0,008-0,001 mg/mL de TLS.

Asimismo, de acuerdo a los resultados observados en la tabla 4.5, de las 14 cepas de *P. larvae* la 1, 2, y 13 serían las más resistentes a TLS, ya que son las que presentan la CIM más alta (0,008 mg/mL), con un promedio de halo de inhibición de crecimiento de $21,1 \pm 5,2$ mm, es decir que concentraciones más bajas del antibiótico no son suficientes para inhibir el desarrollo del microorganismo. Por otro lado, se observa que las cepas 10 y 11 son las más sensibles, con un promedio de halo de inhibición de crecimiento de $13,1 \pm 2,7$ mm, siendo necesario solamente una concentración de 0,001 mg/mL de TLS para inhibir el crecimiento de *P. larvae*.

Además, las cepas 1 a 6, 8 y 14 (marcadas en la tabla 4.5 con color amarillo), mostraron el desarrollo de colonias dentro del halo de inhibición del crecimiento (Figura 4.8 y 4.9), manifestado como una disminución del crecimiento a la concentración inferior siguiente a la CIM. Esto sugirió el desarrollo de posibles cepas resistentes a TLS, por lo cual, se procedió a la recuperación mediante el aislamiento y la correspondiente identificación.

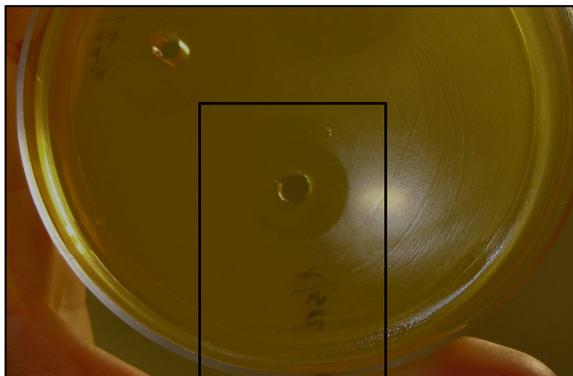


Figura 4.8. Desarrollo de colonias dentro del halo de inhibición del crecimiento.



Figura 4.9. Colonias posiblemente resistentes de una cepa de *P. larvae*.

En trabajos anteriores otros investigadores han determinado la CIM para *P. larvae* con oxitetraciclina y tilosina usando como controles las cepas de referencia *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Escherichia coli* (ATCC 25922), provistas por el Servicio de Antimicrobianos del Instituto Malbrán, Buenos Aires, Argentina. Además determinaron la CIM con otros antibióticos como tilmicosina y tetraciclina. Estos estudios se realizaron siguiendo la técnica de dilución en placa (NCCLS M31-A2, 2002; NCCLS M7-A6, 2003; Andrew, 2001) en medio sólido MYPGP (Dingman y Stahly, 1983) y utilizando como disolvente del antibiótico agua destilada estéril. Se ha establecido que para *P. larvae* un valor entre 0,01 y 0,015 mg/mL para la OTC se considera resistente y por debajo de 0,005 mg/mL sensible (Alippi, 1996). Para la TLS por encima de 0,032 mg/mL las cepas se consideran resistentes y una CIM menor a 0,008 mg/mL indica que la cepa es sensible (Alippi y col., 2006). Las cepas de referencia de *P. aeruginosa* presentaron CIM de 0,016 mg/mL y las de *E. coli* de 0,001 mg/mL para la OTC. Para la TLS, la CIM fue de 0,032 mg/mL. y de 0,128 mg/mL para *P. aeruginosa* y *E. coli*, respectivamente (Shryock y col., 1995). Cuando se probó tetraciclina frente a *P. larvae*, la CIM considerada como de resistencia correspondía a valores mayores a 0,016 mg/mL y de susceptibilidad a valores menores a 0,004 mg/ml. Cuando se enfrentó *P. larvae* a tilmicosina aquellas cepas con una CIM por encima de 0,008 mg/mL fueron consideradas resistentes y con una CIM por debajo de 0,002 mg/mL sensibles (Alippi y col., 2006)

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, se encuentran dentro de los parámetros de referencia de publicaciones de otros autores, respecto a *P. larvae* y a otros microorganismos, usando los mismos y otros antibióticos, tomando en cuenta el intervalo de valores de CIM (0,001 a 0,128 mg/mL).

En nuestros ensayos las cepas de *P.larvae* estudiadas presentaron valores de CIM para TLS comprendidos entre 0,008 y 0,001 mg/mL, por lo tanto, según el criterio establecido por Alippi (2006), son todas sensibles a este antibiótico. Mientras que los valores de CIM para OTC presentados por las cepas de *P.larvae*, se encuentran entre 0,01 y 0,5 mg/mL, por lo que son consideradas resistentes en base al criterio sugerido por Alippi (1996).

4.5. Análisis de posibles cepas resistentes

Las cepas aisladas a partir de las colonias desarrolladas dentro de los halos de inhibición del crecimiento, fueron identificadas como *P.larvae*, descartando así la posibilidad de ser contaminantes, sugiriendo un nuevo análisis de actividad antimicrobiana con los mismos antibióticos y una posterior comparación de los valores de CIM, respecto a los de las cepas originales de las cuales provienen.

A continuación se detallan los valores de CIM para OTC y TLS de las cepas posibles resistentes (Tablas 4.6 y 4.7).

4.5.1 Oxitetraciclina

Tabla 4.6. Valores de CIM para OTC.(mg/mL).Diámetros de zonas de inhibición del crecimiento (mm ± D.S) de las posibles cepas resistentes de *P. larvae*.

Cepas R-OTC mg/mL	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	0,01	0,005
2	22,3 ± 2,5	23,3 ± 2,9	18,0 ± 2,0	13,5 ± 2,1	NI	NI	NI	NI
5	35,3 ± 0,6	28,0 ± 1,0	24,0 ± 5,3	DISM	NI	NI	NI	NI
7	39,0 ± 3,6	35,0 ± 0,0	33,3 ± 2,9	30,0 ± 0,0	23,3 ± 2,9	DISM	NI	NI
9	37,5 ± 3,5	32,7 ± 4,0	29,7 ± 2,5	23,3 ± 2,9	19,0 ± 3,6	DISM	NI	NI
10	38,3 ± 2,9	34,3 ± 1,2	31,7 ± 2,9	29,0 ± 1,7	21,7 ± 2,9	DISM	NI	NI
11	30,0 ± 2,0	26,0 ± 1,7	25,3 ± 0,6	DISM	NI	NI	NI	NI
12	-----	DISM	NI	NI	NI	NI	NI	NI
13	45,7 ± 2,1	40,0 ± 0,0	38,0 ± 1,7	35,7 ± 4,0	26,7 ± 1,2	20,7 ± 1,2	ND	ND
14	35,7 ± 1,2	35,0 ± 0,0	30,0 ± 0,0	21,3 ± 1,2	DISM	NI	NI	NI

NI: No inhibió el crecimiento ND: No determinado

OTC: Oxitetraciclina D.S: Desviación Standar

■ CIM: Concentración Mínima Inhibitoria

■ DISM: disminución del crecimiento

De acuerdo a la tabla 4.6, las cepas 5 y 11 no resultaron resistentes como se sospechaba, ya que presentaron la misma CIM que las cepas originales y con un tamaño de halo de inhibición del crecimiento prácticamente idéntico. La CIM de la cepa 12 y 13 no pudieron ser determinadas, en la primera debido a que se probaron concentraciones del antibiótico más bajas que las necesarias para inhibir el desarrollo del microorganismo, y en caso de la segunda no se encontró el punto de corte con las concentraciones del antibiótico ensayadas. Las cepas 2, 7, 9, 10 y 14, presentaron una CIM menor que las cepas originales, por lo tanto, no serían resistentes. El fenómeno de desarrollo de colonias dentro del halo de inhibición del crecimiento, podría explicarse como la presencia de cepas que hayan adquirido resistencia a la OTC debido a una presión de selección, y que luego de los sucesivos repiques puedan haber revertido a la cepa salvaje, en caso de ser una resistencia debida a una mutación, o que hayan sufrido una pérdida del plásmido que lleva los genes de resistencia.

4.5.2 Tilosina

Tabla 4.7. Valores de CIM para TLS (mg/mL). Diámetros de zonas de inhibición del crecimiento (mm \pm D.S) de las posibles cepas resistentes de *P. larvae*.

Cepa R - TLS mg/mL	0,06	0,03	0,016	0,008	0,004	0,002	0,001	0,0005
1	29,0 \pm 1,4	26,0 \pm 2,8	20,0 \pm 0,0	16,0 \pm 2,8	12,0 \pm 2,8	6,0 \pm 0,0	NI	NI
5	22,0 \pm 0,0	20,0 \pm 0,0	14,0 \pm 0,0	12,0 \pm 0,0	8,0 \pm 0,0	NI	NI	NI
6	32,0 \pm 0,0	28,0 \pm 0,0	22,7 \pm 2,8	17,3 \pm 1,4	12,7 \pm 1,4	DISM	NI	NI
13	20,0 \pm 0,0	15,3 \pm 1,2	13,0 \pm 1,0	10,0 \pm 0,0	8,0 \pm 0,0	NI	NI	NI

NI: No inhibió el crecimiento

TLS: Tilosina D.S: Desviación Standar

■ CIM: Concentración Mínima Inhibitoria

■ DISM: disminución del crecimiento

Se puede observar en la tabla 4.7 que las cepas 5 y 6 mostraron halos de inhibición de crecimiento de menor tamaño que las cepas originales, sin embargo, tuvieron una CIM igual. Por otro lado, las cepas 1 y 13 presentaron una CIM menor que las cepas originales. Con lo cual podría concluirse que estas cepas no son resistentes a la TLS. De la misma manera que para OTC, se puede inferir que el fenómeno de desarrollo de colonias dentro del halo de inhibición del crecimiento, correspondería a la presencia de cepas mutantes resistentes a la TLS, que hayan revertido o a la adquisición de plásmidos con genes de resistencia que se hayan perdido, luego de los repiques.

El uso profiláctico o terapéutico de antibióticos en el tratamiento de la Loque Americana presenta una limitada efectividad, debido a la capacidad del patógeno de formar esporas altamente resistentes a agentes químicos o físicos (Hansen y Brodsgaard, 1999), manteniendo su capacidad de germinación cuando se le presentan las condiciones adecuadas (Haseman, 1961). El uso incorrecto de antibióticos también influye en el fracaso del tratamiento, porque favorece la generación de cepas de *P. larvae* resistentes, con la consiguiente complicación en la erradicación de la enfermedad en un apiario.

Además de los resultados obtenidos en esta investigación, ya existen informes sobre la aparición de cepas resistentes a OTC en Argentina y Estados Unidos (Alippi, 1996; Miyagi y col., 2000). La OTC pertenece a la familia de la tetraciclinas, y el mecanismo de resistencia de *P. larvae* podría ser el mismo para ambas, ya que se ha demostrado que existe una comprobada resistencia cruzada entre las tetraciclinas (Roberts, 1996; Roberts, 2005). Se conoce que las tetraciclinas ingresan a la bacteria atravesando la membrana celular mediante transporte activo, hasta alcanzar el sitio de acción, es decir, la subunidad ribosomal 30S donde se produce la unión para inhibir la síntesis proteica. Se han descrito algunos posibles sistemas de resistencia de *P. larvae*, como por ejemplo, la síntesis de enzimas inactivadoras y mecanismos de protección del ribosoma. Sin embargo, se cree que la principal resistencia de este microorganismo a las tetraciclinas puede deberse a la alteración del sistema de transporte activo, mediante bombas de eflujo dependientes de energía (Roberts, 1996). Existe una cierta promesa de identificar genes conservados vinculados con estos mecanismos de resistencia, para utilizarlos como marcadores genéticos y poder predecir el grado de resistencia en aislamientos específicos, mejorando el control del patógeno. Las proteínas de eflujo Tet, codificadas por los genes *tet*, y que están asociadas a membrana, expulsan tetraciclinas de la célula, disminuyendo su concentración intracelular.

En un estudio se amplificó por PCR, el gen *tet* K, uno de los determinantes de eflujo activo de bacterias Gram positivo, sólo se encontró un 5% de correlación entre la presencia del gen y las cepas de *P. larvae* resistentes a tetraciclina, por lo que aún no ha podido establecerse cuáles son los determinantes de resistencia a tetraciclina de este microorganismo (Alippi y col., 2007). Por otro lado, dado que algunos de estos genes *tet* residen en elementos genéticos móviles, y pueden intercambiarse entre bacterias (Roberts, 1996, Roberts, 2005), un análisis de ADN extra-cromosomal, mostró que todas las cepas *P. larvae tet* K-PCR positivas presentaban dos bandas de plásmidos (Alippi y col., 2007), sugiriendo que la resistencia puede ser epigenética en la naturaleza, es decir, modificaciones en la regulación de la expresión genética sin implicar cambios en la secuencia del ADN, específicamente a través de plásmidos (Adams y



col., 1998). Además, se reportó que algunas de las cepas *P. larvae* resistentes a tetraciclina eran capaces de transferir el determinante *tet K* a *Bacillus subtilis*, lo que sugiere que un mecanismo de conjugación es el que estaría involucrado en la transmisión del fenotipo tetraciclina-resistente (Alippi y col., 2007). Finalmente resulta clave conocer también, estos mecanismos por los cuales *P. larvae* adquiere resistencia para contribuir a predecir la eficacia de nuevos antibióticos alternativos (Kochansky y col., 2001).

Conclusiones

- Se logró identificar todas la cepas estudiadas, mediante pruebas sencillas de laboratorio, como *Paenibacillus larvae*.
- El medio de cultivo sólido MYPGP resultó altamente efectivo para determinar la CIM de los antibióticos ensayados frente a *P. larvae*, ya que permitió el crecimiento óptimo de este microorganismo y gracias a su coloración traslucida una adecuada lectura de los halos de inhibición.
- El diluyente adecuado para la oxitetraciclina fue agua destilada estéril, mientras que para la tilosina se usó Dimetilsulfóxido con óptimos resultados, ambos permitieron la buena difusión del antibiótico en el medio de cultivo sólido MYPGP, sin inhibir el crecimiento de *P.larvae*.
- Para el análisis de la actividad antibacteriana, el uso de la espátula de Drigalsky para la dispersión del inóculo, resulto ser más eficiente que el hisopo, presentando halos de inhibición del crecimiento más definidos.
- La cepa 4 fue la más susceptible y la 14 la más resistente a oxitetraciclina. Mientras que las cepas 10 y 11 fueron las más sensibles y la 1,2 y 13 las más resistentes frente a tilosina.
- Todas las cepas aisladas de las colonias desarrolladas dentro del halo de inhibición del crecimiento presentaron una CIM menos o igual a las cepas originales, frente a oxitetraciclina y a tilosina, concluyendo ser sensibles a ambos antibióticos.
- La tilosina resulto ser el antibiótico que presentó mayor actividad antibacteriana frente a todas las cepas, por lograr inhibir su crecimiento a menores concentraciones que la oxitetraciclina.



- La oxitetraciclina fue durante años el único antibiótico aprobado para el tratamiento de Loque Americana, sin embargo, su empleo en forma indiscriminada tanto para la prevención como para el control de la enfermedad ha generado una importante presión de selección favoreciendo la aparición de cepas bacterianas resistentes.
- Desde la aprobación del uso de tartrato de tilosina, la administración de este antibiótico podría ser una alternativa eficaz en la lucha contra la enfermedad, junto con otras pautas de manejo integrado, respetando las consignas clásicas del tratamiento.

Bibliografia

- **Adams, C.; Austin, B.; Meaden, P. y McIntosh, D. (1998).** Molecular characterization of plasmid-mediated oxytetracycline resistance in *Aeromonassalmonicida*. Appl. Environ. Microbiol. N°64, pp. 4194-4201.
- **Alanis Reyes, J.A. (2007).** Revisión bibliográfica sobre los antibióticos macrólidos y su interés en medicina veterinaria. Tesis Doctoral. Fac.Med. Vet. Zoot. U.M.S.N.H.
- **Alippi, A.M. (1990).** Técnicas de laboratorio para el aislamiento e identificación de *Bacillus larvae* White, agente causal de la Loque Americana. Comisión de Investigaciones Científicas, provincia de Bs. As. Serie difusión. CIC Año 2, N° 6.
- **Alippi, A.M. (1992).** Characterization of *Bacillus larvae* White, the causal agent of American foulbrood of honeybees. First record of its occurrence in Argentina. Revista Arg. Microbiol. N°24, pp. 67-72.
- **Alippi, A.M. (1995).** Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinean honeys by using a semi-selective medium. Microbiología Sem. N°11, pp. 343-350.
- **Alippi, A.M. (1996).** Caracterización de aislamientos de *Paenibacillus larvae* mediante tipo bioquímico y resistencia a oxitetraciclina. Rev. Arg. Microbiol. N°28, pp. 197-203.
- **Alippi, A.M.; Ringuelet, J.A.; Cerimele, E.L.; Re, M.S. y Henning, C.P. (1996)** Antimicrobial activity of some essential oils against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood disease. J Herbs Spices Med Plants. N°4, pp. 9-16.
- **Alippi, A.M.; Albo, G.N. (1998).** Enfermedades bacterianas de la etapa larval. Parte I. Gestión Apícola 2 N°7: 6-9; Parte II. Gestión Apícola 2 N°8, pp. 43-48; Parte III. Gestión Apícola 2 N°9, pp. 40-47.
- **Alippi, A.M. (1999).** Terramycin®: Is it losing its effectiveness against AFB? The Argentinian experience. XXXVI Apimondia Congress, Vancouver, Canadá, 12 al 17 de septiembre de 1999. Actas pp. 45-47.
- **Alippi, A.M.; Colin, M.E.; Ball, B.V. y Kilani, M. (1999).** Bacterial Diseases, pp. 31-59. In: Bee Disease Diagnosis. Options Méditerranéennes, Serie B: Etudes et Recherches. N°25. CIHEAM Publications, Zaragoza. España, pp.182.
- **Alippi, A.M.; Albo, G.N.; Cerimele, E.; Re, M.S. y De Giusti, M. (2001).** Loque Americana: Ensayos de campo para evaluar la efectividad de algunos aceites esenciales. Revista Vida Apícola N°108, pp. 41-46.
- **Alippi, A.M.; Reynaldi, F.J. y Spinelli, G. R. (2006)** Evaluación de antibióticos para el control de Loque Americana en colmenas de abejas melíferas. Tesis Doctoral. Unidad de Bacteriología del CIDEFI, Fac. Cs. Agr. y Nat. UNLP.

- **Alippi, A.M.; Lopez, A.C; Reynaldi, F.J; Grasso, D. H. y Aguilar, O. M. (2007).** Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood (AFB) disease in honeybees. *Vet. Microbiol.* N° 125, pp. 290-303.
- **Andrews, J.M. (2001).** Determination of Minimum Inhibitory Concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* N°48 (Suppl. 1), pp. 5-16.
- **Antúnez, K.; Anido, M.; Evans, J.D. y Zunino, P. (2010).** Secreted and immunogenic proteins produced by the honeybee bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Vet. Microbiol.* N°141, pp. 385–389.
- **Ash, C.; Priest, F.G. y Collins, M.D. (1993).** Molecular identification of ribosomal RNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test - proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Leeuwenhoek* N° 64, pp. 253–260.
- **Bailey, W.R; Scott, E.G; Forbes, B.A.; Sahn, D.F. y Weissfeld, A.S. (2009).** Diagnóstico microbiológico. 12 th edición. Ed. Médica Panamericana, Parte II. Principios generales de la microbiología clínica. Cap. 11 principios de la acción y de la resistencia de los antimicrobianos, pp. 179-181.
- **Bailey, L. (1984).** Bacterias. *Patología de las Abejas.* Cap. 4, pp. 28-43. Ed. Acribia, Zaragoza.
- **Bailey, L. y Ball, B.V. (1991).** *Honey Bee Pathology.* Academic Press; London, UK, 2nd Edición pp.193.
- **Baker, F. J. (1970).** *Manual de Técnica Bacteriológica.* Ed: Acribia, España.
- **Bambrick, J.F. y Rothembuhler, W.C. (1961).** Resistance to American foulbrood in honey bees. IV. The relationship between larvae age at inoculation and mortality in a resistant and in a susceptible line. *J. Insect. Pathol.* N°4, pp. 381-390.
- **Bamrick, J.F. (1964).** Resistance to American foulbrood in honey bees. V. Comparative pathogenesis in resistant and susceptible larvae, *J. Insect Pathol.* N°6, pp. 284-304.
- **Bedascarrasbure, E.R. y Palacios, M.A. (1998).** Orígenes de la abeja melífera. *Rev. Super Campo: de la huerta a la estancia.* Julio .Editorial Perfil S. A.
- **Bedascarrasbure, E.R.; Dieguez, S.; Libonatti, C.y Soraci, A. (2002).** Metodología analítica para detección de residuos de oxitetraciclina en miel. *Rev. Invest. Agrop. (RIA), INTA Bs.As.* Abril vol.31, N°1, pp.159-165.
- **Bernal del Nozal, J. (2007).** Tiamulina y tilosina como tratamientos alternativos contra la Loque Americana, análisis por HPLC. Tesis Doctoral. Fac. Ciencias. Universidad Valladolid.
- **Bogdanov, S. (1997).** Antibacterial substances in honey. *Swiss Bee Research Center.*

- **Bogdanov, S. (1999).** Honey quality, methods of analysis and international regulatory standards: Review of the work of the International Honey Commission, *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* N° 90 pp. 108-125.
- **Brock, T.D.; Madigan, M.T.; Martinko, J.M. y Parker, J. (2004).** *Biology of Microorganisms* Ed. 10th, Prentice-Hall Inc. USA, Cap. 20 pp.698-708.
- **Cabello, T. (2007).** Historia e importancia de la apicultura. Curso Académico. Escuela Superior de Ingeniería. Universidad de Almería.
- **Calderone, N.W.; Shimanuki, H. y Allen Wardell, G. (1994).** An in vitro evaluation of botanical compounds for the control of the honeybee pathogens *Bacillus larvae* and *Ascosphaera apis*, and the secondary invader *B. alvei*. *J. Essent. Oil Res.* N°6, pp. 279-287
- **Casteels, P.; Ampe, C.; Jacobs, F.; Vaeck, M. y Tempst, P. (1989).** Apidaecins: antibacterial peptides from honey bees. *EMBO J.* N° 8, pp. 2387–2391.
- **Código Alimentario Argentino. (1994).** Res. GMC 15 / 94. Reglamento Técnico Merco Sur de Identidad y Calidad de Miel.
- **Cooper, R.A; Molan, P.C. y Harding, K. (2002).** The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wound. *J. Appl. Microbiol.* N°93, pp. 857-863.
- **De Pooter, H.; Aboutabl, E. y El Shabrawy, A. (1995).** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of leaf, stem and rhizome of *Alpinaspeciosa* (J.C. Wendl.) K. Schum. Grown in Egypt. *Flavour Fragrance J.* N°10, pp. 63-67.
- **Dingmann, D.W. y Stahly, D.P. (1983).** Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Appl. Environ. Microbiol.* N°46 pp. 860–869.
- **Estrada, H.; Gamboa, M.M.; Chaves, C. y Arias, M.L. (2005).** Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteridis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*. *Sociedad Latinoamericana de Nutrición.* Vol. N°2, pp. 55.
- **Evans, J.D. (2003).** Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* N°83, pp. 46-50.
- **Faucon, J.P.; Colin, M.E. y Giauffret, A. (1980).** Activite in vitro de l'hypochloritesur les spores de *Bacillus larvae*. *Rev. Med. Vet.* N°131, pp. 707-710.
- **FDA (Food and Drug Administration) (1998).** App.3.73. En *Bacteriological Analytical Manual*. Ed 8° AOAC International, Gaithersburg, USA, pp. 581.
- **Genersch, E. (2010).** Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

- **Genersch, E.; Ashiralieva, A. y Fries, I. (2005).** Strain and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees. *Appl. Environ. Microbiol.* N°71, pp. 7551–7555.
- **Goodwin, M. y Van Eaton, C. (1999).** Elimination of American Foulbrood without the use of drugs. A practical manual for beekeepers. National Beekeepers Association of New Zealand, New Zealand, 78.
- **Hansen, H. y Brodsgaard, C. (1999).** American foulbrood, a review of its biology, diagnosis and control *Bee World* N°80, pp. 5-23.
- **Haseman, L. (1961).** How long can spores of American Foulbrood live? *Am. Bee J.* N°101, pp.298-299.
- **Heyndrickx, M.; Vandemeulebroecke, K.; Hoste, B.; Janssen, P.; Kersters, K.; De Vos, P.; Logan, N.A.; Ali, N. y Berkeley, R.C. (1996).** Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash y col, 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash y col., 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* N°46, pp. 270-279.
- **Hitchcock, J.D.; Moffet, J.O.; Lockett, J.J. y Elliot, J.R. (1970).** Tylosin for the control of AFB disease in honey bees. *J. Econ. Entomol.* N°63, pp. 204-207.
- **Hornitzky, M.A.Z. (1998).** The spread of *Paenibacillus larvae* subsp *larvae* infections in an apiary. *J. Apic. Res.* N°37, pp.261-265.
- **Julian, G.S. y Bulla, L.A.J. (1971).** Physiology of spore forming bacteria associated with insects. *J. Bacteriol.* N°108, pp.828-834.
- **Kochansky, J.; Knox, D.A.; Feldlaufer, M. y Pettis, J.S. (2001).** Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and resistant *Paenibacillus larvae*. *Apidologie* N°32, pp. 215– 222.
- **Koneman, E.W. (1999).** Diagnóstico Microbiológico; Ed.5º. Médica Panamericana S. A.
- **Lamonica, J.M.; Wagner, M.; Eschenbrenner, M.; Williams, L.E.; Miller, T.L.; Patra, G. y DelVecchio, V.G. (2005).** Comparative secretome analyses of three *Bacillus anthracis* strains with variant plasmid contents. *Infect. Immun.* N°73, pp. 3646–3658.
- **Manual de enfermedades apícolas (2009).** IICA-PRONAGRO-SAG - Cap. II.
- **Manual de la OIE (2004).** Sobre animales terrestres. Cap. 2.9.2. pp. 1042-1049.
- **Marconi, C.R. (1998).** Implementación de sistemas de mejoramiento de la calidad en un establecimiento apícola. Tesina de grado. UNCPBA. FCV. Tandil, pp.10-11.

- **Matheson, A. y Reid, M. (1992).** Strategies for the prevention and control of AFB. Parts I, II and III. Am. Bee. J. N°132, pp. 399-402; N°133, p p.471-475; N°134, pp.534-547.
- **Matheson, A. (1986).** Preserving hive parts with hot wax. Beekeeper´s Annual, pp, 115-117.
- **Mendoza Patiño, N. y Campos Sepúlveda, A.E. (2008).** Actualidades Farmacológicas. Tetraciclinas. Rev. Fac. Med. Universidad Nacional Autónoma de México. N°51, pp. 29-32.
- **Miyagi, T.; Peng, C.Y.S.; Chuang, R.Y.; Mussen, E.C.; Spivak, M.S. y Doi, R.H. (2000).** Verification of oxitetracycline-resistant American Foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. J. Invertebr. Pathol. N°75, pp. 95-96.
- **Moneto, A.; Francavilla, A.; Manca, L.; Siravegna, I M. y Fernandez, R. (1999).** Study of Botulinum Spores in Honey. Anaerobe N°5, pp.185 y 186.
- **Moore, B. (2004).** Biofunctional and moonlighting enzymes: lighting the way to regulatory control. Trends in Plant Science N°9, pp. 221–228.
- **Morse, R.A. y Calderone, N.W. (2000).** The value of honey bee pollination the United States. Bee Culture N°128, pp. 1–15.
- **Morse, R.A. y Shimanuki, H. (1990).** Summary of control methods. In Honey bee pests, predators and diseases. Ed. 2º, Morse R.A and Nowog rodzki R. Cornell University Press, USA, pp. 341-361.
- **Murray P.R.; Rosenthal K.S. y Pfaller M.A. (2009).** Microbiología Médica. Ed. 6º. Elsevier. Cap 20, Antibióticos. pp. 205-206.
- **NCCLS Document M31-A2 (2002).** Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved Standard. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Wayne, Pennsylvania, USA.
- **NCCLS Document M7-A6 (2003).** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically Approved Standard-Sixth Edition. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).
- **Neuendorf, S.; Hedtke, K.; Tangen, G. y Genersch, E. (2004).** Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen. Microbiol. N°150, pp.2381–2390 .
- **Peng, C.Y.S., Mussen, E.; Fong, A.; Cheng, P.; Wong, G. y Montague, M.A. (1996).** Laboratory and field studies on the effects of the antibiotic tylosin on honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Development and prevention of AFB disease. J. Invertebr. Pathol. N°67, pp. 65-71.

- **Ramirez, J.; Calderón, R.; Ortiz R. y Sanchez L. (2003).** Manual de Apicultura. Programa de Publicaciones e Impresiones de la Universidad Nacional. Costa Rica. Tomo I: pp 44-77.
- **Rang, H.P.; Dale, M.M. y Ritter, J.M. (2000).** Farmacología. Ed. 4°. Harcourt.
- **Rinderer, T. y Rothenbuhler, W.C. (1969).** Resistance to American Foulbrood in honeybees. Comparative mortality of queen, worker and drone larvae. J. Invertebr. Pathol. N°13, pp.81-86.
- **Roberts, M. C. (1996).** Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. FEMS Microbiol. Rev. N°19, pp. 1-24.
- **Roberts, M. C. (2005).** Update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS Microbiol. Lett. N°245, pp. 195-203.
- **Rodilla, C.F.; Canós Cabedo, M.; Ferrer Gómez, C. y Giner Almaraz, S. (1995).** Nuevos macrólidos ¿superan a eritromicina? Laboratorio de salud pública. Servicio de Microbiología. Hospital La Fe. Valencia.
- **Rodríguez Montoya, M.C. (2003).** Composición, calidad y consumo de miel en España. Los principales riesgos asociados a la miel son de origen microbiológico o debido al proceso de extracción y manipulación. Observatorio de seguridad alimentaria de la Universidad autónoma de Barcelona.
- **Rothenbuhler, W.C. (1964).** Behavioral genetics of nest cleaning in honeybees. IV. Responses of F₂ and back cross generation to disease-killed brood. Am. Zool. N° 4, pp. 111-123.
- **Salamanca Grosso, G.; Hema Rojas, C.; Moreno, I. y Luna, A. (2001).** Características microbiológicas de las mieles tropicales de *Apis mellifera*. Galería Apícola virtual. Apiservices.
- **Sanchezde Rivas, C. (2006).** ¿Antibióticos, ayer, hoy y mañana? Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Rev. Química Viva N°2, pp. 69 y 70.
- **Shryock, T. R.; White, D.W.; Werner, C.S. y Staples, J.M. (1995).** Proposed Quality Control Guidelines for Antimicrobial Susceptibility Test Using Tilmicosin. J. Clin. Microbiol. N°33, pp. 331-335.
- **Tiziana Baratta, M.; Dorman, D.; Deans, S.; Figueiredo, C.; Barroso, J. y Ruberto, G. (1998).** Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. Flavour Fragrance J. N°13, pp. 235-244.



- **Woodrow, A. y Holst, E. (1942).** The mechanism of colony resistance to American fouldbrood. J. Econ. Entomol. N°35, pp. 327-330.

- **www.agro.uba.ar**
(www.agro.uba.ar/apuntes/no_3/apicultura.htm).
- **www.argentinatradenet.gov.ar**
(www.argentinatradenet.gov.ar/sitio/estrategias/INFORME SECTORIAL MIEL 2010).
- **www.ars.usda.gov**
(www.ars.usda.gov/is/espanol/pr/2005/051219.es.htm)
- **www.made-in-argentina.com**
(www.argentina.com/alimentos/jaleasymermeladas/temasrelacionados/miel.htm)
- **www.inta.gov.ar**
(www.inta.gov.ar/chubut/info/documentos/apicultura/pdfs/manual_apicola_2004)
- **www.inta.gov.ar**
(www.inta.gov.ar/info/cadena/miel/Introduccion_Sector_Apicola_Argentino_2008)