

TILMICOSINA, UNA ALTERNATIVA PARA EL CONTROL DE LA LOQUE AMERICANA DE LAS ABEJAS

Reynaldi FJ¹, Albo GN², Lorenzo D²

¹ CCT CONICET. Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI) Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

² Curso de Producción Animal I.

RESUMEN: *La loque americana es una enfermedad bacteriana que afecta a las larvas y pupas de las abejas provocándoles una septicemia mortal. En este trabajo se evaluó la eficacia a campo de tilmicosina en colmenas inoculadas artificialmente con esporas de Paenibacillus larvae, agente etiológico de la enfermedad. La ausencia de síntomas clínicos en las colmenas a partir de los sesenta días demostró que las dosis de 750 y 1000mg fueron las más efectivas. Teniendo en cuenta que en apiarios con un alto número de colmenas infectadas con loque americana, el uso de líneas con alto comportamiento higiénico no es una alternativa de fácil aplicación, el uso de 750mg tilmicosina post-cosecha, junto con otras pautas de manejo como la selección de abejas de alto comportamiento higiénico o el cepillado de colmenas afectadas, sería una forma de realizar un control integrado de la enfermedad evitando la difusión de cepas del patógeno resistentes a tetraciclina.*

PALABRAS CLAVES: *Apis mellifera, Paenibacillus larvae, tilmicosina, control, loque americana*

TILMICOSIN AN ALTERNATIVE FOR THE CONTROL OF AMERICAN FOULBROOD

ABSTRACT: *American foulbrood is a bacterial disease that larvae and pupae of bees causing a fatal septicemia. This study evaluated the efficacy of tilmicosin in hives artificially inoculated with spores of Paenibacillus larvae, the causal agent of disease. The absence of clinical symptoms in the hives after sixty days showed that doses of 750 and 1000mg were most effective. Given that in apiaries with large numbers of hives infected with American foulbrood, the use of lines with high hygienic behavior is not an easy alternative implementation, the use of 750mg of tilmicosin post-harvest, along with other management standards such as high selection bee hygienic behavior or hives affected brushing would be a way of realizing an integrated control of the disease by preventing the spread of the pathogen strains resistant to tetracycline.*

KEY WORDS: *Apis mellifera, Paenibacillus larvae, tilmicosin, control, American Foulbrood.*

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata.
Calle 60 y 119 s/n La Plata, Prov. de Buenos Aires, ARGENTINA. Fax: 0054-0221-425-6758, E-mail: freynaldi@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

La loque americana (LA) es una enfermedad bacteriana que afecta a las larvas y pupas de las abejas (*Apis mellifera* L.) provocándoles una septicemia mortal. Las colonias afectadas se debilitan y finalmente mueren dejando el material apícola contaminado que debe ser eliminado o reciclado con técnicas que permitan eliminar las esporas (1). Es una enfermedad muy contagiosa con la particularidad de poder aparecer en cualquier época del año (2,3). Está ampliamente difundida en todos los países productores de miel del mundo (4). *Paenibacillus larvae*, agente etiológico de la enfermedad (5), es una bacteria Gram positiva con la capacidad de formar esporas que pueden mantenerse viables por más de 50 años en el campo (6).

En la Argentina (7) está presente en todas las zonas productoras de miel, llegando a con una incidencia mayor al 50% en la Provincia de Buenos Aires (8). Teniendo en cuenta que en Argentina no existe una política de estado que subvencione las colmenas eliminadas por estar infectadas con LA y sabiendo que, existen áreas donde la ocurrencia de la enfermedad es alta, el control estratégico con antibióticos en épocas del año que eviten la residualidad en miel (períodos de carencia), aparece como una alternativa a la quema o eliminación de cuadros de cría de las colmenas infectadas en temporadas de riesgo (3). Durante décadas, el único antibiótico aprobado para el control de las enfermedades bacterianas en colmenas (LA y Loque Europea (LE) (*Melisococcus plutonius*)) fue el clorhidrato de oxitetraciclina (OTC), con la particularidad, que la dosis recomendada para LE es 0,54 gr de OTC / colmena, casi un tercio de la dosis recomendada para controlar LA (1,25 gr OTC / colmena). Este hecho, sumado al uso de manera "preventivo" de OTC como antibiótico y vigorizante de la colmena, efectuado por el productor apícola durante décadas, seguramente favoreció la aparición de cepas del patógeno resistentes en distintas regiones geográficas de la Argentina (9, 10), concomitantemente con otras partes del mundo (11, 12). Varios antibióticos han demostrado ser efectivos para el control de la LA, como la lincomicina (1, 13, 15), la tilosina (1,13, 14) recientemente aprobada para su uso en Argentina (SENASA, 2008), o la tilmicosina un macrólido sintetizado a partir de la tilosina y desarrollado para ser usado en medicina veterinaria, que presenta buena actividad contra microorganismos Gram positivos, incluso contra *P. larvae* (16, 17). Entendiendo que la tilmicosina puede ser una alternativa para el control de la LA a campo, el objetivo de nuestro trabajo fue determinar la dosis óptima de tilmicosina vehiculizada en paper-pack,

que permita controlar la enfermedad, usando la menor dosis activa de manera de minimizar la aparición de residuos en miel.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo de campo se realizó en el colmenar experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina (Latitud 35° S, Longitud 57° O), de Febrero de 2008 a Diciembre de 2008. Se chequeó la recurrencia de la enfermedad hasta un año de iniciado el ensayo. 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 del 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 con CUMAVAR®, para el control de la varoosis ocasionada por el ácaro *Varroa destructor*.

EVALUACIÓN DE 3 DOSIS DE TILMICOSINA EN PAPER-PACK EN COLMENAS INOCULADAS CON LOQUE AMERICANA.

Se efectuaron cuatro tratamientos con tres 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 tilmicosina (Pulmotil Premix®, Laboratorio Vetifarma), suministrados por única vez a los 45 días de efectuada la inoculación, sobre los cabezales de la cámara de cría. Esta vía de administración es ampliamente usada en colmenares de la República Argentina como una alternativa al espolvoreo, incluso con otros macrólidos como la tilosina (18). En el momento de la aplicación se verificó la presencia de síntomas de la enfermedad en todas las colmenas; se probaron 3 dosis de tilmicosina: T1: 1.000 mg; T2: 750 mg T3: 500 mg. El tratamiento T4 control sin antibiótico.

A partir de la aplicación de los tratamientos, Febrero de 2008, se efectuaron 10 inspecciones quincenales donde se cuantificó la sintomatología clínica de la enfermedad de acuerdo con la escala de 7 niveles propuesta por Alippi y colaboradores (19) 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. 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

Todas las colmenas presentaron síntomas de la enfermedad entre los niveles 2 a 4 al momento del inicio del ensayo. A partir de la tercera inspección se observó una recuperación de todas las colonias tratadas respecto a los controles (T4) que presentaron una clara tendencia a aumentar el nivel de infección (Figura 1a). Cabe destacar que los "paper-packs" se consumieron dentro de los tiempos esperados, 25 días, de acuerdo a trabajos previos (18).

En general, a partir de la sexta inspección desaparecieron los síntomas en los tratamientos T1 y T2, en tanto T3 logró eliminar los síntomas de dos colmenas, mientras que la tercera mantuvo altos niveles de infección (nivel 4) hasta el final del ensayo.

El Test de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas a partir de la cuarta inspección con un $p=0,02$, mientras que el Test de Nemenyi permitió separar dos grupos, por un lado los tratamientos T1 y T2 con valores más bajos de infección respecto de los tratamientos T3 y T4, con altos niveles de infección. Estas diferencias significativas se mantienen hasta la décima inspección, sin embargo a partir de la séptima inspección el Test de Medias separó tres

grupos de datos, por un lado los tratamientos T1 y T2 sin síntomas de enfermedad, T3 donde dos de las tres colmenas eliminaron los síntomas y finalmente las colmenas del tratamiento T4 (testigo) con una colmena muerta por loque americana y dos colmenas con altos niveles de infección. Para el final del ensayo una de estas dos colmenas murió, mientras que la otra generó un recambio de reina, uno de los síntomas de esta enfermedad (2, 3).

DISCUSIÓN

La eficacia del macrólido tilmicosina para controlar la loque americana a campo concuerda con otro trabajo previo realizado por este grupo de trabajo (17) donde 1000 mg de principio activo de tilmicosina aplicado en candies de 55 g eliminaron los síntomas de la enfermedad a los 60 días de iniciado el ensayo y protegió a las colmenas por al menos un año.

En este ensayo comprobamos que usando paper-pack, una forma muy utilizada en Argentina para administrar antibióticos en colmenas (Com, pers. Ing. Raúl Pérez), de 50 g con 1000 y 750 mg de p.a. de tilmicosina logramos eliminar los síntomas a los sesenta días de iniciado el ensayo, y se logró protegerlas de la enfermedad por un año. En tanto que la dosis de 500 mg solo consiguió eliminar los síntomas de dos de las tres colmenas enfermas, mientras que la tercera se mantuvo con nivel alto (nivel 4) hasta la sexta inspección donde presentó un recambio de reina, situación que se produce como una tendencia natural de defensa de la colmena

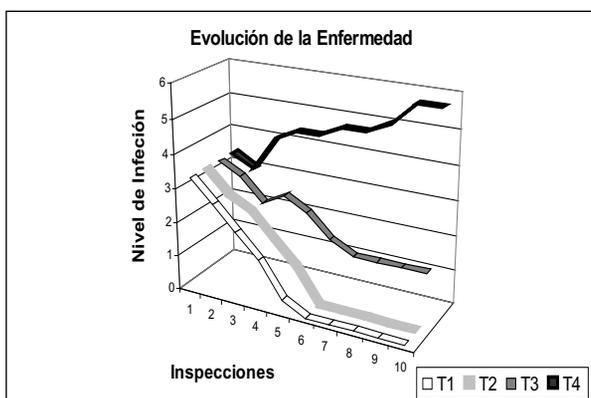


Figura 1a: Niveles de infección de loque americana en todas las colmenas del primer experimento en cada fecha de inspección. T1: 1000 mg de tilmicosina, T2: 750 mg de tilmicosina, T3: 500 mg de tilmicosina y T4 control sin antibiótico.

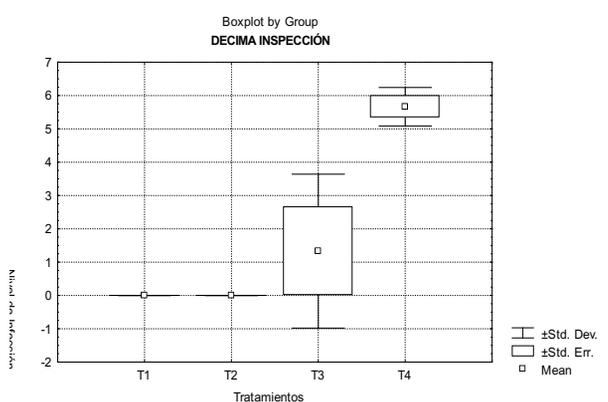


Figura 1b: Gráfico de box-whisker que muestra los valores de nivel de infección para los distintos tratamientos luego de 145 días de la inoculación (10ª inspección). Las cajas comprenden el 50% de los valores y las líneas exteriores muestran el menor y mayor valor observado.

frente a esta enfermedad con el objeto de cortar el ciclo de postura de la reina para eliminar la infección (21). El uso del tratamiento post-cosecha es una estrategia que apunta a minimizar la posibilidad de residuos en miel, ya que el tratamiento se realiza solamente sobre la cámara de cría luego de sacar del colmenar las alzas melarias.

Teniendo en cuenta que en apiarios con un alto número de colmenas infectadas con loque americana, el uso de líneas con alto comportamiento higiénico no es una alternativa de fácil aplicación, el uso de 750mg tilmicosina, como el de otros macrólidos de probada eficacia como la tilosina (18, 21, 22), junto con otras pautas de manejo como la selección de abejas de alto comportamiento higiénico (23) o el cepillado de colmenas afectadas (24), se presenta como una forma de realizar un control integrado de la enfermedad evitando la difusión de cepas del patógeno resistentes a tetraciclinas.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue parcialmente financiada por la ANPCyT (Préstamo BID PICT 2411) y el Laboratorio VETIFARMA S.A., La Plata, Argentina. FJR es miembro de la Carrera del Investigador Científico del CONICET, GNA y DL son docentes de la Cátedra de Producción Animal, FCAyF, UNLP.

BIBLIOGRAFÍA

1. 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.
2. Bailey L, Ball BV. (Eds.). *Honey Bee Pathology*, Second Edition, Academic Press, London. 1991.
3. 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
4. Matheson A. World bee health update *Bee world* 1996; 77: 45-51.
5. Genersch E, Forsgren E, Pentikainen 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.
6. Morse RA, Nowogrodzki R (Eds.) *Honey bee pests, predators and diseases*. Second Ed., 1990. Cornell University Press, 474pp
7. 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.
8. 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.

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. Evans JD. Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 2003; 83, 46-50.
12. Colter D. Antibiotic Resistant American Foul Brood. *Alberta Bee News* 2000. February :4.
13. FDA-CVM, 2006. Food and Drug Administration-Center for Veterinary Medicine (2006) FDA Approved Animal Drug List ("The Green Book") (available online at http://www.fda.gov/cvm/Green_Book/greenbook.html) (December 23, 2006).
14. 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 Research* 2002; 41, 97-100
15. Fedlaufer MF, Pettis JS, Kochansky JP, Stiles G. Lincomycin hydrochloride for the control of American Foulbrood disease of honeybees. *Apidologie* 2001; 32, 547-554.
16. Mestorino N, Errecalde JO. Tilmicosina: Un Nuevo antibiótico macrólido de uso veterinario. *Analecta Vet.* 2004; 24, 21-28.
17. Reynaldi FJ, Albo GN & Alippi AM. Effectiveness of tilmicosin against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood disease of honey bees. *Veterinary Microbiology* 2008; 132, 119-128.
18. Reynaldi FJ, Albo GN, Giusti M & Alippi AM. Determinación de la dosis óptima de tartrato de tilosina para el control a campo de la loque americana de las abejas. *Analecta Vet* 2009 (en prensa).
19. 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.
20. Zar JH. *Biostatistical Analysis* 1998; Prentice Hall.
21. 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.
22. 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.
23. Spivak M, Reuter GS. Resistance to American Foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* 2001; 32, 555-565.
24. 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.