

DETERMINACION DE LA DOSIS ÓPTIMA DE TARTRATO DE TILOSINA PARA EL CONTROL A CAMPO DE LA LOQUE AMERICANA DE LAS ABEJAS

Reynaldi FJ¹, Albo GN², Giusti M², Alippi AM³

¹ CONICET. Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI)

² Curso de Producción Animal I. ³ CIC. Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI) Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: La loque americana es la enfermedad más grave de origen bacteriano que afecta a las larvas de las abejas melíferas en todo el mundo. En este trabajo, se evaluó la eficacia de 3 dosis diferentes de tartrato de tilosina administradas bajo la forma de "paper-pack" en colmenas inoculadas artificialmente con esporas de *Paenibacillus larvae*, agente etiológico de la enfermedad. La ausencia de larvas con síntomas clínicos demostró que las dosis de 1.000 mg y 1.200 mg de tilosina fueron las más efectivas in vivo protegiendo a las colmenas por un período de hasta 365 días desde la aplicación del tratamiento. Paralelamente, se encontró una mayor efectividad de la dosis de 1.000 mg con el agregado de gelatina de cereza como saborizante. La utilización del tartrato de tilosina en Argentina puede ser una herramienta alternativa para el control de la loque americana a campo, principalmente en colmenares en los cuales se haya detectado resistencia a tetraciclina. Un tratamiento otoñal de 1.000 mg de p.a. de tilosina con saborizante junto con otras pautas de manejo facilitaría el control integrado de la enfermedad evitando la difusión de cepas del patógeno resistentes a tetraciclina. -

PALABRAS CLAVES: *Paenibacillus larvae*, *Apis mellifera*, tartrato de tilosina, control, loque americana

DETERMINATION OF THE OPTIMUM DOSES OF TYLOSIN TARTRATE FOR THE CONTROL OF AMERICAN FOULBROOD IN HONEY BEE COLONIES

ABSTRACT: American foulbrood (AFB), caused by the spore-forming bacterium *Paenibacillus larvae* is the most serious disease affecting the larval and pupal stages of honey bees worldwide. Field studies were conducted to evaluate the optimum dosage of tylosin tartrate for controlling infections of American Foulbrood in artificially inoculated colonies. The absence of larvae with clinical symptoms demonstrated that tylosin tartrate at the doses of 1,000 mg and 1,200 mg per colony were effective for the elimination of clinical signs for up to 365 days. On the other hand, cherry jelly used as attractant increased the consumption of the antibiotic. Tylosin tartrate at a doses of 1,000 mg a.i. plus cherry jelly is a valuable tool for controlling AFB infections.

KEY WORDS: *Paenibacillus larvae*, *Apis mellifera*, tartrato de tilosina, control, American Foulbrood.

Fecha de recepción: 27/05/09

Fecha de aprobación: 10/12/09

Dirección para correspondencia: F. Reynaldi. Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI) Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata. 60 y 119 (1900). La Plata. Argentina.

E-mail: freynaldi@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

La loque americana es la enfermedad más grave y peligrosa que afecta a las larvas y pupas de las abejas (*Apis mellifera* L.), es muy contagiosa, no se presenta como epidemia, aparece en cualquier época del año (1,2) y está ampliamente difundida en todos los países productores de miel (3). El agente causal es *Paenibacillus larvae* (4), una bacteria con la capacidad de formar esporas que mantienen su capacidad infectiva por largos períodos y sobreviven frente a condiciones adversas (5).

En la Argentina (6) está presente en todas las zonas productoras de miel, llegando a una incidencia mayor al 50% en la Provincia de Buenos Aires (7). En áreas donde la ocurrencia de la enfermedad es alta, el control con antibióticos aparece como una alternativa a la quema o eliminación de cuadros de cría de las colmenas infectadas (2). Durante décadas, el antibiótico de elección para el control de esta enfermedad ha sido la oxitetraciclina lo que generó la aparición de cepas del patógeno resistentes en distintas regiones geográficas de la Argentina, EUA y Canadá (8, 9, 10, 11).

El tartrato de tilosina es un antibiótico macrólido eficaz sobre bacterias Gram positivas y espiroquetas, pero no sobre la mayoría de los microorganismos Gram negativos (12, 13) que ha sido citado como efectivo en la inhibición de *P. larvae* tanto *in vitro* como *a campo* (14, 15, 16, 17, 18, 19, 20), razón por la cual fue recientemente aprobado en EUA para su uso en colmenas (http://www.fda.gov/cvm/cvm_updates/honeybee.htm)

El objetivo del presente trabajo fue determinar la dosis óptima de tartrato de tilosina suministrada bajo la forma de "paper-pack" para eliminar los síntomas clínicos de loque americana en colmenas inoculadas artificialmente. Adicionalmente, se evaluó el agregado de gelatina de cereza como saborizante para mejorar la palatabilidad de la formulación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se realizaron en el colmenar experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina (Latitud 35° S, Longitud 57° O). Se efectuaron dos experimentos, el primero entre los meses de febrero y noviembre de 2006 y el segundo entre febrero y noviembre de 2007. En todos los experimentos se utilizaron colmenas tipo Langstroth de abejas melíferas (*Apis mellifera ligustica* L.) acondicionadas en cámaras de cría (3-4 cuadros de cría, 6-7 cuadros de abejas y 2-3 cuadros de miel) inoculadas mediante la técnica de injerto de un trozo de panal con síntomas de

loque americana 45 días previos a la aplicación de los tratamientos (15, 16). Las colmenas fueron tratadas previamente al ensayo con AMIVAR® para el control de la varroosis ocasionada por el ácaro *Varroa destructor*.

Primer experimento:

Evaluación de 3 dosis de tartrato de tilosina en colmenas inoculadas con loque americana

Se efectuaron cuatro tratamientos con cinco repeticiones por tratamiento, aplicados bajo la forma de "paper pack" de 50 gramos (44 g de azúcar impalpable, 5 g de gelatina de cereza como saborizante y la correspondiente dosis de tilosina (Tylan® Laboratorio ELANCO, Eli Lilly Interamérica Inc., Argentina), suministrados por única vez a los 45 días de efectuada la inoculación, sobre los cabezales de la cámara de cría. En el momento de la aplicación se verificó la presencia de síntomas de la enfermedad en todas las colmenas y se probaron 3 dosis de tartrato de tilosina: T1: 800 mg; T2: 1.000 mg T3: 1.200 mg. El tratamiento T4 fue el control sin antibiótico.

Segundo experimento:

Evaluación de la incorporación de saborizante a la dosis de 1.000 mg de tilosina

Adicionalmente, se probó la eficacia de la dosis de 1.000 mg de tartrato de tilosina con y sin el agregado del saborizante, a razón de 5 repeticiones por tratamiento: T5: con saborizante; T6: sin saborizante y T7: Tratamiento control sin antibiótico (azúcar y saborizante). Las proporciones de saborizante y azúcar fueron las mismas que en el experimento anterior.

Para ambos experimentos, a partir de la aplicación de los tratamientos, se efectuaron ocho inspecciones quincenales donde se cuantificó la sintomatología clínica de la enfermedad de acuerdo con la escala de 7 niveles propuesta por Alippi y colaboradores (16) donde: 0: Ausencia de síntomas de loque americana; 1 entre 1 y 10 larvas con síntomas clínicos, 2: entre 11 y 30 larvas con síntomas, 3: entre 31 y 99 larvas con síntomas; 4: más de 100 larvas con síntomas, 5: recambio de reina debido a la enfermedad y 6: muerte de la colmena. Los valores obtenidos se analizaron por el Test de Krüskal-Wallis (ANOVA no paramétrico) con valor de $p \leq 0,05$ y posteriormente se efectuó el Test de Nemenyi modificado (21) para determinar diferencias entre tratamientos. Adicionalmente, al cabo de un año de efectuada la inoculación, se verificó la presencia/ausencia de síntomas para determinar si hubo recurrencia de la enfermedad.

RESULTADOS

Primer experimento:

Evaluación de 3 dosis de tartrato de tilosina en colmenas inoculadas con loque americana:

En la primera inspección todas las colmenas inoculadas presentaron síntomas clínicos de la enfermedad con niveles de infección entre 2 y 4. A partir de la segunda inspección se observó una tendencia de las colmenas control (T4) hacia el aumento de los niveles de infección con respecto a las colmenas tratadas con tilosina. En términos generales, las colmenas del tratamiento T1 mantuvieron los niveles de infección estables durante todo el ensayo, mientras que las colmenas de los tratamientos T2 y T3 mostraron una tendencia a disminuir los niveles de infección hasta llegar a una recuperación definitiva al final del ensayo (Tabla 1, Fig.1). En todos los casos las abejas consumieron la totalidad de los “paper packs” en un plazo no mayor a 25 días de la fecha de su colocación.

El Test de Krüskal-Wallis no mostró diferencias estadísticamente significativas en las primeras 5 inspecciones a un valor de $p \leq 0,05$, en las últimas tres inspecciones, hubo diferencias significativas entre tratamientos, con valores de $p = 0,054$ para la sexta inspección, $p = 0,047$ para la séptima inspección y $p = 0,0035$ para la octava inspección (Tabla 1). El Test de Nemenyi modificado mostró tres grupos de tratamientos: el primero agrupó a los tratamientos más eficaces,

T2 (1.000 mg) y T3 (1.200 mg) dónde se observó una eliminación de los síntomas clínicos de la enfermedad a los 120 días; en el segundo grupo se ubicó el tratamiento T1 (800 mg) de mediana eficacia con un 20% de mortandad a los 105 días post-inoculación y el tercer grupo incluyó el tratamiento testigo (T4), que registró un 80% de mortandad de colmenas entre los 60 y 120 días post-inoculación y las que sobrevivieron presentaron tres episodios de recambio de reinas dentro del periodo de estudio. Adicionalmente, no se observó recambio de reinas ni recurrencia de la enfermedad en las colmenas de los tratamientos T2 y T3, mientras que las colmenas del tratamiento T1 no presentaron recurrencia pero si un 20% de recambio de reinas (Tabla 1).

Segundo experimento:

Evaluación de la incorporación de saborizante a la dosis de 1.000 mg de tilosina

Los tratamientos T5 y T6 presentaron una tendencia hacia la recuperación, particularmente las colmenas tratadas con tilosina más saborizante (T5) y las colmenas del tratamiento control (T7) desarrollaron la enfermedad aumentando sus niveles de infección hacia el final del ensayo. En todos los casos las abejas consumieron la totalidad de los “paper packs” en un plazo no mayor a 25 días de su colocación.

Tabla 1: Niveles de infección de loque americana observados en las colmenas durante el desarrollo del primer experimento, dónde 0: Ausencia de síntomas de loque americana; 1 entre 1 y 10 larvas con síntomas clínicos, 2: entre 11 y 30 larvas con síntomas, 3: entre 31 y 99 larvas con síntomas; 4: más de 100 larvas con síntomas, 5: recambio de reina debido a la enfermedad y 6: muerte de la colmena (Alippi et al., 2004). Los valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente significativos para $p < 0,05$.

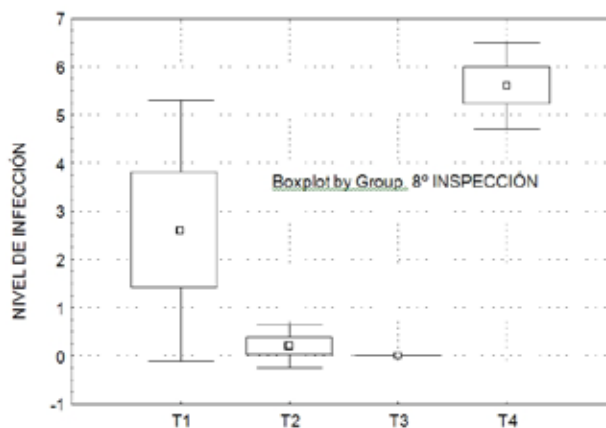
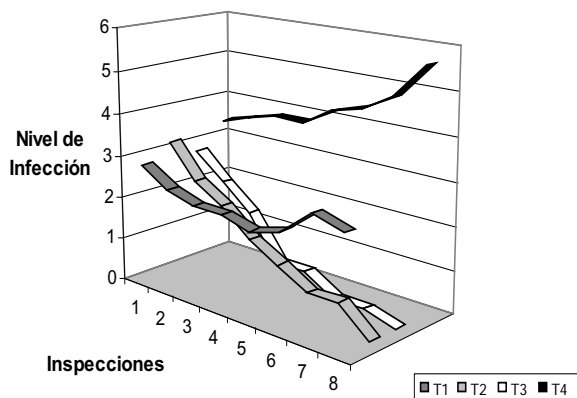
Table 1: AFB infection levels of each colony at 8 inspection dates during the first field trial, where 0 is non-detectable AFB symptoms; 1: between 1 and 10 larvae with clinical signs; 2: between 11 and 30 larvae with clinical signs; 3: between 31 and 99 larvae with clinical signs; 4: more than 100 larvae with clinical signs; 5: queen supersedure due to AFB and 6: colony death, respectively (Alippi et al., 2004). Values followed by the same letter showed no statistical differences ($p < 0,05$)

TRATAMIENTOS	COLMENAS	1° INSPECCIÓN	2° INSPECCIÓN	3° INSPECCIÓN	4° INSPECCIÓN	5° INSPECCIÓN	6° INSPECCIÓN	7° INSPECCIÓN	8° INSPECCIÓN
T1	2	3 a	3 a	3 a	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a
T1	3	3 a	3 a	2 a	1 a	1 a	1 a	1 a	1 a
T1	5	2 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
T1	6	2 a	2 a	3 a	3 a	3 a	3 a	2 a	1 a
T1	9	4 a	4 a	3 a	2 a	1 a	2 a	6 a	6 a
T2	12	4 a	4 a	3 a	2 a	1 a	0 a	0 a	0 a
T2	11	4 a	4 a	4 a	3 a	2 a	2 a	3 a	1 a
T2	10	2 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
T2	16	4 a	4 a	3 a	2 a	2 a	1 a	0 a	0 a
T2	15	2 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
T3	14	4 a	4 a	3 a	1 a	1 a	0 b	0 b	0 b
T3	21	4 a	4 a	3 a	2 a	2 a	1 b	1 b	0 b
T3	23	2 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 b	0 b	0 b
T3	25	2 a	1 a	1 a	0 a	0 a	0 b	0 b	0 b
T3	26	2 a	2 a	1 a	0 a	0 a	0 b	0 b	0 b
T4	24	4 a	4 a	3 a	3 a	4 a	4 c	4 c	4 c
T4	27	2 a	2 a	3 a	3 a	3 a	4 c	5 c	6 c
T4	29	3 a	3 a	3 a	3 a	4 a	4 c	4 c	5 c
T4	30	4 a	5 a	6 a	6 a	6 a	6 c	6 c	6 c
T4	31	4 a	4 a	4 a	4 a	4 a	4 c	5 c	6 c

Figura 1a: Niveles de infección de loque americana en todas las colmenas del primer experimento en cada fecha de inspección. T1: 800 mg de tilosina, T2: 1.000 mg de tilosina, T3: 1.200 mg de tilosina y T4 control sin antibiótico. Figura 1b: Gráfico de box-whisker que muestra los valores de nivel de infección para los distintos tratamientos luego de 120 días de la inoculación (8° inspección). Las cajas comprenden el 50% de los valores y las líneas exteriores muestran el menor y mayor valor observado.

Figure 1a: AFB infection levels in all the colonies at 8 inspection dates during the first trial. T1: 800 mg of tylosin, T2: 1,000 mg of tylosin, T3: 1,200 mg of tylosin and T4 control. Figure 1b: Box-whisker plot displaying infection levels after 120 days (inspection 8) under different treatments. Boxes include the 50% of data and whiskers extend to minimum and maximum observed values.

Evolución de la enfermedad en el tiempo



El Test de Kruskal Wallis mostró diferencias significativas entre tratamientos a partir de la quinta inspección ($p = 0,0029$) y hasta el final del ensayo en la octava inspección ($p = 0,006$). El test de Nemenyi mostró a los tres tratamientos diferentes entre sí, el tratamiento T5 (tilosina + saborizante) eliminó los síntomas de la enfermedad entre los 105 y 120 días post-inoculación; el tratamiento T6 (tilosina sin saborizante) presentó un 20% de mortandad entre los 60 y 120 días y, finalmente el tratamiento T7 (control), tuvo el peor comportamiento con un 80% de colmenas muertas entre los 90 y 120 días post-inoculación y con 2 episodios de recambio de reinas en las sobrevivientes (Tabla 2, Fig. 2). No se observó recambio de reinas a lo largo de todo el ensayo ni recurrencia de la enfermedad en las colmenas del tratamiento T5, mientras que las colmenas del tratamiento T6 no presentaron recurrencia pero sí un 20% de recambio de reinas.

Los tratamientos T2 y T3 del primer ensayo y el tratamiento T5 del segundo ensayo eliminaron los síntomas de la enfermedad protegiendo a las colmenas por el término de un año de efectuada la aplicación.

DISCUSIÓN

La efectividad del tartrato de tilosina observada en nuestro trabajo concuerda con lo puntualizado por otros investigadores usando diferentes formas de aplicación; por ejemplo, Moffet y colaboradores (19) determinaron que una dosis de 1.200 mg de antibiótico administrada bajo la forma de jarabe protegía a las colmenas durante

seis semanas. Pettis y Fedlaufer (22) empleando una dosis de 600 mg de tilosina en jarabe eliminaron los síntomas de la enfermedad, pero no definieron el tiempo de protección de este tratamiento. Hitchcock y colaboradores (18) aplicando 1.000 mg de tilosina por espolvoreo durante tres semanas obtuvieron una protección durante 7 semanas, mientras que Peng y colaboradores (20) empleando dosis de 100 mg, 200 mg, o 400mg por colmena bajo forma de espolvoreo suprimieron los síntomas por 4 semanas. Por otra parte, Elzen y colaboradores observaron que una dosis de 200 mg por espolvoreo en una sola aplicación protegía a las colmenas durante tres semanas (17) y Alippi y colaboradores (15) determinaron que una dosis única de 1.500 mg de tilosina en forma de pattie o paper pack eliminaba los síntomas de la enfermedad por el término de un año.

Los resultados obtenidos en nuestros ensayos demostraron que tanto las dosis de 1.000 mg como de 1.200 mg de tilosina fueron eficaces para el control de loque americana hasta un año después de efectuado el tratamiento. Por esta razón, se considera que la menor dosis (1.000 mg de p.a.) sería la más recomendable para su uso en colmenas disminuyendo el riesgo de contaminación de la miel. También, se determinó que el tratamiento con saborizante resultó más efectivo que el tratamiento sin saborizante, probablemente, debido a la eliminación total o parcial del antibiótico fuera de la colmena debido a una mala palatabilidad para las abejas generando una subdosificación que disminuye su eficacia como ocurre con las dosis más bajas de 750 mg. Un

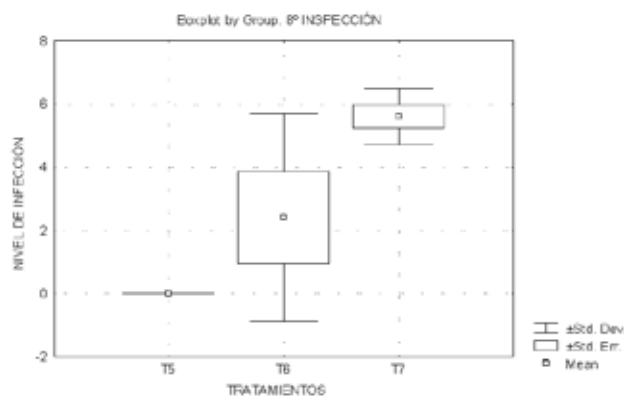
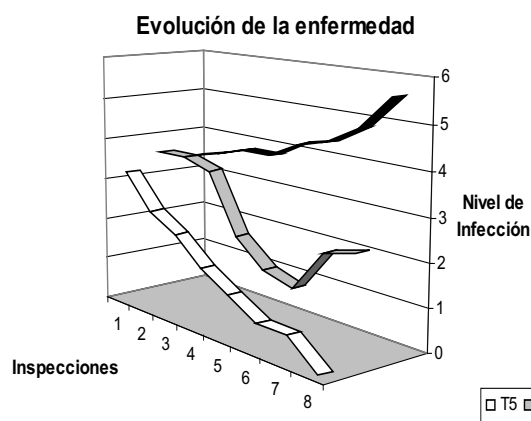
Tabla 2: Niveles de infección de loque americana en las colmenas durante el desarrollo del segundo ensayo a lo largo de las 8 inspecciones realizadas dónde 0: Ausencia de síntomas de loque americana; 1 entre 1 y 10 larvas con síntomas clínicos, 2: entre 11 y 30 larvas con síntomas, 3: entre 31 y 99 larvas con síntomas; 4: más de 100 larvas con síntomas, 5: recambio de reina debido a la enfermedad y 6: muerte de la colmena (Alippi et al., 2004). Los valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente significativos para $p < 0,05$.

Table 2: AFB infection levels per colony at each inspection date during the second field trial, where 0 is non-detectable AFB symptoms; 1: between 1 and 10 larvae with clinical signs; 2: between 11 and 30 larvae with clinical signs; 3: between 31 and 99 larvae with clinical signs; 4: more than 100 larvae with clinical signs; 5: queen supersedure due to AFB and 6: colony death, respectively. (Alippi et al., 2004) values follow with the same letter show no statistical differences ($p < 0,05$)

TRATAMIENTOS	COLMENAS	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°
		INSPECCIÓN	INSPECCIÓN	INSPECCIÓN	INSPECCIÓN	INSPECCIÓN	INSPECCIÓN	INSPECCIÓN	INSPECCIÓN
T5	37	4 a	4 a	3 a	2 a	1 a	0 a	0 a	0 a
T5	38	4 a	4 a	3 a	2 a	2 a	1 a	0 a	0 a
T5	39	2 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
T5	41	4 a	4 a	3 a	2 a	2 a	1 a	0 a	0 a
T5	42	2 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
T6	41	4 a	4 a	4 a	2 a	1 a	0 a	0 b	0 b
T6	44	4 a	4 a	3 a	1 a	0 a	0 a	0 b	0 b
T6	45	4 a	4 a	3 a	1 a	0 a	0 a	5 b	5 b
T6	46	2 a	2 a	6 a	0 a	0 a	0 a	0 b	0 b
T6	47	4 a	4 a	4 a	6 a	6 a	6 a	6 b	6 b
T7	49	4 a	4 a	3 a	3 a	4 b	4 b	4 c	4 c
T7	51	2 a	2 a	3 a	3 a	3 b	4 b	5 c	6 c
T7	52	3 a	3 a	3 a	3 a	4 b	4 b	4 c	6 c
T7	53	4 a	5 a	6 a	6 a	6 b	6 b	6 c	6 c
T7	54	4 a	4 a	4 a	4 a	4 b	4 b	5 c	6 c

Figura 2a: Niveles de infección de loque americana en todas las colmenas del segundo experimento en cada fecha de inspección. T5: 1000 mg de tilosina + saborizante, T6: 1.000 mg de tilosina sin saborizante y T7 control. Figura 2b: Gráfico de box-whisker que muestra los valores de nivel de infección para los distintos tratamientos luego de 120 días de la inoculación (8° inspección). Las cajas comprenden el 50% de los valores y las líneas exteriores muestran el menor y mayor valor observado.

Figure 2a: AFB infection levels in all the colonies at 8 inspection dates during the second trial. T5: 1,000 mg of tylosin + cherry jelly, T6: 1,000 mg of tylosin without cherry jelly and T7 control. Figure 2b: Box-whisker plot displaying infection levels after 120 days (inspection 8) under different treatments. Boxes include 50% of data and whiskers extend to minimum and maximum observed values.



efecto similar fue observado por Peng y colaboradores (20) quienes notaron que las abejas eran renuentes a consumir una dosis de 800 mg de tilosina vehiculizada en 7 g de azúcar.

Se observó recambio de reinas en los tratamientos T1 y T4 del primer ensayo de campo y en los tratamientos T6 y T7 del segundo ensayo. El recambio de reinas está asociado a una tendencia natural de defensa de la colmena frente a esta enfermedad con el objeto de cortar el ciclo de postura de la reina para eliminar la infección (15). Los datos observados en estos experimen-

tos corroboran lo antedicho ya que las colmenas que presentaron recambio de reina mostraron un alto nivel de infección (grado 5 de la escala propuesta).

Con respecto a la residualidad de tilosina en miel, existen pocos antecedentes en la literatura. Feldlaufer y colaboradores (23) trabajando con colmenas en temporada detectaron que luego de 3 semanas de efectuada la aplicación los residuos encontrados no superaban las 0,16 ppm en miel por lo que recomiendan su aprobación por la FDA para su uso en apicultura dado que estos valores

están por debajo del límite aceptado para tilosina en otros alimentos (23). Por el contrario, Kochansky y colaboradores investigaron la residualidad de tilosina en jarabe de maíz (24) y en mieles (25, 26) preparados en forma artificial y mantenidos en condiciones de laboratorio y determinaron que la tilosina presentó una vida media de 75 días en jarabe y estimaron para miel entre 1,5 y 3 años, pero estos resultados no serían un reflejo de la realidad de la colmena.

El empleo del tartrato de tilosina en Argentina sería una herramienta alternativa para el control de la loque americana a campo, principalmente en colmenares en los cuales se haya detectado resistencia a tetraciclina. Un tratamiento otoñal (para maximizar el periodo de carencia del antibiótico) de 1.000 mg de p.a. de tilosina con saborizante, junto con otras pautas de manejo como la selección de abejas de alto comportamiento higiénico (27, 28) o el cepillado de colmenas afectadas (29), facilitaría el control integrado de la enfermedad evitando la difusión de cepas del patógeno resistentes a tetraciclina.

Si bien el empleo de líneas de abejas con alto comportamiento higiénico se considera como una alternativa de manejo del colmenar afectado por enfermedades de la cría (27, 28), el empleo de estas líneas de abejas por sí solo no sería totalmente efectivo para el control de loque americana en particular. Por ejemplo, Palacio y colaboradores (28) concluyen que las abejas de líneas higiénicas limpian el 98% de las celdas infectadas dejando un 2% de celdas con inóculo bacteriano mientras que el tratamiento con dosis de 1.000 mg p.a. de tilosina elimina totalmente los síntomas clínicos como lo demuestran los resultados de este y otros estudios (15, 20). En el caso de apiarios con un alto número de colmenas el uso de líneas con alto comportamiento higiénico no es aplicable, por lo cual el empleo de tilosina sería una alternativa válida de control de esta enfermedad independientemente de la necesidad de efectuar mayores estudios sobre residualidad de tilosina y sus productos metabólicos en mieles bajo condiciones de campo.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue parcialmente financiada por la ANPCyT (Préstamo BID PICT 2411) y el Laboratorio BIOTAY S.A., Buenos Aires, Argentina. FJR es miembro de la Carrera del Investigador Científico del CONICET y AMA es miembro de la Carrera del Investigador Científico de la CIC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bailey L, Ball BV. (Eds.). Honey Bee Pathology, Second Edition, Academic Press, London. 1991.
2. Alippi AM. Bacterial Diseases, pp. 31-59. In: Bee Disease Diagnosis. (Eds. Colin ME, Ball BV, Kilani M). Options Méditerranéennes, Serie B: Etudes et Recherches. No. 25. CIHEAM Publications, Zaragoza. España, 182 pp. 1999
3. Matheson A. World bee health update Bee world 1996; 77: 45-51.
4. Genersch E, Forsgren E, Pentikainem J, Ashiralieva A, Rauch S, Kilwiski J, Fries I. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvificiens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2006; 56, 501-511.
5. Morse RA, Nowogrodzki R (Eds.) Honey bee pests, predators and diseases. Second Ed., 1990. Cornell University Press, 474pp
6. Alippi AM. Characterization of *Bacillus larvae* White, the causative agent of AFB of honey bees. First record of its occurrence in Argentina. Revista Argentina de Microbiología 1992; 24: 75-80.
7. Alippi AM, Reynaldi FJ, López AC; De Giusti MR, Aguilar OM. Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the causal agent of American Foulbrood of honeybees in Argentina. Journal of Apicultural Research 2004; 43 (3): 135-143.
8. Evans JD. Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. Journal of Invertebrate Pathology 2003; 83, 46-50.
9. Alippi AM. Is Terramycin® losing its effectiveness against AFB?. The Argentinean experience. Bee Biz 2000; 11, 27-29.
10. Alippi, A.M., López A.C., Reynaldi F.J., Grasso, D.H., and Aguilar O.M. Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus larvae*, the causal agent of a honey bee larval disease. Veterinary Microbiology 2007; 125: 290-303.
11. Colter D. Antibiotic Resistant American Foul Brood. Alberta Bee News 2000. February :4.
12. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Farmacología 2000. Cuarta edición. Edición Harcourt.
13. Lucas MF, Mestorino N, Errecalde JO. Macrólidos: novedades de un clásico grupo de antimicrobianos. Analecta Veterinaria 2007. 27 (1): 36-45.
14. FDA, 2005. http://www.fda.gov/cvm/CVM_Updates/honeybee.htm .
15. Alippi AM, Albo GN, Leniz D, Rivera I, Zanelli ML, Roca AE. Comparative study of tylosin, erythromycin and oxytetracycline to control American Foulbrood of honeybees. Journal of Apicultural Research 1999; 38, 149-158.
16. Alippi AM, Albo GN, Reynaldi FJ, D Giusti MR. In vitro and in vivo susceptibility of the honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* to the antibiotic tylosin. Veterinary Microbiology 2005; 109: 47-55.
17. Elzen P, Westervelt D, Causey D, Rivera R, Baxter J, Fedlaufer M. Control of oxytetracycline-resistant American Foulbrood with tylosin and its toxicity to honey bees (*Apis mellifera*). Journal of Apicultural

F. Reynaldi y col.

Research 2002; 41, 97–100.

18. Hitchcock JD, Moffett JO, Lackett JJ, Elliot JR. Tylosin for control American Foulbrood disease in honeybees. *Journal of Economic Entomology* 1970; 63, 204–207.

19. Moffett JO, Hitchcock JD, Lackett JJ, Elliot JR. Evaluation of some new compounds in controlling American Foul Brood. *J. Apic. Res.* 1970; 9: 39-44.

20. Peng YS, Mussen E, Fong A, Cheng P, Wong G & Montague MA. Laboratories and field studies on the effects of the antibiotics tylosin on honey bees *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Development and prevention of American Foulbrood disease. *Journal of Invertebrate Pathology* 1996; 67: 64-71.

21. Zar JH. *Biostatistical Analysis* 1998; Prentice Hall.

22. Pettis JS, Feldlaufer MF. Efficacy of lincomycin and tylosin in controlling American foulbrood in honey bee colonies. *Journal of Apicultural Research* 2005. 44(3): 106-108.

23. Feldlaufer MF, Pettis JS, Kochansky JP, Kramer M. Residue levels in honey after colony treatment with the antibiotic tylosin. *American Bee Journal* 2004; 144 (2): 143-145.

24. Kochansky JP, Knox D, Shimanuki H. Comparative stability of oxytetracycline and tylosin in sugar syrup. 1999. *Apidologie* 30: 321-326.

25. Kochansky JP. Evaluation of purification schemes in the determination of tylosin in honey using high performance liquid chromatography. *Journal of Apicultural Research* 2004. 43(2): 60-64.

26. Kochansky JP. Degradation of tylosin residues in honey. *Journal of Apicultural Research* 2004. 43(2): 65-68.

27. Spivak M, Reuter GS. Resistance to American Foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* 2001; 32, 555–565.

28. Palacio MA, Figini E, Martínez A, Bedascarrasbure EL. Avances en comportamiento higiénico. Edición Especial Sanidad Apícola, Campo & Abejas 2005. 1: 55-57.

29. Del Hoyo ML, Basualdo M, Lorenzo MA, Palacio A, Rodríguez EM, Bedascarrasbure E. Effect of shaking honey bee colonies affected by American foulbrood on *Paenibacillus larvae larvae* spore loads. *Journal of Apicultural Research* 2001; 40, 65–69.