

Comunicación

Evaluación de la resistencia de cepas de *Bacillus alvei* a cinco antibióticos utilizados para el control de las loques americana y europea.

Adriana M Alippi*

Cátedra de Fitopatología, Facultad de Cs. Agrarias y Forestales, UNLP, CC 31, 1900 La Plata, Argentina.

* Investigadora de la Comisión de Investigaciones científicas (CIC) de la Prov de Bs As.

Recibido 18 de febrero de 1992. aceptado 28 de octubre de 1992.

Palabras clave: Loque americana- Loque europea- *Bacillus alvei*- Antibióticos- *Apis mellifera*.

INTRODUCCION

Las loques americana y europea son las enfermedades de origen bacteriano más importantes que afectan a la cría de las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.).

Luego de la detección de la loque americana en la Argentina (Alippi, 1992a; Alippi y Nuñez, 1991), comenzaron a manifestarse casos de patologías dudosas cuyos síntomas se asemejaban a los observados en estadios finales de larvas afectadas por la loque europea (Alippi, 1991a; Bailey, 1984).

En las muestras de restos larvales con sintomatología confusa, examinadas con microscopio óptico y electrónico de barrido (Alippi, 1991b) se observaron esporas de *Bacillus larvae* White, agente causal de la loque americana junto con esporas del saprobio *Bacillus alvei* Chesire and Cheyne y, ocasionalmente, se visualizaron las formas vegetativas de *Melissococcus pluton* (White) Bailey, agente causal de la loque europea, asociadas con esporas de *Bacillus alvei*.

Ambas loques se controlan de modos

diferentes: en el caso de la americana se recomienda la quema total del material contaminado (Gochnauer *et al.*, 1975; Hornitzky and Wilson, 1989) o la desinfección del mismo mediante irradiación Gamma (Hornitzky and White, 1983) y para la europea, se aconsejan diversas prácticas de manejo por parte del apicultor (Bailey, 1984) o el tratamiento de las colmenas afectadas con agentes antimicrobianos (Gochnauer *et al.*, 1975). A pesar de estas diferencias, en la Argentina se utilizan antibióticos para el control de ambas enfermedades, muchas veces en forma preventiva, con el consecuente riesgo que las bacterias desarrollen resistencia a los mismos si su empleo no es el adecuado.

En ese sentido, el objetivo del presente trabajo ha sido determinar si la presencia casi constante de *B. alvei* en las muestras analizadas se debía a una resistencia adquirida por dicha especie a los antibióticos de uso común para el control de las loques europea y americana.

MATERIALES Y METODOS

Las cepas bacterianas utilizadas se aislaron de muestras de restos larvales, provenientes de colmenas con sintomatología confusa entre loque americana y europea (Alippi, 1992b) y que habían sido tratadas con oxitetraciclina en la temporada anterior. Los aislamientos se efectuaron a partir de suspensiones de restos larvales (escamas o material viscoso) en tubos con 4 ml de agua destilada estéril, los que fueron calentados a 60°C durante 15 min. Una alícuota de cada suspensión se diluyó y se sembró en estrías en agar nutritivo (Merck[®]) o agar-cerebro-corazón (Merck[®]) (Alippi, 1991b).

Los cultivos de *B. alvei* se identificaron mediante: reacción de Gram, morfología de esporas y esporangios, catalasa, reacción de Voges-Proskauer (VP), determinación de pH en caldo de VP, hidrólisis de almidón y gelatina, supervivencia luego de 10 pasajes en caldo nutritivo (CN), utilización de citrato de sodio, producción de ácido a partir de D-manitol, reducción de nitratos a nitritos, descomposición de tirosina, reacción en leche tornasolada, descomposición de caseína, desarrollo en 7% de NaCl, desarrollo anaeróbico y tinción de glóbulos lipídicos (Gordon *et al.*, 1973; Sneath, 1984; Harmon *et al.*, 1991).

Para evaluar la resistencia a los agentes antimicrobianos, se seleccionaron cepas de *B. alvei* aisladas de colmenas con antecedentes de loque europea y provenientes de 4 localidades de la Prov. de Bs. As.: Lobos, Gral. Arenales, Tandil y Tres Arroyos. Las 4 cepas seleccionadas se probaron contra 5 antibióticos mediante la técnica de difusión en placas con la droga incorporada en discos de papel de filtro estériles de 6 mm de diámetro (Knox *et al.*, 1977). El medio utilizado fue agar-cerebro-corazón (Merck[®]) a razón de 20 ml/caja y la concentración bacteriana del orden de 10^7 cel/ml.

Los biocidas probados fueron:

oxitetraciclina HCl a una concentración de 17,8 µg/disco de papel de filtro; tilosina -como tartrato- (25 µg/disco); virginiamicina 25% p.a. (200 µg/disco); eritromicina -como etil succinato- (6,2 µg/disco) y una fórmula comercial compuesta por una mezcla de pirimidina 1% p.a., sulfanilamida 5% p.a., sulfaquinoxalina 1,26% p.a. y furaldehído-semicarbazona 5% p.a. (250 µg/disco) (PSSF). Las concentraciones utilizadas se calcularon mediante una relación entre la dosis por colmena (en µg de principio activo) y el número total de abejas adultas de la misma (Wilson, 1962; Hitchcock *et al.*, 1970; Knox *et al.*, 1977).

Las cajas sembradas se incubaron a 35-36°C durante 48 h al cabo de las cuales se midieron los halos formados (mm de radio de inhibición del crecimiento bacteriano).

RESULTADOS

Las cepas identificadas tentativamente como *B. alvei* resultaron: Gram (+) o Gram-variables, con esporas elipsoidales en posición central o subterminal y disposición en empalizada, catalasa (+), VP (+), con pH en VP de 4,6-4,8, hidrolizaron almidón y gelatina, sobrevivieron luego de 10 pasajes por CN, no utilizaron citrato ni acidificaron D-manitol, clarificaron caseína, no redujeron nitratos ni desarrollaron en 7% de NaCl, fueron capaces de desarrollar en anaerobiosis, fueron negativas para tinción lipídica y presentaron resultados variables para tirosina y leche tornasolada.

Para el análisis estadístico de los resultados se empleó un diseño completamente aleatorizado balanceado con 5 tratamientos y 4 repeticiones por tratamiento. Previamente se efectuó un ensayo en blanco para determinar que el testigo (agua destilada estéril) no ejercía control alguno.

Se realizó un análisis de la varianz para

probar la hipótesis de igualdad de efecto promedio de los 5 antibióticos. Dado que la hipótesis fue rechazada ($F=435,41^{**}$) se procedió a comparar las medias de los tratamientos mediante el test de Tukey a un nivel de probabilidad del 5%. De acuerdo con los resultados obtenidos, se llegó a la conclusión que los antibióticos probados presentaron variaciones en cuanto al grado de inhibición del desarrollo bacteriano (Fig. 1).

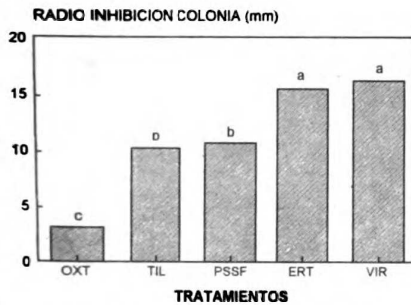


Figura 1: Evaluación "in vitro" de cinco antibióticos para el control de *B. alvei*. Los valores con la misma letra (promedio de 4 repeticiones) no difieren entre sí en forma significativa ($P=0,05$) de acuerdo con la prueba de Tukey.

OXT= oxitetraciclina HCl; **TIL**= tilosina tartrato; **PSSF**= pirimidina + sulfanilamida + sulfaquinoxalina + furaldehído semicarbazona; **ERT**= eritromicina; **VIR**= virginiamicina

Sensitivity of *Bacillus alvei* to five antibiotics. Values followed by the same letter (mean of 4 replications) are not significantly different at $P=0,05$ according to Tukey's test. Mean radius of inhibition zone (in mm) vs. treatments (antibiotics).

OXT= oxytetracycline hydrochloride; **TIL**= tylosin tartrate; **PSSF**= pyrimidine + sulphanylamide + sulphaquinoxaline + semicarbazone; **ERT**= erythromycin; **VIR**= virginiamycin

La oxitetraciclina HCl indujo a la formación de halos de inhibición de menor tamaño que en los restantes casos (Fig. 1) lo cual implica una menor eficiencia comparada con el resto a las concentraciones ensayadas ($DMS\ 0,05=1,1258$).

Las 4 cepas pertenecientes a *B. alvei* resultaron resistentes a oxitetraciclina, sus-

ceptibles a tilosina y PSSF y muy susceptibles a eritromicina y virginiamicina.

Paralelamente se realizó un análisis de varianza no paramétrico (Test de Kruskal-Wallis) seguido por un test de comparaciones múltiples, arribándose a la misma conclusión con relación a la menor efectividad de la oxitetraciclina.

DISCUSION

Los resultados aquí obtenidos coincidieron con los detallados en la bibliografía consultada (Gordon *et al.*, 1975; Sneath, 1984; Hornitzky and Wilson, 1989; Hornitzky and Karlovskis, 1989).

En la Argentina se emplea comúnmente el clorhidrato de oxitetraciclina para el control de las loques americana y europea y, en menor escala el compuesto comercial PSSF para la europea. Con relación a tilosina y eritromicina han sido recomendadas en EE.UU. para el control de la loque americana (Hitchcock *et al.*, 1970) y la europea (Wilson, 1962) respectivamente, pero en la Argentina aún no se han aplicado comercialmente.

Se ha demostrado que las colmenas infectadas con la loque americana no se curan completamente con oxitetraciclina y los síntomas de la enfermedad se manifiestan nuevamente hasta 1 año después de efectuado el tratamiento (Oldroyd *et al.*, 1989). Oldroyd y colaboradores (1989) también concluyeron que las curas con oxitetraciclina, que normalmente se emplean para la prevención de la loque europea, enmascaraban los síntomas de la loque americana, dificultando el correcto diagnóstico de ambas enfermedades. Casos similares fueron observados en la Prov. de Buenos Aires (De Jong, com. pers., 1990).

En un estudio previo, sobre un total de 144 muestras analizadas, se identificó a *B. alvei* en el 93,75% de las mismas y a *B. alvei* junto con *B. larvae* en un 45,93% (Alippi,

1992b).

Los resultados aquí obtenidos permitieron demostrar que la incidencia tan alta de *B. alvei* en los apiarios argentinos estaría en relación directa con su alto grado de resistencia hacia la oxitetraciclina, el antibiótico de mayor difusión en el país para el control de las loques europea y americana.

Esto explicaría la existencia de ciertos cuadros de sintomatología confusa entre ambas enfermedades, que serían ocasionados por una multiplicación exagerada de *B. alvei* en los restos larvales.

Restaría por establecer, mediante estudios posteriores, si la resistencia adquirida por

B. alvei al clorhidrato de oxitetraciclina se debe a una transferencia de plásmidos o a otro mecanismo que hubiera permitido la selección de cepas resistentes.

AGRADECIMIENTOS

A la Ing Agr E Urtubey por el diseño y análisis estadístico de los resultados y al Sr A Campana por su valiosa asistencia técnica. Esta investigación fue subsidiada por la CIC (Prov. Bs. As) y por la IFS (Suecia, Grant N° B/1859-1).

BIBLIOGRAFIA

- Alippi Adriana M (1991a) Diagnóstico diferencial de loque americana y europea. *Industria Apícola* 6: 22-29
- Alippi Adriana M (1991b) A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera*, in Argentina. *J apic Res* 30 (2): 75-80
- Alippi Adriana M (1992a) Characterization of *Bacillus larvae* White the causative agent of American foulbrood of honey bees. First record of its occurrence in Argentina. *Rev Arg Microbiol*. En prensa: 24 (2)
- Alippi Adriana M (1992b) Detección de *Bacillus larvae* en poblaciones mixtas de esporas bacterianas a partir de restos larvales. *Microbiología SEM* 8:115-118
- Alippi Adriana M y L Nuñez (1991) La loque americana en Argentina. *Vida Apícola* 49: 20-24
- Bailey L (1984) Patología de las abejas. Acribia, Zaragoza.
- Gordon Ruth L, WC Haynes and CH-N Pang (1973) The genus *Bacillus*. USDA Handbook N° 427
- Gochnauer TA, B Furgala and H Shimanuki (1975) Enfermedades y enemigos de la abeja melífera. En: La colmena y la abeja melífera. Ed Dadant e hijos Hemisferio Sur, Uruguay 791-848
- Harmon SM, DA Kautter and G Lancette (1991) Lipid globule staining to aid in differentiating *Bacillus* species. *J Assoc of Anal Chem* 74: 649-651
- Hitchcock JD, JO Moffett, JJ Lockett and JR Elliot (1970) Tylosin for control of American Foulbrood disease in honey bees. *J Econ Entomol* 63: 204-207
- Hornitzky MAZ and S Karlovskis (1989) A culture technique for the detection of *Bacillus larvae* in honey bees. *J apic Res* 28: 118-120.
- Hornitzky MAZ and B White (1983) The commercial application of Gamma radiation in the control of American Foulbrood. *Am Bee J* 123: 652-653.
- Hornitzky MAZ and SC Wilson (1989) A system for the diagnosis of the major bacterial brood diseases of honey bees. *J apic Res* 28: 191-195.
- Knox DA, H Shimanuki and DM Caron (1977) Susceptibility of *B. larvae* to ethylene oxide and tetracycline HCl. *J apic Res* 16: 201-203.
- Oldroyd BP, RD Goodman, MAZ Hornitzky and D Chandler (1989) The effect on American Foulbrood of standard oxytetracycline hydrochloride treatments for the control of European Foulbrood of honey bees (*Apis mellifera*). *Aust J Agric Res* 40: 691-697.
- Shimanuki H and DA Knox (1991) Diagnosis of honey bee diseases. US Department of Agriculture, Agriculture Handbook N° AH-690.
- Sneath PHA (1984) Section 13: Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* vol 2 Eds Krieg NR and JG Holt The Williams and Wilkins Co Baltimore 1104-1125.
- Wilson WT (1962) Control of European Foulbrood using two erythromycin formulations and yearly disease recurrence. *Am Bee J* 102: 351-354.