UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis de Maestría

Estudio farmacocinético de tilosina en abejas
melíferas. Variables con impacto en el nivel de
residuos en miel

Tesista: Méd. Vet. Bárbara Huber

Directores: Dr. Jorge O. Errecalde
Dra. Nora Mestorino

Miembros del jurado: Dr. Alejandro Soraci
Dra. Fernanda Coll Cárdenas
Dr. Gustavo Marín

2012

En memoria de mi padre

Roberto Félix

A mi Familia

Agradecimientos:

Agradezco a la Universidad Nacional de La Plata por haberme dado la posibilidad de realizar este trabajo de Tesis de Maestría.

A Nora Mestorino y Jorge Errecalde, mis directores, por haberme abierto las puertas de la cátedra y darme la oportunidad de trabajar libremente, lo que no resulta muy común en el ámbito de la investigación.

A Nora especialmente, por haber confiado en mí y enseñarme a creer que todo se puede realizar. Por su estímulo constante, incondicionalidad y su paciencia durante tantas horas de trabajo compartido.

A Jorge por haberme brindado sus conocimientos y su infinita predisposición para intercambiar opiniones y fomentar la discusión científica.

A mis compañeros de la Cátedra de Farmacología, Farmacotecnia y Terapéutica de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Especialmente a Gabriel Gräve, Martín Quintero, Martín Daniele y Alejandro Moncada Cárdenas por la invaluable ayuda que me proporcionaron durante el trabajo de campo.

A María Laura Marchetti, por su gran amistad y ayuda en absolutamente todo.

A Mariana Lucas y Andrea Lambertini por su ayuda desinteresada, su amistad y consejos que hicieron más amenas las tareas rutinarias durante el trabajo de laboratorio.

A Jorge Padín, Atilio Rollie y sus familias, por haber provisto las colmenas, infraestructura y todo lo necesario para la realización de los diferentes experimentos de esta tesis. Por su generosidad, compromiso y trabajo incansable. Sin ellos, este trabajo hubiese sido imposible de llevar a cabo.

Al Ing. Pablo Salgado, por su acertada opinión profesional y valiosa colaboración en el análisis matemático de los datos.

A la Dra. Fernanda Coll Cárdenas por su calidez humana y extraordinaria ayuda brindada durante el estudio microbiológico. Por sus observaciones y aportes al presente manuscrito.

A la Maestría en Tecnología e Higiene en Alimentos por haber facilitado la obtención de la cepa de referencia de *P. larvae* y al laboratorio Tecnofarm por haber donado el antimicrobiano utilizado en esta tesis.

En especial agradezco a Ana, María Inés, Daniela, Leticia, Victoria, Karina, mis amigas, por su compañía, apoyo e incentivo durante todos estos años.

A Agustín (en memoria) por su incondicionalidad. Por ser mi guía y amigo durante toda la vida.

A mi madre, a mi tía y a Nelly por brindarme su constante apoyo moral y confianza para que pudiese concretar mis objetivos.

A Francisco, Ana Laura y Carolina porque todo absolutamente todo, me lleva a ustedes.

TÍTULOS Y RESUMEN

Título: Estudio farmacocinético de tilosina en abejas melíferas. Variables con impacto en el nivel de residuos en miel

Palabras claves: Tilosina * Loque Americana * *Paenibacillus larvae* * Farmacocinética -PK- * Farmacodinamia -PD-

Resumen

El objetivo de esta Tesis de Maestría fue aportar al conocimiento del comportamiento farmacocinético y farmacodinámico de tilosina en la explotación apícola, a efectos de maximizar su eficacia, disminuir riesgos de resistencia y especialmente, reducir los niveles residuales en miel.

A partir de colmenas con Loque Americana se obtuvieron 11 aislamientos de *Paenibacillus larvae* para realizar estudios de susceptibilidad por la prueba de difusión de discos y determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a tilosina.

Se utilizaron 36 colmenas de abejas *Apis mellifera*, a partir de las cuales se conformaron 6 lotes de experimentación de 6 colmenas cada uno teniendo en cuenta tres variables: nivel poblacional, época del año del tratamiento y estado sanitario. La dosis administrada en todos los experimentos fue de 600 mg en forma de espolvoreo sobre los cabezales de los marcos de cría.

La cuantificación del antimicrobiano en las diferentes matrices biológicas se llevó a cabo por método microbiológico y para el análisis farmacológico se utilizó un modelo no compartimental, basado en la teoría de los momentos estadísticos. En base a la CIM determinada se realizó la integración farmacocinética-farmacodinámica (PK/PD).

Se realizó un estudio de estabilidad de tilosina en miel *in vitro* a tres temperaturas de almacenamiento diferentes (35°C, 20°C y 4°C) durante 357 días. Se discriminó el orden cinético y el efecto de la temperatura sobre la constante de velocidad de degradación, mediante la ecuación de Arrhenius. A partir de esto se determinó la semivida de eliminación del complejo tilosina.

El antimicrobiano se caracterizó por una rápida absorción por parte de las abejas, muy buena distribución entre las larvas de diferentes estadios, y semividas de eliminación relativamente prolongadas. El análisis de los parámetros PK/PD demostró la eficacia de tilosina

frente a *P. larvae*, y la misma fue corroborada a través del control del lote enfermo-tratado hasta un año de finalizado el tratamiento.

El nivel poblacional y la fase productiva de la colonia afectaron el perfil PK de tilosina en abejas y los niveles residuales resultantes en miel. El estado de enfermedad no resultó una variable de importancia desde el punto de vista farmacocinético, resultando los estudios realizados en colmenas sanas representativos.

Luego de transcurrido un año de la aplicación del tratamiento se hallaron niveles residuales de tilosina en miel. Las concentraciones determinadas no resultarían perjudiciales para salud pública en función de la IDA microbiológica determinada para el antimicrobiano. Sin embargo, la estabilidad del complejo tilosina en miel requiere de medidas adecuadas de reglamentación respecto de los niveles máximos permitidos.

Title: Pharmacokinetic study of tylosin in honey bees. Variables with impact in the residue levels in honey

Key Words: * Tylosin * American foulbrood * *Paenibacillus larvae* * Pharmacokinetics –PK- * Pharmacodynamics –PD-

Summary

The objective of this Magister Thesis was to contribute to the knowledge of the pharmacokinetic and pharmacodynamic behavior of tylosin in the apiarian exploitation, so as to increase efficiency, reduce the risks of resistance and ,especially, to reduce residual levels in honey.

From disease beehives with American foulbrood, 11 isolations of *P. larvae* were obtained so as to carry out susceptibility studies through the test of the disk diffusion and determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) against tylosin.

Thirty six beehives "*Apis mellifera*" were used, from which 6 experimental groups of 6 beehives each were conformed, taking into account three variables: level of population, time of the year of the treatment and health state. The administered dose in all experiments was 600 mg sprinkled over the ends of the frames top bars in the brood chamber.

The quantitation of the molecule in different biological matrixes was done by microbiological assay techniques. Concentrations were analyzed by non-compartmental model,

based on the theory of statistical moments. According to the MIC determined we performed the pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK/PD) integration.

A study of the stability of the tylosin in honey *in vitro* at three different storing temperatures (35°C, 20°C and 4°C) during 357 days was carried out. The kinetic order and the effect of the temperature on the degradation speed constant were discriminated by applying Arrhenius equation. From there the half-life of elimination of the tylosin complex was determined.

The antimicrobial agent was characterized by a quick absorption on behalf of the bees, a very good distribution among the larvae of different stages and a relatively extended elimination half-life. The analysis of PK/PD parameters demonstrated the efficacy of tylosin against *P. larvae* and this same was verified through the control of the sick batch, treated up to one year after having finished the treatment.

The population level and the productive phase of the colony affected the tylosin's PK profile in bees and the resulting residue levels in honey. The disease status did not result as an important variable from pharmacokinetic point of view; therefore studies conducted in healthy beehives are representatives.

After a year had gone by since the application of the treatment, residual levels of tylosin in honey were found. The determined concentrations did not end up being harmful to public health depending on the established microbiological IDA for the antimicrobial. Nevertheless, the stability of the tylosin complex in honey requires the adequate ruling decisions regarding the maximum allowed levels.

ÍNDICE

TÍTULOS Y RESUMEN	I
ÍNDICE	IV
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. MIEL.....	1
I.1.2. <i>Composición, características organolépticas, físico-químicas y microbiológicas</i>	2
I.1.3. <i>Propiedades nutricionales y terapéuticas de la miel</i>	5
I.1.4. <i>Producción de miel argentina</i>	7
I.2. ENFERMEDADES BACTERIANAS DE LA COLMENA	9
I.2.1. <i>Loque Americana</i>	9
Introducción	9
Agente etiológico.....	10
Epizootiología	11
Patogenia y signos clínicos.....	12
Diagnóstico bacteriológico	14
Tratamiento y control.....	15
I.3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ANTIMICROBIANO A ENSAYAR	19
I.3.1. <i>Introducción a los macrólidos</i>	19
I.3.2. <i>Propiedades físico-químicas de tilosina</i>	20
I.3.3. <i>Farmacodinamia</i>	21
I.3.4. <i>Farmacocinética</i>	22
I.3.5. <i>Eficacia clínica e indicaciones</i>	23
I.3.6. <i>Resistencia bacteriana a los macrólidos</i>	24
I.3.7. <i>Toxicidad</i>	25
I.4. RESIDUOS DE ANTIMICROBIANOS DE USO VETERINARIO EN ALIMENTOS.....	25
I.4.1. <i>Definiciones</i>	27
Medicamento veterinario.....	27
Residuos de drogas veterinarias	27
Antibiótico y antimicrobiano	27
Dosis NOEL (Non observable Effect Level- Nivel sin efectos observables).....	27
IDA (Ingesta diaria admisible)	28
LMR (Límite máximo de residuos).....	28
Período de restricción, suspensión o retirada.....	29
I.4.2. <i>Riesgos potenciales de la exposición a antimicrobianos presentes en alimentos</i>	29

Reacciones alérgicas.....	30
Toxicidad crónica	31
Alteración de la flora intestinal normal	31
Desarrollo de resistencias bacterianas	32
Interferencia en cultivos iniciadores	33
<i>I.4.3. Evaluación toxicológica y residuos de tilosina en productos comestibles</i>	<i>33</i>
Evaluación toxicológica	33
Residuos de tilosina.....	35
<i>I.4.4. Prevención de residuos y uso racional de antimicrobianos</i>	<i>36</i>
Modelización farmacocinética-farmacodinámica (PK/PD).....	38
I.5. RESEÑA Y SITUACIÓN ACTUAL DE LA TERAPIA ANTIMICROBIANA EN APICULTURA.....	40
I.6. HIPÓTESIS	45
I.7. OBJETIVOS	46
<i>I.7.1. Objetivos generales.....</i>	<i>46</i>
<i>I.7.2. Objetivos particulares</i>	<i>46</i>
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
II.1. ESTUDIO BACTERIOLÓGICO	49
<i>II.1.1. Materiales</i>	<i>49</i>
II.1.1.1. Productos, reactivos y materiales para microbiología.....	49
II.1.1.2. Material descartable y de laboratorio.....	50
II.1.1.3. Instrumental.....	51
<i>II.1.2. Método.....</i>	<i>53</i>
II.1.2.1. Aislamiento, identificación y selección de cepas de <i>Paenibacillus larvae</i>	54
II.1.2.2. Selección del antimicrobiano a través de pruebas cuali-cuantitativas de susceptibilidad bacteriana57	
II.2. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO	69
<i>II.2.1. Materiales</i>	<i>69</i>
II.2.1.1. Colmenas.....	69
II.2.1.2. Fármaco	69
II.2.1.3. Productos biológicos y reactivos.....	69
II.2.1.4. Material descartable y de laboratorio.....	70
II.2.1.5. Instrumental.....	71
II.2.1.6. Equipamiento informático.....	71
<i>II.2.2. Método.....</i>	<i>73</i>
II.2.2.1. Colmenas y diseño experimental	74
II.2.2.2. Administración del fármaco y toma de muestras	75
II.2.2.3. Procedimiento analítico	78
II.2.2.4. Análisis farmacocinético.....	85
II.2.2.5. Análisis estadístico.....	89

II.3. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE TILOSINA EN MIEL	91
II.3.1. <i>Materiales</i>	91
II.3.2. <i>Método</i>	91
II.3.2.1. Unidades y diseño experimental.....	91
II.3.2.2. Procedimiento analítico	92
II.3.2.3. Análisis matemático de los datos.....	92
III. RESULTADOS	99
III.1. ESTUDIO BACTERIOLÓGICO	99
III.1.1. <i>Aislamiento, identificación y selección de cepas de Paenibacillus larvae</i>	99
III.1.2. <i>Selección del antimicrobiano a través de pruebas cuali-cuantitativas de susceptibilidad bacteriana</i>	101
III.1.2.1. Prueba cualitativa de susceptibilidad por el método de difusión de discos.....	101
III.1.2.2. Prueba cuantitativa de susceptibilidad por el método de dilución en agar	102
III.2. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO	104
III.2.1. <i>Procedimiento analítico</i>	104
III.2.1.1. Validación del método microbiológico.....	104
III.2.2. <i>Análisis farmacocinético</i>	111
III.2.2.1. Ensayo otoñal en colmenas sanas con diferentes niveles poblacionales (lotes A y B).....	111
III.2.2.2. Ensayo otoñal en colmenas sanas y enfermas con iguales niveles poblacionales (lotes B, C y D).....	115
III.2.2.3. Ensayo en colmenas sanas en diferentes épocas productivas (lotes B y E)	119
III.2.2.4. Ensayo en colmenas sanas en época estival (lote F)	123
III.3. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE TILOSINA EN MIEL	127
III.3.1. <i>Estabilidad de tilosina en miel in vitro</i>	127
III.3.1.1. Procedimiento analítico	127
III.3.1.2. Degradación de tilosina en miel a diferentes temperaturas.....	127
III.3.1.3. Análisis matemático de los datos.....	129
III.3.2. <i>Estabilidad de tilosina en miel in vivo</i>	132
IV. DISCUSIÓN	134
IV.1. ESTUDIO BACTERIOLÓGICO	134
IV.1.1. <i>Aislamiento, identificación y selección de cepas de P. larvae</i>	134
IV.1.2. <i>Prueba cualitativa de susceptibilidad por el método de difusión de discos</i>	135
IV.1.2. <i>Prueba cuantitativa de susceptibilidad por el método de dilución en agar</i>	140
IV.2. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO.....	143
IV.2.1. <i>Dosificación y forma farmacéutica empleada</i>	143
IV.2.2. <i>Procedimiento analítico</i>	144
IV.2.3. <i>Efecto del nivel poblacional de la colmena sobre los parámetros farmacocinéticos y concentraciones de tilosina dosados en miel en otoño</i>	145

IV.2.4. Efecto de la época productiva sobre los parámetros farmacocinéticos e incidencia de residuos en miel.....	147
IV.2.5. Efecto de la ubicación de las alzas melíferas en la colmena sobre los niveles residuales de tilosina en miel.....	150
IV.2.6. Efecto del estado sanitario sobre los parámetros farmacocinéticos. Eficacia.....	151
IV.2.7. Estudio farmacocinético-farmacodinámico.....	152
IV.2.8 Modelo farmacocinético propuesto del comportamiento de tilosina dentro de la colmena	154
IV.3. ESTUDIO DE ESTABILIDAD	158
IV.3.1. Estabilidad de tilosina en miel in vitro	158
IV.3.2. Estabilidad de tilosina en miel in vivo	159
V. CONCLUSIONES	162
VI. ANEXO.....	164
VI.1. MICROBIOLOGÍA	164
VI.1.1. Preparación de soluciones y medios de cultivo.....	164
Agar MYPGP (75):.....	164
Agar BHI con agregado de tiamina (69)	164
Solución stock de ácido nalidixico (70)	165
Estándar de Mc Farland (237)	165
VI.1.2. Técnicas microscópicas para observación de <i>P. larvae</i> a partir de restos larvales y colonias bacterianas aisladas.....	165
Técnica de la gota pendiente modificada (76)	165
Tinción simple (76).....	166
Tinción de Gram.....	166
VI.1.3. Pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de la especie de <i>P. larvae</i>	167
Catalasa (69, 70)	167
Hidrólisis de caseína (78)	167
Reducción de nitratos a nitritos (69)	168
Hidrólisis de almidón (77).....	168
Crecimiento y supervivencia en caldo nutritivo (77)	168
Crecimiento en agar citrato de Simmons (62, 90)	169
Producción de indol (71, 91)	169
Producción de diacetilo (Voges- Proskauer)(62, 71, 88, 90).....	169
Licuefacción de gelatina (77)	170
VI.1.4. Diferenciación de <i>P. larvae</i> de otros microorganismos presentes en el apiario.....	171
VI.1.5. Prueba cualitativa de susceptibilidad por el método de difusión de discos.....	173
VI.1.6. Prueba cuantitativa de susceptibilidad por el método de dilución en agar.....	175
VI.2. FARMACOCINÉTICA.....	176

VI.2.1. Preparación de soluciones.....	176
Buffer fosfato de sodio pH 8.....	176
Buffer fosfato de sodio 0,007 M pH 8,5.....	176
Solución de hidróxido de sodio pH 14	176
VI.2.2. Preparación de diluciones patrones para la cuantificación de tilosina por método microbiológico	177
VI.2.2.1. Rango de concentraciones de tilosina entre 0,0078 y 4 µg/g de miel.....	177
VI.2.2.2. Rango de concentraciones de tilosina entre 0,125 y 2 µg/g de abejas.....	178
VI.2.2.3. Rango de concentraciones de tilosina entre 0,125 y 2 µg/g de larvas	179
VI.2.3. Validaciones	180
VI.2.3.1. Validación en miel	180
VI.2.3.2. Validación en abejas	185
VI.2.3.3. Validación en larvas.....	187
VI.2.4. Ensayos	189
VI.2.4.1. Tablas de concentraciones experimentales de tilosina determinadas por método microbiológico.....	189
VI.2.4.2. Tablas de parámetros farmacológicos obtenidos por análisis no compartimental	194
VI.2.4.3. Tablas de resultados estadísticos	201
VI.2.4.4. Figuras	203
VI.3. ESTABILIDAD	206
VII. REFERENCIAS.....	209

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABC/CIM	Área bajo la curva concentración tiempo dividida por la concentración inhibitoria mínima
$ABC_{0-\infty}$	Área bajo la curva concentración en función del tiempo extrapolada al infinito
ABC_{0-t}	Área bajo la curva de concentración en función del tiempo desde el tiempo 0 al tiempo t
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Agar J	Medio de cultivo compuesto por triptona, extracto de levadura, glucosa, fosfato de potasio
ANOVA	Análisis de la varianza
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ATCC	American Type Culture Collection
BHIT	Medio de cultivo infusión cerebro–corazón fortificado con tiamina
c.s.p	Cantidad suficiente para
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CIM_{50}	Concentración inhibitoria mínima capaz de inhibir al 50% de los aislamientos evaluados
CIM_{90}	Concentración inhibitoria mínima capaz de inhibir al 90% de los aislamientos evaluados
CLSI	Acrónimo del Instituto de estandarización de procedimientos de laboratorios clínicos de E.E.U.U. (ex NCCLS)
cm	Centímetro
cm	Centímetros
$C_{\max}$	Concentración máxima
$C_{\max}/CIM$	Máxima concentración plasmática dividida por la CIM
CO_2	Dióxido de carbono
CSA	Medio de cultivo agar Columbia con agregado de sangre de cordero
CV	Coeficiente de variación

DE	Desviación estándar
DL ₅₀	Dosis letal para el 50% de los individuos de experimentación en estudio
ds	Días
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERIC	Iniciador o cebador específico en el ensayo de PCR. También se mencionan BOXA, REP
g	Gramo
h	Hora/s
IDA	Ingesta diaria admisible
<i>k</i>	Constante de pasaje
<i>k_{el}</i>	Constante de eliminación
Kg	Kilogramo
km	Kilómetro
LA	Loque americana
LE	Loque europea
LMR	Límite máximo de residuos
M	Molaridad
MDR	Acrónimo inglés de resistencia a múltiples drogas
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitro
MLS _B	Fenotipo de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas
mm	Milímetro
MS _B	Fenotipo de resistencia a macrólidos y estreptograminas
MYPGP	Medio de cultivo conteniendo caldo Müller-Hinton, extracto de levadura, fosfato de potasio, glucosa y piruvato de sodio
n	Número de mediciones

nm	Nanómetro
NMEL	Dosis sin efecto microbiológico
NOAEL	Nivel sin efecto adverso observable
NOEL	Nivel sin efecto observable
°C	Grados centígrados
<i>P</i>	Probabilidad
p/v	Relación peso/volumen
PAE	Efecto post-antibiótico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-RFLP	Reacción en cadena de la polimerasa con posterior análisis de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción
PD	Farmacodinamia
PFGE	Electroforesis de campo pulsado
pH	Logaritmo de la inversa de la concentración de hidrogeniones
PK	Farmacocinética
pK _a	Constante de disociación para una base débil
PLA	Acrónimo de <i>P. larvae</i> agar
PM	Peso molecular
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
ppt	Partes por trillón
<i>r</i>	Coefficiente de correlación
r.p.m	Revoluciones por minuto
<i>r</i> ²	Coefficiente de regresión
Rep-PCR	Amplificación por PCR de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos
s	Segundos
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

$T_{1/2\lambda}$	Semivida de eliminación
$T_{>CIM}$	Tiempo durante el cual la concentración sérica excede la CIM del patógeno
$T_{m\acute{a}x}$	Tiempo al que se produce la concentración máxima
$TMR_{0-\infty}$	Tiempo medio de residencia extrapolado a infinito
TMR_{0-t}	Tiempo medio de residencia desde el tiempo 0 al tiempo t
UFC	Unidades formadoras de colonias
UI	Unidad internacional
v/v	Relación volumen/volumen
WRL	Límite máximo de trabajo
$\bar{X}$	Media aritmética
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micra
∞	Infinito
α	Probabilidad
λ	Constante de la tasa eliminación
$>$	Mayor que
$<$	Menor que
$\pm$	Más o menos
$\leq$	Menor o igual que
$\geq$	Mayor o igual que
%	Porcentaje

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Miel

I.1.1. Definición y origen

La miel es un fluido dulce y viscoso producido por las abejas melíferas a partir del néctar de las flores o de secreciones de partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos succionadores de plantas. Las abejas lo recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias; lo almacenan y dejan madurar en los panales de la colmena (1).

La miel es un producto que cuenta con importantes atributos naturales y que no necesita de tratamientos para ser mejorada (2, 3). Es el único edulcorante obtenido directamente de la naturaleza y uno de los alimentos tradicionales más completos, debido a sus propiedades organolépticas y a su alto poder energético y nutritivo (4).

El néctar es la fuente principal de la que se origina la miel. Es segregado por órganos especializados de la planta llamados nectarios, situados generalmente en la base de la corola (nectarios florales) y también en las diversas partes de la planta (cotiledones, hojas, estípulas, brácteas y tallos) constituyendo los nectarios extraflorales (5, 6). Otra fuente de la que puede derivarse la miel es el mielato (o melaza), secreción azucarada emitida por insectos picadores y chupadores, principalmente pulgones, que viven parásitos sobre las plantas, succionando de ellas la savia elaborada (6, 7).

Las abejas pecoreadoras añaden al néctar o al mielato que recogen, las secreciones glandulares salivares ricas en enzimas, las que inician la transformación de la sacarosa en sus componentes glucosa y fructosa. Una vez lleno su buche de mielato o néctar, transportan su carga hasta la colmena, donde distribuyen su colecta entre las obreras de interior y los zánganos. Posteriormente, es transmitida en varias ocasiones de una a otra abeja por trofolaxia, experimentando cada vez una adición de saliva hasta finalmente ser depositada en la celda (7).

Cuando el néctar llega a la celda ha completado ya transformaciones tales que no puede considerarse néctar, sino más bien "miel no madura" (6). La concentración tiene lugar, a través de la succión de una pequeña cantidad de miel desde la celda por parte de las abejas y por ejercicio de proyección y retracción de su lengua, formando una película con el contenido que va perdiendo agua por evaporación al exponerse a la corriente de aire caliente de la colmena. Esta maniobra permite concentrar hasta un contenido de agua del 40-50% (7). El fenómeno físico de

evaporación es particularmente activo también en las celdas, por efecto de la intensa ventilación operada por las abejas sobre los panales. Cuando el contenido en agua queda reducido a un 18%, la miel, considerada madura, es cubierta con un opérculo de cera para impedir el contacto con el aire, del que podría absorber agua (6). En tales condiciones permanece en las celdas del panal y completa así su transformación bioquímica hasta ser recogida por el apicultor o por las mismas abejas para la alimentación propia.

I.1.2. Composición, características organolépticas, físico-químicas y microbiológicas

La miel es un producto biológico muy complejo, que varía notablemente en su composición como consecuencia de la flora de origen, de la zona y de las condiciones climáticas (6, 8, 9, 10, 11). Definiéndose los diferentes tipos en función de sus principales características organolépticas, como son color, aroma, sabor, consistencia y la mayor o menor facilidad para cristalizar durante el manejo y almacenamiento.

Es una sustancia formada, esencialmente de diferentes azúcares, predominantemente fructosa y glucosa, además de otras sustancias como ácidos orgánicos, aminoácidos, enzimas, minerales y partículas sólidas derivadas de la recolección (2, 3).

En términos generales se encuentra constituida por un 80-85% de carbohidratos, 15-17% de agua, 0,3% de proteínas, 0,2% de cenizas y en menor cantidad los otros componentes mencionados anteriormente (aminoácidos, vitaminas, etc.).

El contenido en agua es sin duda una de las características más importantes porque influye en el peso específico, en la viscosidad y en el sabor, condicionando por ello la conservación, la palatabilidad, la solubilidad y, por consiguiente el valor comercial (6), siendo el único criterio de composición de la miel, que debe ser cumplido como parte de los estándares para su comercialización mundial (12). El contenido hídrico de una miel madura debe rondar el 17% (13).

Los azúcares representan del 95% al 99% de la materia seca de la miel (6) siendo los monosacáridos glucosa y fructosa los constituyentes básicos (14, 15). En la mayor parte de las mieles florales existe un predominio de la fructosa sobre la glucosa (6), determinando esto que las mismas presenten una rotación óptica levógira, mientras que aquellas mieles que proceden de mielatos presentan una rotación dextrógira (16); a razón de la elevada cantidad presente de oligosacáridos no reductores como la melecitosa, la maltotriosa y la rafinosa (12).

Todas las mieles tienen reacción ácida (pH medio 3,9) debido a la presencia de ácidos orgánicos (algunos volátiles) y ácidos inorgánicos. El componente más importante es el ácido glucónico, que se forma de la glucosa por reacción enzimática (6).

Las proteínas y vitaminas (hidrosolubles), presentes en cantidades mínimas, provienen esencialmente del polen, no así las enzimas, que tienen un origen tanto animal como vegetal, siendo las más importantes: la diastasa o amilasa (hidroliza el almidón en glucosa), la invertasa o sacarasa (hidroliza la sacarosa en glucosa), glucosidasa, catalasa y fosfatasa.

En cuanto a las sales minerales, su contenido es más bien escaso (0,1–0,2%) variando notablemente con relación al origen botánico, a las condiciones edáfico-climáticas y a las técnicas de extracción. El elemento dominante es el potasio seguido de cloro, azufre, sodio, calcio, fósforo, magnesio, manganeso, silicio, hierro y cobre (6).

El color de la miel es una característica importante utilizada en su clasificación; varía, desde casi incoloro a pardo oscuro, debido a pequeñas cantidades de materias pigmentarias como el caroteno y la xantofila (17). Existen mieles rojizas, amarillentas o verdosas, de acuerdo al origen floral, geográfico y estacional en que son producidas y recolectadas (18). El fenómeno de la caramelización de los azúcares durante el envejecimiento o el calentamiento provoca una intensificación del color con el tiempo (13). En la provincia de Buenos Aires son predominantes los colores ámbar claro, ámbar extra claro y ámbar (19).

La amplia variedad de flores que atraen a las abejas origina una multiplicidad de sabores y aromas, específicos de cada fuente. El *flavor* característico de la miel incluye una nota ácida, debida fundamentalmente a la presencia del ácido glucónico, en equilibrio con la gluconolactona. También influyen en el sabor los polifenoles, los aminoácidos y en algunos casos, notas específicas amargas o compuestos no volátiles, además de los compuestos que originan el dulzor (18).

La consistencia de la miel puede ser fluida, viscosa o cristalizada total o parcialmente. En general, el fenómeno de cristalización ocurre en casi todas las mieles con el tiempo, dependiendo entre otros factores de la concentración de glucosa y la relación glucosa/agua (3, 20, 21).

Por ser la miel una sustancia viva, sus componentes experimentan modificaciones con el transcurso del tiempo. Una conservación demasiado larga o un calentamiento excesivo y/o prolongado, determinan degradaciones que conducen a una destrucción de las enzimas (diastasas e invertasas), a una pérdida de las sustancias volátiles responsables del aroma junto a un aumento de la intensidad del color, de la acidez y del hidroximetilfurfural. En todo caso, las

alteraciones más aparentes son las que se refieren a la tasa de hidroximetilfurfural y a la actividad enzimática (6).

En la actualidad, a la hora de evaluar la calidad de la miel se tienen en cuenta los siguientes criterios: contenido de humedad, azúcares reductores aparentes, sacarosa aparente, sólidos insolubles en agua, minerales (cenizas), acidez, actividad diastasa e hidroximetilfurfural (12, 22). Sin embargo, se ha propuesto la determinación de la conductividad eléctrica y el contenido específico de azúcares como nuevos estándares internacionales de calidad y a la actividad invertasa, contenido de prolina y rotación específica como factores adicionales de calidad (12).

La carga microbiana de la miel, en principio, se puede considerar baja y con una limitada variedad de microorganismos, si se compara con otros productos de origen animal como la leche por ejemplo. Es un medio naturalmente hostil, debido en especial a su baja actividad de agua, alta presión osmótica, bajo potencial redox y a su pH ácido (6, 23, 24), sumado a la presencia de sustancias con propiedades antimicrobianas como peróxido de hidrógeno (19), fitoquímicos (19, 25), componentes fenólicos (derivados fenólicos del ácido benzoico, ácido cinámico y flavonoides) (26, 27) y lisozima (28, 29, 30). Componentes que se oponen a la proliferación de los microorganismos, aunque pueden permanecer bajo la condición de viables durante largo tiempo, desarrollándose bajo circunstancias favorables (31).

Como producto de origen natural las mieles de *Apis mellifera*, presentan una flora microbiana propia, al igual que el resto de los productos alimentarios, pero con un comportamiento microbiológico característico. La flora microbiana habitual es introducida por las abejas en la colmena con el néctar, polen o mielato; o provienen del tracto digestivo de las mismas o de los panales pasando a la miel durante las operaciones de limpieza, al vehiculizarlos sobre o dentro de sus organismos (31). En este orden, se pueden presentar bacterias del género *Bacillus* y *Clostridium* que bajo determinadas condiciones pueden producir enfermedad en humanos (32, 33, 34), así como patógenos de las abejas (*Bacillus alvei* y *Paenibacillus larvae*). Otros microorganismos de interés incluyen mohos de los géneros *Penicillium*, *Mucor* y levaduras del tipo osmófilo pertenecientes al género *Saccharomyces*, responsables de la fermentación de la miel, cuando las condiciones de humedad lo permiten. Otros agentes considerados como ocasionales o accidentales, son introducidos en las mieles de manera fortuita o por manipulaciones poco higiénicas durante la extracción, procesado, envasado o conservación (25, 35). Entre estos microorganismos existen diferentes géneros, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* como *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp* (33). Así como los agentes

de contaminación primaria son de muy difícil control, los de contaminación secundaria pueden ser controlados mediante el empleo de buenas prácticas de manufactura (36).

Entre las degradaciones biológicas que ocurren en la miel, la más grave y frecuente es la fermentación a cargo de hongos y levaduras, que llevan a la pérdida de las características organolépticas originales cuando la actividad acuosa (a_w) alcanza el umbral necesario y es en este punto donde radica la importancia del contenido de humedad en las mieles.

I.1.3. Propiedades nutricionales y terapéuticas de la miel

Desde el punto de vista de su valor alimenticio, la miel es un jarabe natural sin refinar, que produce una gran cantidad de energía (297 calorías cada 100 gramos). Posee la propiedad de ser asimilada directamente por el organismo, sin necesidad de sufrir transformaciones como en el caso de los di y polisacáridos, que requieren un mayor trabajo del hígado, páncreas e intestinos. Presenta mayor poder edulcorante que el azúcar y debido a la forma rápida y fácil en que la miel suministra dichas calorías, hacen que constituya un alimento de primer orden, especialmente para niños, ancianos y enfermos.

La miel ejerce una importante acción dinámogena, facilita la asimilación y digestión de calcio y magnesio, tiene propiedades laxantes y de regulación del funcionamiento intestinal, así como sedantes, antitóxicas, antisépticas, antianémicas y febrífugas (3).

Existe una demanda de miel creciente para uso industrial (37), ya que la miel contribuye a humectar los alimentos, en especial, los preparados de confitería tales como las masas; eliminando la sequedad y la porosidad de estos preparados y mejorando la textura de los productos horneados, dando la impresión de una apariencia húmeda y brillante en su superficie. Otra cualidad deseada es la excelente presentación que se obtiene en la gratinación de carnes principalmente de aves y en la saborización, siendo el ácido glucónico, el resaltador de sabor de los preparados. La forma de saborizar que posee la miel es muy interesante para aplicarla a la elaboración de productos lácteos (el yogurt con miel ha tenido éxito en países como España o Brasil) y en la preparación de dulces, mermeladas y caramelos. Por último, la importante actividad antioxidante que posee, permite la conservación de distintos tipos de alimentos, siendo muy útil en el caso de las frutas secas y frescas (3).

Por su poder endulzante se están realizando estudios para utilizar la miel en dietas para diabéticos ya que la fructosa es absorbida más lentamente por el tracto gastrointestinal que la

glucosa y es incorporada más rápidamente por el hígado. Los niveles de azúcar en la sangre aumentan mínimamente después de la ingesta de fructuosa.

Los diferentes aspectos de las propiedades antibacterianas de la miel han sido extensivamente revisadas (24), demostrando que la miel resulta activa frente a un amplio rango de especies bacterianas y fúngicas, muchas de las cuales resultan patógenas para el ser humano. Existen dos tipos de agentes antibacterianos, uno de ellos sensible a la luz y al calor que tienen su origen en el peróxido de hidrógeno producido por las glucosa oxidasas de la miel y otro grupo en el cual se agrupan los denominados agentes antibacteriales no-peróxidos, insensibles a la luz y al calor, que se mantienen intactos luego de largos períodos de almacenaje. Sin embargo, aún hoy no se conoce con certeza la identidad química de la totalidad de las sustancias responsables del poder antimicrobiano, así como su participación cuantitativa ni tampoco su origen (38).

A pesar que la literatura popular sobre salud y automedicación genera la impresión que la miel puede ser administrada para curar casi todo tipo de dolencia, una consideración racional sería valorar a la miel como un agente antimicrobiano de utilización tópica más que como un agente sistémico, a pesar que existen algunas situaciones particulares como infecciones gastrointestinales o mastitis donde la miel puede permanecer localizada sin sufrir significativa dilución que impida su acción (39).

La utilización como ungüento sobre heridas, un remedio antiguo que ha sido redescubierto (40), se ha vuelto de creciente interés a raíz del mayor número existente de reportes publicados que avalan su eficacia (41, 42, 43). Dentro de los efectos beneficiosos reportados se pueden citar: reducción de la inflamación, edema y dolor, efecto bacteriostático o bactericida en heridas infectadas, rápido reemplazo de tejido necrótico o gangrenoso por tejido de granulación e impedimento de la implantación tumoral en heridas por instrumental contaminado luego de cirugías laparoscópicas (44). Tiene como características además, que no es irritante ni tóxica, fácilmente aplicable y más comfortable que otros ungüentos.

En estudios *in vitro* con *Helicobacter pylori* (una de las causas de gastritis), se demostró que esta bacteria es inhibida por una solución de miel al 20% (45), lo que justifica su tradicional utilización en casos de dispepsia y úlcera péptica. En tratamientos de gastroenteritis bacteriana en infantes se encontró que la miel disminuye la duración de diarrea causada por organismos tales como *Salmonella*, *Shigella* y la *E. Coli* (46). Los investigadores recomiendan a la miel como un sustituto seguro de la glucosa en fluidos de rehidratación oral. Además, por el alto contenido de azúcares puede ser usada para promover la absorción de sodio y agua en el intestino.

Otra de las aplicaciones beneficiosas en estudio es su factible utilización en tratamientos de mastitis bovina (47) y en micosis superficiales causadas por tiñas (48).

I.1.4. Producción de miel argentina

La apicultura argentina ha experimentado en las últimas décadas una importante expansión a través de numerosos productores agropecuarios que se volcaron hacia esta actividad, no sólo incrementando el número de colmenas, sino también logrando mejoras en los rendimientos unitarios (25). Hasta 1958 la producción era de unas 7.000 toneladas anuales, alcanzándose en el año 2006 un volumen máximo de 104.000 toneladas de miel a granel y fraccionada (49). El notable crecimiento de la producción y exportaciones se debe al aumento de la demanda externa en mercados tradicionales y en nuevos mercados, acompañada por la disminución de la cosecha de miel en los principales países productores (por razones climáticas y sanitarias). La veda que impuso la Unión Europea, durante casi dos años, al ingreso de miel china debido a la detección de distintos tipos de residuos y las nuevas exigencias vinculadas con la calidad de los alimentos, entre otros puntos relevantes (50, 51), también colaboró a la expansión de su producción. A estos factores debe agregarse el proceso de devaluación argentino, que generó algunas ventajas competitivas, y una modificación sustancial en la estructura de costos y en el sistema de comercialización (52).

Dentro del mercado mundial, Argentina tiene un papel preponderante ya que es el primer exportador y el tercer productor después de China y Estados Unidos, perfilándose como segundo en el ranking, debido al notable incremento de la oferta (51). Se debe destacar que la producción argentina está destinada, casi en su totalidad, al mercado internacional (entre el 90% y el 92% se exporta). El 98% del producto comercializado es a granel, sin diferenciación en tambores de aproximadamente 330 kg, y solamente el 2% se exporta fraccionado, siendo nuestros principales destinos: Alemania, seguido por Estados Unidos, Italia, Reino Unido y España. En el año 2008 el total exportado alcanzó las 68.944 toneladas de miel, representando un ingreso anual de 178 millones de dólares (53).

La región pampeana es la cuenca melífera más importante de nuestro país; la mayoría de los colmenares se localizan en el norte de la provincia de Buenos Aires (60%), en Entre Ríos (11%), Córdoba (9%), Santa Fé (8%) y La Pampa (5%) (54). Según los datos del RENAPA (Registro Nacional de Productores Apícolas), la actividad apícola la desarrollan actualmente algo más de 33.000 productores que cuentan con alrededor de 3.991.000 colmenas. La producción media, si bien no

llega a las cifras de algunos países europeos, es significativa, pues se acerca a los 35 kg/colmena/año, existiendo muchas que producen entre 60 y 70 kg/año, especialmente en la provincia de Buenos Aires (49). La mencionada concentración en la provincia de Buenos Aires se explica por la proximidad de los centros consumidores de miel y por la abundancia y variedad de flora melífera. También son interesantes zonas apícolas, las regiones de riego de Mendoza y Río Negro; así como la provincia de Misiones. Prácticamente todo el país, con excepción de las mesetas patagónicas, es apto ecológicamente para la cría de abejas (54).

Las perspectivas de desarrollo de este sector se ven favorecidas por el hecho de que la cría de abejas se ha convertido en una alternativa de producción válida para diversificar y complementar las pequeñas y medianas explotaciones rurales (4), ya que posee una escasa o nula participación directa del recurso tierra (37). Otro punto importante a tener en cuenta, es que las posibilidades agroecológicas del país están aún subutilizadas para el rol que cumple la abeja melífera como agente polinizador de especies vegetales entomófilas, donde la presencia de insectos es imprescindible para asegurar la producción cualitativa y cuantitativa de frutos y semillas. Se estima que para cumplir correctamente con la polinización de estos cultivos serían necesarias al menos 6.000.000 de colmenas.

El mercado interno en nuestro país, se encuentra poco desarrollado debido, principalmente, a la escasa tradición en el consumo que ronda los 250 g/habitante/año (50). De la totalidad, alrededor del 75% se envasa para la mesa familiar y el 25% restante, se deriva al uso industrial como fábricas de dulces, galletitas, caramelos, confituras y otros (4). De todas maneras, los cambios en los hábitos de la población con una tendencia hacia el consumo de productos naturales y sanos, determinan una posible expansión de la demanda (50).

En cuanto a la calidad, la miel argentina está considerada como una de las mejores del mundo por sus características organolépticas y su composición química, que deben atribuirse a la variedad y abundancia de nuestra flora apícola (37, 50, 55). Es reconocida por su color claro, suave aroma y sabor, y baja humedad (55), permitiéndole satisfacer ampliamente las especificaciones contenidas en las normas de calidad del Codex Alimentarius Internacional sugerido por la FAO y la Organización Mundial para la Salud (OMS). Países tradicionalmente exportadores la adquieren para efectuar cortes que mejoren sus respectivas producciones (4, 54).

La miel se ubica de manera creciente en el segmento de los "*Healthy foods*" y la demanda de los consumidores apunta a productos saludables, asociados a un ambiente natural, limpio, puro y libre de químicos de síntesis (55, 56). Las preferencias de los consumidores no solo han

segmentado los mercados, sino que se ha avanzado hacia la seguridad alimentaria. La trazabilidad de los productos es un requisito que los países compradores de alimentos están exigiendo a todos sus proveedores, siendo actualmente la Unión Europea, quién lleva la delantera en la importación de éstas mieles.

Hoy nuestro país cuenta con los conocimientos y protocolos para producir y diferenciar las mieles especiales en orgánicas, o por su origen y niveles de calidad (4), sin embargo se carece aún de información completa sobre las propiedades y características de nuestras mieles en las diferentes áreas geográficas de nuestro país (16), a fin de obtener los mejores productos característicos de cada zona, aumentando el valor agregado. Para la obtención de mieles certificadas, también es necesaria la concientización de los productores para garantizar la máxima calidad del producto por medio de la aplicación obligatoria de las Normas de las “Buenas Prácticas de Manejo y Manufactura” (BPM) en todo el proceso del apiario, durante la cosecha y principalmente en las salas de extracción, para preservar las bondades naturales de un producto destinado a la alimentación humana (4).

I.2. Enfermedades bacterianas de la colmena

I.2.1. Loque Americana

Introducción

La Loque Americana (LA), es una enfermedad infecciosa bacteriana producida por *Paenibacillus larvae* (57). Afecta a la cría de las abejas en su etapa larval, y se caracteriza por un alto grado de patogenicidad y virulencia (58). Debido a que esta enfermedad provoca la muerte larval, las colmenas afectadas sufren un progresivo despoblamiento, que en general culmina con la muerte de la colonia si el tratamiento no es instaurado (59, 60, 61).

En la Argentina, fue oficialmente detectada en 1989 (62) y desde ese momento se diseminó, llegando a prevalencias mayores al 25% y provocando pérdidas anuales para la industria apícola cercanas al millón de dólares (55). En la Provincia de Buenos Aires, donde radica el mayor número de colmenas, la incidencia se aproxima al 55% (63).

Si bien esta enfermedad no supone ninguna amenaza para la salud humana es de alto impacto en la producción apícola, dado que desde su detección son muy pocos los países libres de esta enfermedad en el mundo (64). Actualmente, se encuentra clasificada en la lista B de

enfermedades de la OIE (OIE, 2004) y es de declaración obligatoria en nuestro país, Res. SENASA N°422/2003 (65).

Agente etiológico

Desde el punto de vista taxonómico, White (1907) describió la especie *Bacillus larvae* como el agente causal de la LA y Katznelson (66), cuarenta años más tarde, describió una especie estrechamente relacionada, *Bacillus pulvifaciens* causante de una enfermedad poco común, denominada "escama pulverulenta" (58). Estas dos especies, fueron transferidas a un nuevo género *Paenibacillus* en 1993 (67) y revisiones taxonómicas posteriores las describieron como pertenecientes a una misma especie, *P. larvae*, pero separadas a nivel subespecie: *P. larvae* subsp. *larvae* y *P. larvae* subsp. *pulvifaciens* (68). Genersch y colaboradores (57), propusieron recientemente, eliminar la designación de subespecie basados en un estudio taxonómico polifásico. El mencionado estudio incluyó morfología de las colonias y esporas, perfil bioquímico mediante API systems y técnicas moleculares. Dentro de éstas últimas se realizó SDS-PAGE de la totalidad de proteínas bacterianas, rep-PCR con primers ERIC y PFGE de ADN bacteriano. También se realizaron bioensayos de exposición que demostraron que las cepas ensayadas de ambas subespecies, incluyendo a las cepas de referencia, presentan diferencias sólo de genotipo, siendo variantes de un mismo patógeno que difieren principalmente en la virulencia.

El *Paenibacillus larvae* (57) es un bacilo Gram positivo delgado, de bordes ligeramente redondeados y con tendencia a formar cadenas de longitud variable (69). Las células vegetativas varían en su longitud desde 2,5-5,0 µm de largo por 0,5-0,6 µm de ancho, siendo algunas cepas móviles (70). Las esporas son de forma elipsoidal, se ubican en posición central a subterminal y miden aproximadamente 0,5-0,7 µm de ancho por 1,3-1,5 µm de largo (71). Cuando se tiñen con fucsina fenicada, la pared se colorea rojo púrpura mientras el centro permanece claro, presentan superficie lisa y altamente refractaria (69). Al observarlas sin coloración con el microscopio de contraste de fase, estas esporas presentan el característico movimiento Browniano.

La forma resistente, puede sobrevivir en el ambiente por largos periodos de tiempo, y recién luego de 35 años o más, presentar una disminución de la viabilidad (70, 72, 73, 74). Tolerancia condiciones adversas tales como la desecación, el calor (resisten 30 min a 100°C y 15 min a 120°C), y la acción de desinfectantes químicos como el cloro, formaldehído, productos basados en yodo y la radiación ultravioleta durante 20 min de exposición (58, 71).

El *P. larvae* se considera un microorganismo dificultoso para trabajar en el laboratorio, ya que no crece en medios de cultivo de rutina como el agar nutritivo (71). Necesita medios ricos en factores de crecimiento orgánicos como el agar MYPGP (75), agar BHIT (76), agar-J (77), agar PLA (78) y agar CSA (79), siendo necesario un inóculo de millones de esporas para iniciar el cultivo (80). En medio MYPGP, las colonias individuales son pequeñas, aproximadamente de 3-4 mm de diámetro, opacas, blanco-grisáceas, planas con superficie rugosa y bordes irregulares (70, 71).

Epizootiología

El origen geográfico de esta afección es desconocido, encontrándose en la actualidad en todos los continentes y en la mayoría de los países productores de miel (64). La enfermedad presenta una frecuencia no estacional, manifestándose en cualquier periodo del año en que la cría este presente, siendo usualmente diagnosticada durante la temporada activa de cría (71, 74).

Los cuadros de la colmena enfermos constituyen la mayor fuente de esporas bacterianas (81), las cuales representan la forma infectiva e inician el ciclo de la enfermedad (58, 74, 81, 82). Esta afección puede persistir, en forma endémica en una colonia, por un extenso periodo de tiempo (1 a 3 años) antes de que la aparición de signos clínicos pueda ser detectada (74, 83).

Las larvas de todas las castas son susceptibles a la infección, aunque en general sólo se afecta la cría de las abejas obreras y ocasionalmente la de los zánganos y las reinas (70). Las larvas pueden infectarse por dos vías: a través de las abejas nodrizas o por las esporas remanentes en la base de las celdas que previamente han contenido larvas infectadas (83). Las abejas nodrizas albergan a las esporas tanto sobre la superficie corporal (que está cubierta de pelos que pueden transportar esporas), como dentro de su tracto digestivo; de este modo, al alimentar a las larvas, transmiten oralmente la infección o inclusive lo hacen indirectamente contaminando a la celda (58).

Una particularidad, la constituye el hecho de que las esporas no pueden germinar tan fácilmente en larvas adultas y normalmente no alcanzan el epitelio intestinal, siendo eliminadas con las heces (80). Por lo tanto, el número de esporas requerido para infectar a una larva aumenta con la edad. Mientras que la DL_{50} para larvas de un 1 día está estimada en 8,49 esporas (84), varios millones son necesarios para infectar a una larva de 4 a 5 días de edad (83).

Estudios realizados entre líneas de abejas susceptibles y resistentes revelan que debe tenerse en cuenta un factor de 2 para determinar la dosis infectante de esporas que produzcan síntomas clínicos. Sin embargo, Genersch y colaboradores (85) han demostrado que las

diferencias de virulencia entre cepas de *P. larvae* tiene un impacto mayor a la tolerancia entre líneas genéticas, encontrándose diferencias en la DL_{50} que varían en un factor de 10. Estos resultados, indican que a partir de la cuantificación de esporas en un cuadro, es muy difícil predecir la aparición o no de signos clínicos en una colonia infectada (61).

Las abejas adultas propagan la enfermedad dentro de la colmena cuando, en el intento de remover las larvas muertas de las celdas, ensucian su aparato bucal o cuerpo con esporas que trasladan a otras partes del interior de la colmena, especialmente panales, cuadros, paredes de las colmenas e incluso a los alimentos como miel y polen (74, 82).

La diseminación de la enfermedad dentro del apiario, entre apiarios o incluso entre países es facilitada por las mismas prácticas realizadas por el apicultor, como alimentación con miel o polen contaminado, intercambio de cuadros entre colmenas sanas y enfermas, manejo de numerosas colonias en espacios confinados que permiten el pillaje y deriva de abejas (73); así como el comercio internacional de miel y abejas sin control sanitario (61, 82).

Patogenia y signos clínicos

Una vez dentro del intestino de la larva, las bacterias desesporulan después de un período variable que fluctúa entre las 24 y 48 horas, originando así las formas vegetativas que migran al epitelio intestinal y lo atraviesan en el momento de la metamorfosis. Rápidamente, invaden la hemolinfa dónde se multiplican y esporulan nuevamente (58, 71). A partir de ese momento la bacteria sigue su desarrollo y reproducción velozmente, ocasionando la muerte de la cría por septicemia generalizada entre los 7 y 12 días post infección, dependiendo de la virulencia de la cepa (85). Luego de transcurridos varios días la larva se deseca y adquiere un color negro, denominándose “escama”, con muy alto poder infectivo (80), ya que cada larva muerta produce cerca de 2,5 billones de esporas (71, 74, 80, 83, 86).

Todos los representantes de la especie *P. larvae* resultan patógenos para las larvas de abejas y dependiendo de la DL_{100} de la cepa, las larvas infectadas mueren antes o después de pasar al estado de pupa (57) como puede observarse en la Figura I.1. Los signos clínicos típicos de la enfermedad sólo tienen curso cuando las larvas mueren una vez operculadas las celdas. Cuando las larvas infectadas, se encuentran moribundas o muertas antes del estado de pupa, las abejas nodrizas tienen la posibilidad de removerlas; haciendo más difícil la aparición de signos y el diagnóstico clínico de la enfermedad. Estas diferencias tienen importancia en la probabilidad de la progresión de la enfermedad como peste, ya que la acumulación de esporas y la dispersión de las

mismas dentro de la colmena y entre colmenas es dependiente del número de esporas producidas, siendo este número mayor cuando las larvas mueren en las celdas operculadas (61).

El curso de la enfermedad en las colonias infectadas es variable, pudiendo desarrollarse tres diferentes escenarios, que ocurren en iguales proporciones: la infección rápidamente lleva a la muerte de la colonia, la misma puede desaparecer sin recurrencia o puede reaparecer causando la muerte de la colmena (83, 86, 87).

Figura I.1: Estadios del desarrollo larval y momento en que afecta la Loque Americana el ciclo de vida de la abeja

Los signos clínicos son muy diversos y dependen del genotipo involucrado, la fase de la enfermedad y la fortaleza de la colonia (70). En colonias severamente infectadas, la cría en los panales enfermos se encuentra distribuida en forma irregular, con celdas abiertas y operculadas

dando un aspecto de mosaico (patrón de cría salteado) (74). Estas celdas afectadas tienen los opérculos hundidos y oscurecidos, de apariencia húmeda y con perforaciones irregulares debido a la limpieza sanitaria parcial que efectúan las mismas abejas. En el interior de las mismas, las larvas muertas extendidas a lo largo de su pared inferior muestran un cambio de color que va desde el blanco amarillento, marrón claro a marrón oscuro a medida que transcurre el tiempo. La consistencia de este material es viscoso-filamentoso, pudiéndose estirar formando hebras o hilos de dos centímetros o más de largo al macerar estos restos con un palillo dentro de la celda y retirarlo suavemente ("prueba de la cerilla"). Esta masa finalmente se seca formando una costra u escama de color marrón oscuro casi negro, muy delgada y firmemente adherida al piso y a la pared inferior de la celda, difícil de extraer de las mismas. Cuando la muerte ha sucedido en la etapa de la pupa, la escama puede mostrar la lengua pupal (proyección filiforme que se extiende desde la escama hacia el centro de la celda de la cría) (58, 71, 74). En casos muy avanzados de enfermedad, es notable percibir un fuerte olor pútrido y penetrante en los marcos afectados, similar al olor de la cola de carpintero (76, 80).

A pesar de que la bacteria tiene la capacidad de matar a la colonia de abejas, en algunos casos las colmenas no desarrollan nunca los síntomas clínicos visibles al apicultor (59).

Diagnóstico bacteriológico

El diagnóstico de la enfermedad se basa en la identificación del agente patógeno y la presencia de signos clínicos. El análisis se puede realizar sobre un amplio espectro de muestras, sin embargo en la práctica la elección de las mismas dependerá si se trata de una colonia sospechosa o enferma, o se realiza en el contexto de programas de monitoreo y prevención (70). Algunos métodos de identificación requieren un paso previo de cultivo, mientras que otros pueden llevarse a cabo directamente sobre las muestras recolectadas.

Las técnicas comúnmente utilizadas comprenden el examen microscópico, cultivo en medios selectivos y pruebas bioquímicas, así como procedimientos inmunológicos o de ingeniería molecular:

a. Examen microscópico: se emplean las técnicas de *hanging-drop* (técnica de la gota pendiente modificada) (76), tinción simple (71, 76, 82) y tinción de Gram (70, 76). La técnica del *hanging drop* consiste en realizar un preparado a partir de restos larvales con síntomas sospechosos, el cual se tiñe con fucsina fenicada para evidenciar la característica del microorganismo de exhibir movimiento Browniano, mientras que las esporas y células vegetativas

de otras especies bacterianas asociadas con la Loque Europea (LE) u otras enfermedades permanecen fijas al cubreobjetos (71).

b. Técnicas microbiológicas de aislamiento e identificación: se realizan cultivos del microorganismo a partir de un amplio espectro de muestras (larvas, miel, polen, cera, jalea real y abejas adultas) (62, 69, 70, 71, 77, 78, 79, 88, 89, 90, 91), utilizando medios enriquecidos (agar MYPG, BHIT, PLA o CSA) que pueden convertirse en semiselectivos por el agregado de ácido pipemídico y/o nalidíxico (92). Una vez desarrollado el crecimiento bacteriano, las colonias sospechosas se someten a pruebas bioquímicas que permiten identificar y diferenciar al *P. larvae* entre los posibles microorganismos presentes en el apiario (Tabla V.1. del Anexo). Se pueden citar entre las pruebas de rutina: catalasa, hidrólisis de caseína, reducción de nitratos a nitritos, hidrólisis de almidón, crecimiento y supervivencia en caldo nutritivo, crecimiento en agar citrato de Simmons, producción de indol y producción de diacetilo (Voges-Proskauer) entre otras.

c. Detección por PCR: la mayoría de estos métodos se basan, ya sea en la amplificación al azar de regiones del genoma empleando distintos primers (BOXA, REP, ERIC)(93, 94, 95), como en la amplificación específica del gen ARNr 16S (96, 97, 98). También se realizan técnicas combinadas como PCR-RFLP (99), o protocolos de PCR anidada (100).

d. Técnicas inmunológicas: estas técnicas al igual que las de detección por PCR, tienen la ventaja que se pueden utilizar tanto para la identificación de colonias bacterianas resultantes de un cultivo previo o en forma directa para examinar restos larvales sospechosos. Se encuentran desarrolladas distintas técnicas de inmunodifusión (70), inmunofluorescencia (69, 101) y ELISA (70).

Tratamiento y control

El control de la enfermedad debe basarse en dos ejes primordiales, la instauración y aplicación de medidas preventivas y medidas higiénico profilácticas. Las primeras consisten en la aplicación de adecuadas prácticas de manejo con la finalidad de reducir las posibilidades de diseminación entre las colonias, y las medidas higiénico profilácticas que abarcan la eliminación de colonias afectadas, los materiales provenientes de las mismas y la aplicación de ciertos métodos que permitan salvar su población, además de una correcta desinfección del material apícola restante con el objeto de reducir la carga de esporas en el apiario (74).

Los factores a tener en cuenta en la elección del método son entre otros: el momento del año en que se presenta el problema, el tamaño de los apiarios, el número de colmenas afectadas por la enfermedad y el grado de infección de las mismas, así como el tipo de manejo de las

colmenas, la presencia de otras enfermedades, el costo de los equipos apícolas y la infraestructura que disponga el apicultor (74). Las principales herramientas de las que se disponen en la actualidad son:

a. Destrucción total por fuego de las colonias: es el método más eficaz para disminuir la prevalencia de la enfermedad, aunque es difícil de aplicar cuando el número de colmenas en un apiario es elevado, debido al alto costo que ello implica (74, 82).

b. Destrucción parcial por fuego:

-sin recuperación del material vivo: Los cuadros con crías muertas, con polen y las abejas son destruidos. El resto de los materiales de la colmena: piso, alzas, techo, rejilla excluidora, entretapa y cuadros se pueden rescatar y reutilizar previa desinfección o esterilización de los mismos. La cera y miel contaminadas de los panales no destruidos puede ser enviada a procesadores con un rótulo que aclare su procedencia.

-con recuperación del material vivo: Los cuadros con crías muertas y con polen son destruidos. Las abejas son recuperadas (enjambre artificial o trasvase simple) y el resto del material de la colmena es desinfectado y reutilizado.

Método del paquete o enjambre artificial: consiste en transferir las abejas adultas (formando un paquete de aproximadamente 1,8 Kg de peso) y su reina a un núcleo limpio sin marcos de cera, de modo que la miel que las abejas llevan en su buche melario (conteniendo esporas) se emplea para construir el panal (71). En un primer momento, se colocan las abejas con la reina enjaulada y un alimentador con jarabe en un lugar fresco y oscuro durante 48 a 72 horas. Transcurrido este lapso, el paquete se coloca y libera en una cámara de cría desinfectada preparada con tres marcos con cera estampada y un alimentador con jarabe, a la vez que se libera la reina. Posteriormente, una vez ubicada la colmena en su lugar definitivo se abre la piquera, se llena nuevamente el alimentador y se realiza tratamiento con antibiótico para aumentar su efectividad (74).

Método de la sacudida, cepillado o trasvase simple: Consiste en sacudir o cepillar las abejas de los panales de colmenas afectadas en un cajón núcleo o colmena desinfectada provista con tres o cuatro cuadros con cera estampada en los que se ubicó previamente la reina y un alimentador con jarabe, en el mismo lugar que ocupaba la colmena enferma. Una vez que las abejas hayan labrado los cuadros con cera estampada y que comience a observarse cría abierta se medica con antibiótico. Este método es más sencillo que el anterior pero menos efectivo, la

enfermedad puede reaparecer en las nuevas colonias de esta forma desarrolladas. Su efectividad se calcula en un 80% (74).

c. Tratamiento antibiótico: La terapia antimicrobiana elimina los síntomas de la enfermedad en las colmenas, actuando únicamente en la etapa vegetativa del ciclo de vida de la bacteria (71, 74). No tiene acción sobre las formas esporuladas, siendo necesaria la acción propia del apicultor para disminuir su número al desinfectar o esterilizar los materiales contaminados. Por lo tanto, la aplicación de medicamentos sólo se recomienda cuando la enfermedad está presente en el apiario y no en forma preventiva, además de ir acompañada siempre de medidas higiénico-profilácticas sobre los materiales infectados (74).

La eficacia del tratamiento antibiótico varía significativamente, pero resulta económicamente atractiva cuando la enfermedad se halla ampliamente diseminada en los colmenares de una zona (área endémica), aunque no se recomienda cuando el número de colonias afectadas es mediano o bajo (83). En este último caso se aconseja la quema de colmenas o el enjambrado artificial (71).

Las formulaciones que usualmente se utilizan para administrar los antimicrobianos son:

–En polvo: la dosis total por colmena se mezcla con azúcar impalpable o azúcar finamente molida y la aplicación puede ser:

Por espolvoreo: se esparce sobre los cabezales de los cuadros, en la cámara de cría, una dosis de la mezcla evitando que la misma entre al interior de las celdas con cría para que el producto no toque a las larvas. La dosis total se suministra en 3 a 6 veces a intervalos semanales (74).

En sobres o paquetes (*paper pack*): la mezcla se coloca en sobres o paquetes hechos con papel absorbente sobre la cámara de cría, tardando las abejas 1 semana en remover el papel y consumir el fármaco (71). Para aumentar la palatabilidad de la formulación puede agregarse gelatina de cereza. Se puede aplicar en un solo sobre la dosis total o dividir la misma en dos aplicaciones espaciadas por un intervalo de quince días (74).

–En jarabe: se mezcla el antimicrobiano en la dosis recomendada en un jarabe de sacarosa y se suministra a intervalos semanales. Se debe preparar en la cantidad necesaria a aplicar en el momento y entregado a la colmena de modo tal que el mismo sea consumido rápidamente por las abejas, no siendo así almacenado en los panales (74).

-En tortas medicadas (*patties*): son formulaciones preparadas en base a una mezcla de azúcar, aceite vegetal y antimicrobiano en proporción 7:3:1, las que se colocan sobre los marcos y las abejas consumen durante un período de 6-8 semanas (71).

Todas estas formas de medicación son empíricas y se fundamentan en pruebas de eficacia no críticas. Para seleccionar un plan de administración se deberían diseñar ensayos controlados que permitan aprovechar al máximo las características farmacocinéticas-farmacodinámicas de la molécula seleccionada.

d. Utilización de líneas genéticas de abejas resistentes a la infección: Estas abejas poseen una fuerte tendencia a desopercular las celdas que contienen larvas o pupas muertas y removerlas rápidamente (102, 103).

Los materiales de la colmena contaminados (alzas, cuadros, pisos, techos, rejillas excluidoras y entretapas) pueden ser sometidos a tratamientos físicos por las técnicas de inmersión en parafina, escorchado o radiación gamma (74, 104) o tratamientos químicos utilizando soda cáustica e hipoclorito de sodio (71, 83, 104):

a. Inmersión en parafina: consiste en sumergir todo el material en un baño de parafina caliente mantenido a 150 °C durante 10 min. Es una técnica económica y efectiva (105).

b. Escorchado o flameado: el método consiste en apilar 5-6 alzas invertidas sobre un piso, se rocían interiormente con kerosene y se prende fuego hasta que se quemen 2 mm internos, en ese momento se coloca un techo encima de la pila de alzas para ahogar el fuego. La segunda alternativa consiste en el empleo de un soplete a gas para flamear el interior de las alzas como también pisos y techos. En ambos casos, previamente se debe efectuar un raspado de los materiales para eliminar y quemar todo resto de cera y propóleos.

c. Radiación gamma: se somete el material a irradiación con rayos gamma provenientes de una fuente de cobalto-60 (Co-60). Es altamente confiable para la esterilización de la colmena completa, cuadros de cera labrados, polen y miel, excepto el material vivo (71, 104, 106, 107).

d. Soda cáustica: Se emplea un baño hirviente de soda cáustica (450 g de hidróxido de sodio en 38 L de agua) durante 10 a 20 min para remover los restos de cera y propóleos adheridos a los marcos, pisos y entretapas. Presenta el inconveniente del deterioro de las partes metálicas del material (71).

e. Hipoclorito de sodio: Se prepara una solución de hipoclorito de sodio en agua conteniendo 0,025% de cloro disponible, en la cual se sumerge el material a descontaminar

durante 20 min (108). Se retiran y lavan con abundante agua potable y se dejan secar. Esta solución no es aconsejable para materiales metálicos, ciertos plásticos e indumentaria del apicultor.

En diversos países se han propuesto varias estrategias para prevenir la aparición de brotes de la enfermedad. Como los apicultores son los principales responsables del contagio y diseminación, es importante que conozcan y practiquen las medidas de manejo y profilaxis para mantener lo más bajo posible los niveles de infección e interrumpir el ciclo de transmisión de la enfermedad, manteniendo la enfermedad bajo control.

Las investigaciones actuales están orientadas a la búsqueda de medidas preventivas basadas en el uso de prebióticos, productos fúngicos e inmunoprofilaxis (109). También la utilización de extractos alcohólicos de propóleos (110, 111), aceites esenciales (112, 113, 114, 115), fitofármacos (116) e inhibición por bacterias aeróbicas esporuladas (117, 118, 119).

I.3. Características generales del antimicrobiano a ensayar

I.3.1. Introducción a los macrólidos

Los macrólidos son una amplia familia de antimicrobianos naturales y semisintéticos obtenidos a partir de productos metabólicos del *Streptomyces* spp. Se caracterizan por estar constituidos por un anillo macrocíclico lactona (usualmente conteniendo 12-16 átomos) unido a dos o más fracciones de azúcar (120).

El clásico representante del grupo, eritromicina, fue descubierta en 1952, por McGuire (de Laboratorios Lilly), en los productos de fermentación de una cepa de *Streptomyces erythreus*, aislada de una muestra de tierra perteneciente al archipiélago de Filipinas (121, 122, 123). Los macrólidos con máximo potencial antibacteriano, son aquellos con anillo 14-, 15- o 16-membrado, la mayoría de los cuales son derivados de eritromicina (120, 124).

Son agentes bacteriostáticos que inhiben la síntesis proteica por su unión reversible a la subunidad ribosomal 50s en la célula procariota. Allí interfieren en la translocación, con la consecuente alteración en la formación del enlace peptídico, impidiendo al microorganismo sensible continuar con su ciclo vital (124, 125, 126). En determinadas condiciones pueden ejercer un efecto bactericida dependiendo de la concentración del antimicrobiano alcanzada en el sitio de infección, de la fase de crecimiento y la susceptibilidad de la especie bacteriana atacada (124).

Este grupo de antimicrobianos es particularmente activo contra bacterias Gram positivas y micoplasmas. Su actividad frente a anaerobios se considera favorable a buena, no siendo así frente a microorganismos Gram negativos, los cuales generalmente presentan resistencia (123).

La eficacia contra infecciones humanas de creciente importancia incluyendo *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Legionella* y *Mycobacterium* spp., ha generado el desarrollo de nuevos miembros con actividad antibacteriana superior, ventajas farmacocinéticas y escasos efectos colaterales (120). En medicina veterinaria los macrólidos de origen natural que se utilizan comúnmente son eritromicina, espiramicina y tilosina. En los últimos años han aparecido en el mercado macrólidos sintéticos de uso exclusivo en medicina veterinaria como tilmicosina, sintetizada a partir de tilosina y tulatromicina, derivada de los azálidos (123, 127).

Entre las principales ventajas de los macrólidos se pueden citar: las altas concentraciones intracelulares alcanzadas, amplia distribución tisular, semividas prolongadas y actividad contra importantes patógenos microbianos (120). La capacidad de concentrarse a nivel intracelular, principalmente dentro de los macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (126) puede incrementar el rendimiento de los mecanismos asociados a la inmunidad celular, ya que son transportados en el interior de estas células por repuesta quimiotáctica al sitio de infección (123). A pesar de existir aún desconocimiento de los parámetros farmacodinámicos que gobiernan la actividad intracelular, el alto nivel de acumulación en el interior celular así como la distribución dual en lisosomas y citosol, los convierte en el tratamiento de elección para varios tipos de infecciones intracelulares (124).

I.3.2. Propiedades físico-químicas de tilosina

Tilosina es un antibiótico macrólido de 16 miembros, compuesto comercialmente por una mezcla de cuatro derivados producidos a partir de una cepa de *Streptomyces fradiae*. El principal componente de la mezcla (80-90%), es tilosina A (128). Pequeñas cantidades de tilosina B (desmicosina), tilosina C (macrocina), tilosina D (relomicina) y dihidrodesmicosina (metabolito) pueden estar presentes en la composición (129). Estos derivados contribuyen a la potencia de tilosina, ya que presentan un 83%, 75%, 35% y 31% de actividad antimicrobiana relativa a tilosina A, respectivamente (130).

La estructura química de tilosina A consiste en una lactona de 16 miembros sustituida (tilonolida), un amino-azúcar (micaminosa) y dos azúcares neutros (micinosa y micarosa)(131) que se ilustran en la Fig.I.2. Su fórmula molecular es $C_{46}H_{77}NO_{17}$, con un peso molecular de 916,1.

Figura I.2: Estructura química de tilosina A

Es una base débil (pK_a 7,1), que reacciona con ácidos minerales y orgánicos para formar cristales salinos. Es muy soluble en la mayoría de los solventes orgánicos y ligeramente soluble en agua, variando su solubilidad en forma inversa con la temperatura (132). Las soluciones acuosas de la droga son estables a un pH entre 4 y 9. Por debajo de un pH 4, se forma tilosina B (desmicosina) como resultado de una hidrólisis ácida leve (132). Esta misma reacción es la que ocurre cuando el antimicrobiano se halla presente en miel (133, 134).

I.3.3. Farmacodinamia

En la actualidad, los antimicrobianos son categorizados desde el punto de vista farmacodinámico como concentración o tiempo dependientes (135). Tilosina, es considerada un antimicrobiano tiempo dependiente, lo que significa en términos generales, que su eficacia clínica estará relacionada con el intervalo de tiempo durante el cual su concentración en el sitio de infección esté por arriba de la concentración inhibitoria mínima (CIM) calculada para el microorganismo que se está atacando (136).

Este producto natural ejerce su actividad antimicrobiana uniéndose al componente 23s ARNr de la subunidad ribosomal 50s para impedir la síntesis proteica al inhibir la unión del peptidil ARNt con el aminoacil ARNt (125). Por lo tanto, su acción sobre la bacteria es esencialmente bacteriostática y su actividad inhibitoria se mantendrá el tiempo que la molécula esté unida al ribosoma bacteriano (124), siendo su acción reversible (120).

El efecto post-antibiótico (PAE), es el tiempo que tarda un cultivo bacteriano que estuvo en contacto con el antimicrobiano en reiniciar su crecimiento, luego de que la concentración cae por

debajo de la CIM. En términos generales, en los macrólidos, este tiempo es corto y se extiende entre algunos minutos hasta un máximo aproximado de 2 horas *in vitro* (124). Tilosina y tilmicosina presentan la particularidad de poseer un PAE superior a 8 horas cuando se logran concentraciones 8 veces superiores a la CIM frente a algunos patógenos de importancia clínica en bovinos y cerdos (127).

Tilosina presenta acción sobre una amplia gama de patógenos teniendo un espectro de actividad similar a la eritromicina. Difiere de esta, por ser menos activa contra bacterias (a excepción de *Serpulina hyodysenteriae*), pero más activa contra un amplio rango de micoplasmas (120).

I.3.4. Farmacocinética

Las propiedades farmacocinéticas de tilosina coinciden con las de los macrólidos en general (120). Debido a su carácter anfifílico, son moléculas difusibles que se absorben bien por vía oral (124), sin embargo su biodisponibilidad es baja en ratas, perros y ganado, alcanzando en cerdos alrededor de un 22,5%. En la mayoría de las especies el pico plasmático se obtiene dentro de las 2 horas post-administración (137).

Una de las propiedades más relevantes de los macrólidos es su gran volumen de distribución y como consecuencia las concentraciones halladas en plasma sanguíneo son bajas y pueden limitar la eficacia antimicrobiana a este nivel. Por el contrario, las concentraciones tisulares y celulares son altas, siendo una gran ventaja para el tratamiento de infecciones allí localizadas (123). Los volúmenes de distribución aparente de tilosina en caninos y bovinos son 1,7 y 1,1 L/kg, respectivamente, con una semivida de casi 1 hora (120).

En un estudio *in vitro* se evaluó la captación y acumulación de tilosina en macrófagos alveolares porcinos y bovinos comunicándose que la proporción de tilosina intracelular con respecto a la determinada extracelularmente fue de 9,8 y 6,1 respectivamente, ratificando la capacidad del antimicrobiano de acumularse en el interior de las células inflamatorias (138).

La biotransformación de tilosina se lleva a cabo en el hígado mediante el sistema P450, existiendo diferencias cuantitativas en las cantidades de metabolitos producidos según la especie animal (137). La excreción es principalmente por vía biliar y con las heces (125), pudiendo recuperarse aproximadamente un 29% de la actividad antimicrobiana en el contenido de las mismas tras una administración oral; ya que el metabolismo animal generalmente transforma tilosina A en tilosina B o tilosina D y luego en el metabolito dihidrodesmicosina (130).

Es bien conocido que los macrólidos interactúan fuertemente con las principales isoenzimas del sistema citocromo P450 (CYP). Tilosina tartrato muestra la típica formación de complejos CYP-hierro-metabolito nitroalcano en las fracciones microsomales hepáticas de cabra y bovino *in vitro*, pero resulta un inhibidor débil ($\leq 10\%$) de la hidroxilación catalizada por la CYP3 (139). Esto puede generar interacciones medicamentosas al obstaculizar el metabolismo de otros fármacos co-administrados, con la consecuente reducción en la eliminación y potencial riesgo de toxicidad (121, 124).

I.3.5. Eficacia clínica e indicaciones

Tilosina y sus sales, fosfato y tartrato, se usan principalmente en ganado vacuno, cerdos y pollos para el tratamiento de infecciones causadas por organismos sensibles, no disponiendo autorización para ser aplicada en medicina humana (140).

En los cerdos está indicada para la prevención y control de disentería, neumonía enzoótica porcina, para el tratamiento de la rinitis atrófica y enteropatía hemorrágica proliferativa (120, 129). Otros empleos comprenden el tratamiento parenteral de erisipela e infecciones con *A. pyogenes* y anaerobios (120). Cuando se administra por vía oral en dosis sub-terapéuticas, se ha observado que estimula el crecimiento (132), favoreciendo la eficiencia en la conversión alimentaria en cerdos, bovinos de feedlot y pollos (141). Sin embargo, la Unión Europea proscribió su uso como promotor del crecimiento en el año 1999, a fin de prevenir la resistencia en los patógenos de importancia médica (142).

En bovinos se utiliza para tratar neumonía, pododermatitis, metritis, conjuntivitis contagiosa y mastitis por cocos Gram positivos. En cabras, es un fármaco de elección en el tratamiento de la neumonía micoplásmica, como la causada por *Mycoplasmas mycoides* subsp. *capri* (120).

Tilosina se ha empleado en forma satisfactoria en perros para tratar abscesos, infecciones de heridas, tonsilitis, traqueobronquitis y neumonía causados por patógenos como estafilococos, estreptococos, anaerobios y micoplasmas (120).

También en pollos se la utiliza en el tratamiento del complejo respiratorio crónico en aves y en sinusitis infecciosa de los pavos causada por *Mycoplasma gallisepticum* (129).

Este antimicrobiano no debe ser empleado por vía parenteral en los caballos debido a su naturaleza irritante y la administración oral tampoco es recomendable debido a que tilosina puede inducir colitis pseudomembranosa por *Clostridium difficile* (120).

Las formulaciones disponibles de tilosina incluyen inyectables para ser administrados por vía intramuscular en terneros y cerdos a razón de 5-20 mg/kg de peso diario; formulaciones orales a razón de 10-40 mg/kg de peso en terneros, 5-25 mg/kg de peso en cerdos y 75 mg/kg de peso en aves de corral para ser administrada en el agua de bebida (143).

I.3.6. Resistencia bacteriana a los macrólidos

Por muchos años la antibiótico-resistencia fue subestimada y solo relevante en el caso de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativos. Como era de esperar, la utilización masiva de estos antimicrobianos favoreció la selección y la diseminación de cepas resistentes, afectando a muchas especies para las cuales los macrólidos estaban indicados, como *Streptococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Mycoplasma pneumoniae*, *Campylobacter* spp., *Corynebacterium diphtheriae* y *Propionobacterium*. También algunos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, exhiben grados diversos de resistencia a estos antimicrobianos (124).

La resistencia ocurre primariamente por alguno de los siguientes mecanismos: modificación del sitio blanco, inactivación enzimática del antibiótico o por eflujo activo (121). Dentro de la modificación del sitio activo, encontramos la metilación del ARN ribosómico que está mediado por la adquisición de un gen *erm* que codifica para la formación de una enzima capaz de metilar la adenina N (6) ubicada en el componente 23s ribosomal. La monometilación confiere baja resistencia a macrólidos pero alta a lincosamidas y estreptograminas; mientras que la dimetilación confiere alta resistencia a los tres tipos de antibióticos, otorgándole a las bacterias un fenotipo de resistencia cruzada MLS_B (resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas) (121, 124).

Otro mecanismo importante es la mutación específica del gen 23 ARNr, en la cual se sustituye la adenina 2058 por guanina (121). Se define como un fenotipo de resistencia ML, con altos valores de CIM para macrólidos y lincosamidas pero sin influir en la acción de las estreptograminas ni ketólidos. Se encuentra principalmente en *Helicobacter pylori*, *Mycoplasma* y *Mycobacterium* spp (124).

La resistencia por inactivación enzimática del antibiótico puede ocurrir a través de la desfosforilación o deesterificación del anillo lactona o incluso por glicosidación.

Por último el mecanismo de resistencia por eflujo activo, se produce en bacterias Gram negativas por la acción de una familia de bombas que confiere múltirresistencia (MDR, Multiple Drug Resistance). En bacterias Gram positivas en cambio, las bombas son de espectro reducido,

pudiendo conferir resistencia al grupo de los macrólidos (fenotipo de resistencia M) o ampliar el espectro a estreptograminas (fenotipo de resistencia MS_B) (121, 124).

I.3.7. Toxicidad

Los macrólidos son considerados antimicrobianos seguros para su uso clínico, aunque pueden presentar ocasionalmente algunas reacciones adversas.

Estudios realizados con tilosina en perros expuestos a dosis entre 10 a 40 mg/kg por vía intravenosa, determinaron efectos sobre la presión sanguínea, la actividad cardíaca, la movilidad intestinal y la respiración. En todos los animales, la presión arterial media disminuyó entre un 13 a 40% dependiendo de la dosis; en algunos casos la acción depresora fue transitoria, en otros persistió durante 1 hora o más. Algunos perros mostraron un ligero aumento de la frecuencia respiratoria, sin cambios en la frecuencia cardíaca, según lo indicado por el electrocardiograma (ECG). La motilidad duodenal en general tendió a aumentar durante 10 a 25 minutos, sólo a las dosis más altas experimentadas (144).

Pruebas de sensibilidad en conejos reflejaron sólo una ligera irritación cutánea, tras la aplicación de 2000 mg de tilosina soluble e irritación ocular de leve a moderada que remitieron dentro de los 8 días posteriores al tratamiento (137). En ensayos realizados en conejillos de la india, el tartrato de tilosina provocó una reacción de sensibilización cutánea leve luego de la exposición a 10 inyecciones intradérmicas de 50 mg/ml. En aplicaciones intramusculares en perros y gatos, no se observaron lesiones o signos de irritación en el sitio de inyección. Sin embargo, en equino las administraciones parenterales ocasionan irritación severa en la zona de aplicación (120).

I.4. Residuos de antimicrobianos de uso veterinario en alimentos

La creciente demanda de alimentos y la necesidad de incrementar su producción como respuesta a los requerimientos de la población, ha propiciado el desarrollo de tecnologías para obtener los máximos beneficios en el menor tiempo posible y a costos razonables. Una de las principales herramientas que permitieron estos avances en la producción de alimentos de origen animal, han sido los medicamentos veterinarios. No debe olvidarse que los mismos, promueven tanto la sanidad animal como la salud humana (a través de la prevención de enfermedades comunes a los animales y al hombre).

Los antimicrobianos son utilizados de diversas formas en medicina veterinaria: en forma terapéutica para el tratamiento de enfermedades infecciosas; con fines metafilácticos cuando se quiere impedir la diseminación de una enfermedad infecciosa hacia todo un lote de animales, o como profilaxis, para prevenir la aparición de este tipo de enfermedades. Finalmente, los antimicrobianos se usan a concentraciones subterapéuticas con fines profilácticos y/o de promoción del crecimiento (145).

En ocasiones, se ha podido constatar que ciertos medicamentos veterinarios se utilizan de manera distinta a la aprobada por las autoridades de registro (por ejemplo uso “extra-label” o “fuera de las indicaciones propuestas”) y no siguiendo el “sumario de características del producto” (SCP). Cuando es así, se debe reconocer que no existen datos adecuados para demostrar la seguridad para el consumidor de los productos alimenticios procedentes del animal tratado (146).

Desde un enfoque en salud pública y veterinaria, así como al comercio internacional de productos pecuarios, se ha generado una creciente preocupación a nivel de los productores, técnicos, científicos, autoridades y especialmente, de los consumidores con respecto a la contaminación de alimentos por fármacos. La percepción es que si un residuo farmacológico se puede detectar, sin importar cuál sea el fármaco y aunque esté presente solamente en partes por mil millones (gotas en una piscina), puede plantear de alguna manera un riesgo potencial para un individuo, en algún momento.

En un inicio, cuando las metodologías de detección eran poco sensibles, se manejaba la hipótesis de residuo cero. Esto significaba que si se detectaba la sustancia en cuestión en el alimento analizado, éste ya no era apto para el consumo. Sin embargo, el advenimiento de nuevos métodos analíticos que ponen de manifiesto la presencia de residuos en concentraciones de hasta partes por trillón (ppt), determina que es virtualmente imposible administrar medicamento alguno a un animal sin que pueda no ser detectado en la carne, leche o huevos, incluso después de observado el tiempo de espera sugerido para enviar el producto al consumo (145). El problema que se presenta en este caso, es definir los niveles que representan riesgos para la salud pública, tratando de resolver la regulación de los compuestos usados en la cadena productiva de los alimentos.

I.4.1. Definiciones

Medicamento veterinario

Se denomina así, a cualquier sustancia aplicada o administrada a un animal destinado a la producción de alimentos, tales como los animales que producen carne o leche, las aves de corral, los peces o las abejas, tanto si se usa con fines terapéuticos como con fines profilácticos o de diagnóstico, o para modificar las funciones fisiológicas o el comportamiento (147).

Residuos de drogas veterinarias

Son todas las sustancias químicas, ya sean componentes originales de formulaciones utilizadas en Medicina Veterinaria y/o sus metabolitos, que permanecen en cualquier alimento derivado del animal al que se administró el producto veterinario en cuestión, así como los residuos de las impurezas presentes en la formulación utilizada (148).

Antibiótico y antimicrobiano

Dentro del amplio grupo de residuos procedentes de los tratamientos veterinarios, los fármacos más ampliamente utilizados son los antibióticos. Estos compuestos se definen como una sustancia elaborada por un microorganismo y que en bajas concentraciones inhibe o destruye a otros microorganismos (149). En cambio el término antimicrobiano tiene una definición más amplia e incluye a toda sustancia de origen natural, semisintética o sintética que mata o inhibe el crecimiento de un microorganismo pero causando escaso o nulo daño al huésped. Ambos conceptos a menudo son utilizados como sinónimos (149).

Dosis NOEL (Non observable Effect Level- Nivel sin efectos observables)

Es la dosis de un principio activo que no produce efecto alguno cuando es suministrada por vía oral a la especie más sensible, es decir que no se producen cambios en la actividad fisiológica, en el peso de los órganos del cuerpo, en la velocidad de crecimiento, la estructura celular o la actividad enzimática (148).

Para su determinación es necesario desarrollar estudios de toxicidad crónica en ratas y otro mamífero no roedor. Su valor se expresa en miligramos de sustancia química por kilogramo de peso vivo.

Para el caso de los fármacos antimicrobianos, para determinar el NOEL deben considerarse también ensayos de actividad *in vitro* frente a especies bacterianas relevantes de la flora intestinal humana (150). Así, se obtiene un nuevo parámetro denominado “Dosis sin efecto microbiológico (NMEL)”, muy importante cuando se trata el problema de la resistencia a los antimicrobianos originada por la presencia de residuos de ellos en los alimentos (145).

IDA (Ingesta diaria admisible)

Corresponde a un valor estimado de la concentración de una sustancia química determinada presente en un alimento, que puede ser ingerida diariamente durante toda la vida, sin presentar efectos apreciables en la salud humana (148).

Se obtiene dividiendo a la dosis NOEL por factores de seguridad adicionales que tienen en cuenta la incertidumbre en la extrapolación de la seguridad en animales para la seguridad del hombre, así como también cualquier limitación del estudio (por ejemplo, número de animales usados, variabilidad de poblaciones sensibles, etc.). Normalmente se utiliza un valor de 100, aunque puede ser más bajo, y a veces cuando los riesgos lo justifican puede ser elevado a 1000 (145).

La IDA está basada en un conjunto de evaluaciones de seguridad toxicológica que tienen en cuenta la exposición aguda y a largo plazo por la ingestión de residuos de fármacos y el impacto potencial sobre el hombre. Estos impactos pueden incluir toxicidad sistémica, carcinogenicidad, mutagenicidad/genotoxicidad, toxicidad sobre la reproducción, toxicidad sobre el desarrollo, teratogenicidad, cardiotoxicidad y en el caso de agentes antimicrobianos, la seguridad para la microflora intestinal (146).

LMR (Límite máximo de residuos)

Es la máxima concentración de una sustancia química determinada que puede admitirse en un alimento sin que signifique un riesgo para la salud.

Se calcula para cada tejido en particular, dividiendo al producto de la IDA y el peso corporal promedio humano (60 kg), por la ingesta diaria estimada para ese tejido en particular. Se expresa en mg/kg o partes por millón (ppm), µg/kg o partes por billón (ppb), o ng/kg o partes por trillón (ppt).

Un LMR se establece con un valor numérico referido a una sustancia química denominada residuo marcador y a un producto alimenticio denominado tejido diana. El concepto de residuo marcador se define como el residuo (fármaco inalterado y/o metabolitos) cuya concentración disminuye en una relación conocida con el nivel de residuos totales en función del tiempo. Con ayuda de los estudios farmacocinéticos, incluido el metabolismo, es necesario identificar para cada fármaco, el residuo marcador y también con la ayuda de técnicas analíticas sensibles determinar sus concentraciones en función del tiempo en los tejidos de los animales tratados que permitan un control práctico del cumplimiento del valor establecido. Los tejidos diana, son aquellos tejidos comestibles que presentan mayor afinidad por el fármaco y con más lenta eliminación, que se utilizan para controlar la presencia del residuo-marcador y sus niveles (146).

Período de restricción, suspensión o retirada

Es el período que debe transcurrir entre la última administración de un producto veterinario y la faena o la recolección de los productos comestibles provenientes de los animales tratados, destinados al consumo del hombre. Este lapso asegura que el contenido de residuos en los alimentos se ajuste al límite máximo de residuos permitidos (148).

El establecimiento de períodos de restricción requiere de la determinación cuali-cuantitativa del principio activo y sus metabolitos en estudio sobre los tejidos y del apoyo de estudios específicos de farmacocinética; así como la validación estadística de los resultados obtenidos.

El período de restricción se establece, por lo tanto, para un principio activo en una formulación determinada, es decir que cada producto veterinario tendrá su período de restricción, de acuerdo a estudios de depleción de residuos llevados a cabo según las condiciones de uso del medicamento veterinario (especie/tipo de animal, dosis, vía de administración), y asegurará que, a partir de la correcta utilización del producto en estudio, los residuos resultantes se encuentren por debajo de los límites máximos de residuos (146).

I.4.2. Riesgos potenciales de la exposición a antimicrobianos presentes en alimentos

Los residuos de antibacterianos, como se mencionó anteriormente, pueden estar presentes en los alimentos de origen animal como resultado de la contaminación ambiental (administración no intencional)(151) o a través de la administración intencional por parte de un médico

veterinario con fines terapéuticos, metafilácticos, profilácticos y/o de promoción del crecimiento (145).

Cuando los antimicrobianos se utilizan de forma racional, se respetan las indicaciones y modo de empleo, así como el cumplimiento de los tiempos de espera o de retirada, los residuos potenciales que pudieran estar presentes en los animales tratados o en sus productos y subproductos alimenticios destinados al consumo humano estarán únicamente en niveles muy bajos, por lo que la seguridad para el consumidor no estará implicada. Si por el contrario, los medicamentos veterinarios se utilizan de forma indiscriminada, sin cumplir las indicaciones y el modo de empleo autorizado, o sin respetar los tiempos de espera, la salud pública podría estar comprometida (151, 152).

Otro aspecto importante a considerar, es conocer si el cocinado normal de los alimentos inactiva los residuos de antimicrobianos desde el punto de vista microbiológico (pérdida de la actividad antibacteriana). Los resultados obtenidos por diferentes investigadores indican que el tratamiento culinario normal de los alimentos no inactiva los residuos de los antibióticos más sensibles (penicilina y tetraciclina) que pudieran encontrarse en los alimentos. El calentamiento más intenso que tiene lugar en los alimentos enlatados puede inactivar alguno de los antibióticos más sensibles, pero otros, como la neomicina y estreptomycin, pueden estar todavía presentes (153).

Reacciones alérgicas

Las reacciones alérgicas más frecuentemente citadas son aquellas producidas por los antimicrobianos pertenecientes al grupo de los beta-lactámicos como la penicilina (151, 154, 155). Otros fármacos, incluyen a los aminoglucósidos, sulfamidas, y tetraciclinas que pueden causar reacciones alérgicas en personas sensibilizadas.

Las reacciones inmunológicas adversas pueden manifestarse de muchas formas, desde reacciones anafilácticas con riesgo para la vida hasta reacciones leves como son erupciones o sarpullidos presentando una alta variabilidad individual (156, 157, 158).

En general las bajas concentraciones presentes en los alimentos, no alcanzan para sensibilizar a los pacientes, pero sí para desencadenar reacciones en individuos anteriormente expuestos (151, 156, 159). Estas reacciones parecen desarrollarse con una muy baja frecuencia en vista de la rareza de reportes, en contraste con la alta frecuencia de sensibilización de la población (hasta 7-10% a la penicilina) (157). Aunque es posible que muchas de las reacciones

cutáneas, especialmente en niños y jóvenes se deban a componentes xenobióticos en la dieta, incluyendo a los antimicrobianos.

Toxicidad crónica

Una evaluación de la toxicidad tiene muchas facetas relacionadas con las condiciones y características de exposición, incluyendo la frecuencia de exposición, la vía por la cual ocurre la exposición, y la dosis. La evaluación de la seguridad usualmente se focaliza en las consecuencias adversas de la exposición repetida a lo largo de la vida (146).

No está permitido en alimentos destinados al consumo humano, la presencia de fármacos animales o sus residuos, si se sabe que los mismos inducen cáncer cuando son ingeridos por el hombre. Sin embargo, los efectos crónicos tales como carcinogénesis como resultado de la exposición a los niveles de droga encontrados como residuos en los alimentos son particularmente difíciles de detectar (151). Diferente podría ser el caso del cloranfenicol, donde una de las manifestaciones toxicológicas posibles, es la anemia aplásica dosis independiente, que resulta irreversible una vez instaurada (160, 161). Razón por la cual, se ha prohibido su uso en animales de consumo en algunos países (162, 163).

Para eliminar la incertidumbre resultante de los bioensayos animales, los investigadores están intentando usar datos epidemiológicos humanos para evaluar cuantitativamente los riesgos de cáncer en el hombre. El uso de estos datos tiene muchas ventajas, debido a que el hombre es directamente evaluado, los niveles de exposición relevantes y las vías de exposición pueden ser estudiadas. Desafortunadamente, los estudios epidemiológicos son muy limitados y generalmente son de un número pequeño de personas expuestas por lo que existe un poder estadístico bajo para identificar un efecto. De manera que resulta imprecisa la evaluación de la exposición así como también es insuficiente el seguimiento, dado el período de latencia requerido para una enfermedad crónica tal como el cáncer (146).

Cuando están disponibles los datos de carcinogenicidad a partir de bioensayos animales, un análisis muy útil es el cálculo de los márgenes de exposición (MOEs), los cuales pueden usarse para comparar los datos de potencia en animales con los escenarios de exposición en el hombre.

Alteración de la flora intestinal normal

Los residuos de antibióticos, todavía con actividad antimicrobiana, son potencialmente capaces de modificar la microflora intestinal de los consumidores (164, 165). Estos residuos

pueden matar ciertas bacterias o disminuir su aptitud a proliferar dentro del intestino (menor velocidad de crecimiento, menor afinidad para un sustrato nutricional, y menor adhesión), originando el fenómeno denominado “descenso de las barreras microbiológicas” o “disminución de la resistencia a la colonización” (166). Éste, es un efecto fisiológico básico, ya que es una acción antagonista que ejerce la microflora frente a la colonización por agentes patógenos u oportunistas que normalmente no se tienen en cuenta como patógenos en el hombre (164, 167).

A diferencia de los efectos negativos de las dosis terapéuticas que suelen estar bien documentados, el efecto de niveles en ppb o ppm de antibióticos sobre la perturbación de la microflora intestinal no está definido. Es posible que también puedan alterar la actividad enzimática intestinal y tener un efecto sobre ciertas hormonas y fármacos, afectando adversamente la salud pública (146).

Desarrollo de resistencias bacterianas

El riesgo más grande para la salud de los consumidores que implica la utilización de antibióticos en animales no está dado por la toxicidad de los residuos en sí, sino por el desarrollo de resistencias en bacterias de los mismos animales. La resistencia bacteriana es un problema gravísimo que representa una preocupación mundial, que se produce por múltiples causas, que probablemente sea inevitable y con la que tenemos que lidiar en forma multidisciplinaria a efectos de limitar su emergencia y paliar sus efectos al máximo (145).

La base del desarrollo de la resistencia bacteriana está en la selección de cepas resistentes que producen ciertas concentraciones de antibiótico. El antibiótico no induce resistencia, solamente proporciona la fuerza selectiva del proceso darwiniano de la selección natural. El potencial para la mutación de una bacteria y el intercambio genético entre las mismas, combinado con el escaso tiempo de generación de las bacterias, pueden producir poblaciones resistentes con rapidez (149).

Datos epidemiológicos han demostrado que una fuente significativa de infecciones antibiótico-resistentes transmitidas por alimentos, en seres humanos, fue ocasionada a través de la adquisición de bacterias resistentes de los géneros *Salmonella* spp., *Escherichia coli* y *Campylobacter* spp. originarias de animales de producción (168, 169, 170). Un informe reciente determinó la asociación entre un brote producido por una cepa multiresistente de *Salmonella* entérica serotipo Typhimurium DT104 y el consumo de carne vacuna (171).

Mientras que la investigación ha ligado el uso de antimicrobianos en agricultura a la aparición de patógenos resistentes a antibióticos transmitidos por alimento, el uso agrícola es solamente uno de los varios factores que contribuyen a la resistencia antibiótica en los patógenos de interés en medicina humana (172). Otros factores de mayor preponderancia son la "selección directa" que aparece tras el tratamiento del hombre con antibióticos, o la "transmisión directa" de bacterias resistentes del animal al hombre (146).

Ante lo anteriormente expuesto, las agencias oficiales internacionales han tomado diferentes posiciones: la EMEA (Comunidad Europea) adoptó el principio precaucional, suspendiendo el uso de antimicrobianos como promotores de crecimiento para reducir al mínimo el riesgo de desarrollo de bacterias resistentes y preservar la eficacia de ciertos antibióticos usados en medicina humana. Mientras tanto la FDA/CVM (Estados Unidos) prefirió apelar al principio de pruebas, recolectando evidencias que confirmen que el problema está instaurado antes de tomar medidas. Siguiendo este principio han eliminado recientemente del mercado las fluoroquinolonas para uso en aves de corral (173).

Interferencia en cultivos iniciadores

Otros de los aspectos a considerar cuando hablamos de residuos de antibióticos es la incidencia que ellos tienen en los procesos de industrialización. Los cultivos iniciadores ("starters") para productos lácteos son sensibles a concentraciones relativamente bajas de antimicrobianos, ocasionando problemas en la elaboración de productos fermentados (yogur, quesos). Asimismo, en los productos cárneos conservados por acción de bacterias lácticas (chacinados madurados o carne envasada en atmósferas modificadas) los residuos pueden impedir el desarrollo de la flora favorable, provocando alteración del producto (174).

I.4.3. Evaluación toxicológica y residuos de tilosina en productos comestibles

Evaluación toxicológica

Tilosina base y sus sales han mostrado baja toxicidad en ratones, ratas y perros tras la administración oral única, con valores de DL_{50} que exceden los 5000 mg/kg de peso corporal en roedores y mayor a 800 mg/kg de peso corporal en perros (175). Los signos manifiestos de toxicidad en perros incluyen salivación, vómitos y defecación. En estudios intravenosos comparativos de tilosina, desmicosina y macrocina en ratas hembras, se observaron temblores, convulsiones clónicas y debilidad en las extremidades (137).

Diversos estudios de toxicidad a corto plazo fueron realizados en ratas y perros que recibieron dosis orales, sin embargo los datos obtenidos no sirven en la actualidad para su evaluación, ya que la mayoría de los mismos se presentan en forma de resumen y no siguen las pautas de las normativas modernas para estos tipos de ensayos (2, 140). En un estudio de 2 años de duración realizado en perros, dosis de 200 mg/kg de peso corporal o superiores provocaron vómitos, diarrea y pielonefritis en los animales de experimentación, determinándose el NOEL en 100 mg/kg de peso corporal por día (176).

En estudios a largo plazo en ratas tras la administración de tilosina por vía oral, se pudo observar una mayor sobrevivencia, aumento de la ingesta y ganancia de peso corporal, cambios grasos en hígado, así como un incremento en la incidencia de adenomas de hipófisis en machos. Estos tumores son comúnmente observados en ratas de edad avanzada y el aumento de la incidencia se consideró asociado al aumento de la supervivencia de los machos tratados. El NOAEL (nivel sin efecto adverso observable) se determinó en 10000 mg/kg de alimento, igual a 402 mg/kg de peso corporal por día (175).

Se concluyó que tilosina no es mutágena a través de una batería de ensayos que incluyeron pruebas *in vitro* de daños cromosomales en células CHO (células de ovario de hámster) y pruebas *in vivo* de daño citogenético en médula ósea de ratón (137). A su vez, se llevaron a cabo estudios reproductivos multigeneracionales de toxicidad en ratones y ratas sin encontrarse efectos adversos sobre los índices reproductivos, desarrollo fetal o modificaciones en el crecimiento y la supervivencia de la cría (175).

Según el comité JECFA de FAO/WHO el estudio a corto término desarrollado en perros es el más relevante para determinar un valor de NOAEL y asignar un factor de seguridad de 100 para determinar una IDA basada en datos toxicológicos de 100 µg/kg de peso corporal (175). En cambio, el comité CVM de la EMEA tomó en consideración un estudio de dosis repetidas llevado a cabo durante un año en ratas para la determinación del NOAEL, estableciendo una IDA de 500 µg/kg de peso corporal (137).

Particularmente, para el caso de tilosina, las propiedades microbiológicas de los residuos pueden ser más significativas que las propiedades toxicológicas. Los residuos ingeridos por humanos a través de tejidos comestibles o leche de animales medicados, presentan potencial para perturbar la flora intestinal humana o para desorganizar el efecto barrera que ello ejerce, permitiendo el ingreso de bacterias potencialmente patogénicas en el tracto gastrointestinal así como el aumento de la población bacteriana resistente a los macrólidos (175).

En consecuencia, el comité JECFA de FAO/WHO estableció un valor de IDA de 0-30 µg/kg de peso corporal. Este valor es significativamente menor a que si se basara en datos farmacológicos y 6400 veces menor que la dosis más baja asociada con un aumento de tumores en la hipófisis de ratas (175). El comité CVM de la EMEA, toma un valor aún menor determinando una IDA microbiológica de 6 µg/kg de peso corporal (177).

Los efectos de tilosina en cultivos iniciadores de yogur fueron investigados por el laboratorio Nacional de Referencia Francés, concluyendo que la concentración máxima sin efecto en la fabricación industrial de yogur es de 0,075 mg/mL. No obstante, una publicación alemana informó que tilosina en una concentración de 0,05 mg/mL inhibe algunos parámetros, incluyendo la formación de D(-)-lactato, en dos fermentos de yogur disponibles comercialmente (137).

Residuos de tilosina

Estudios de depleción de residuos en ganado bovino, determinaron que la concentración media de tilosina A, pasados los 7 días de una administración intramuscular, fue de 70 µg/kg en riñón y por debajo de 50 µg/kg en el resto de los tejidos comestibles. Tilosina A representó aproximadamente el 39%, 33,3% y 34,5% de los diferentes residuos con actividad microbiológica presentes en riñón, hígado y músculo respectivamente, transcurridas 4 horas desde una administración intramuscular. En el caso de los cerdos, los residuos de tilosina A en hígado y riñón fueron de tan sólo 30 µg/kg e indetectables en el resto de los tejidos, luego de 6 horas de una administración oral. El porcentaje de tilosina A fue del 33% en hígado y 43% en riñón respecto del total de los residuos con actividad antimicrobiana (137). Por último, estudios realizados en gallinas determinaron que existe una gran variabilidad individual en la magnitud de los residuos encontrados en huevo entero; siendo tilosina A, el compuesto mayoritario (17%) (178).

Se establece, al riñón de bovinos y porcinos como el órgano diana y a tilosina A como el residuo marcador en estos animales y en aves de corral (137, 177).

La caracterización del riesgo a la exposición, se traduce por la fijación del LMR sobre la base de los datos precedentes, la estimación de las frecuencias y naturaleza de los efectos indeseables (146). Los LMR determinados para tilosina se detallan en la Tabla I.1.

Se estima que la extensión del límite máximo de residuos a todas las especies productoras de alimentos, resulta en una ingesta por parte de los consumidores que no excede el 80% de la IDA.

Actualmente, tilosina según las agencias reguladoras y de salud pública está categorizada como un antimicrobiano críticamente importante en veterinaria (179); ya que existe potencial de utilidad del grupo de los antimicrobianos macrólidos en medicina humana (146).

Tabla I.1: Límites máximos de residuos establecidos para tilosina en las distintas especies productoras de alimentos (180)

Sustancia farmacológicamente activa	Residuo marcador	Especie animal	Límite máximo de residuos (LMR)	Órgano diana
Tilosina	Tilosina A	Todas las especies productoras de alimentos	100µg/kg	Músculo*
			100µg/kg	Grasa^
			100µg/kg	Hígado
			100µg/kg	Riñón
			100µg/kg	Leche
			300µg/kg	Huevos

*En pescado el LMR se refiere a músculo y piel en proporciones naturales

^ En porcinos y aves de corral este LMR se refiere a piel y grasa en proporciones naturales

I.4.4. Prevención de residuos y uso racional de antimicrobianos

Los antibióticos son agentes terapéuticos insustituibles para el hombre y para los animales. Cuando se emplean antimicrobianos, es importante utilizar el fármaco correcto, en la concentración, vía de administración, intervalo de dosificación y duración adecuadas (181).

El uso racional de los mismos se basa, en forma central, en el conocimiento de su farmacocinética (PK), lo que, coordinado con el conocimiento de farmacodinamia (PD) y toxicidad, de las características del paciente y la enfermedad, permitirá una terapia óptima (145).

Durante dos décadas, se ha hecho hincapié en las características PK "lo que el cuerpo hace al fármaco" y la disposición general de la droga en el cuerpo, para determinar una terapia eficaz (182). El comportamiento PK de un determinado compuesto se caracteriza a través de una serie de parámetros y entre los que mayor vinculación tienen con la eficacia antibacteriana, no podemos dejar de mencionar la biodisponibilidad, semivida de absorción, área bajo la curva

concentración en función del tiempo, concentración máxima obtenida en plasma y tiempo al que esa concentración se alcanza, semivida de eliminación y aclaramiento o depuración desde el plasma (en general a través de riñón)(145).

Para una molécula dada, estas variables PK varían extensamente entre las especies (diferencias anatómicas, fisiológicas y bioquímicas), y puede también haber diferencias intra-especies entre los animales normales y enfermos. Todavía los regímenes de dosificación se establecen casi invariablemente a partir de datos obtenidos de individuos sanos. Otras diferencias se presentan, por accidente o diseño, como resultado de la formulación del producto, la vía de administración y el consumo variable de la droga en los casos de medicación grupal (183).

Los medicamentos se administran, sin embargo, por sus características PD "lo que la droga hace en el cuerpo" y, en el caso concreto de los antimicrobianos, lo que la droga le hace a la bacteria. La susceptibilidad del patógeno al fármaco, determinada por la CIM, es un reflejo de la potencia del medicamento (182). Clásicamente, se ha medicado con antibióticos siguiendo protocolos de administración, que permitían mantener concentraciones de antimicrobiano en plasma y tejidos en forma continuada, durante un período suficiente para la total curación de la dolencia. Obteniéndose la misma, por muerte bacteriana de una gran parte de la población y eliminación de los miembros sobrevivientes por activa participación del organismo (145). Sin embargo, para poder entender la aplicación o la importancia de la dosis del fármaco a la eficacia, tenemos que integrar las características PK con las características PD (182).

Determinados efectos perjudiciales para las bacterias persisten luego que la exposición del microorganismo al antimicrobiano ha terminado; pudiéndose citar entre los mismos: el efecto post-antibiótico (PAE), el efecto post-antibiótico sub-CIM (PASME) y el efecto post-antibiótico estimulador de leucocitos (PALE) (145).

La capacidad de muerte bacteriana, conjuntamente a los efectos persistentes permite clasificar a los antimicrobianos en acción a) concentración dependientes, b) tiempo dependientes con mínima persistencia y c) tiempo dependientes con persistencia prolongada (184).

La terapéutica racional es un terreno dinámico, en que el avance del conocimiento va volviendo obsoletas las viejas recetas quimioterápicas. Una nueva disciplina, la modelización farmacocinética-farmacodinámica puede representar la unión final entre datos que en oportunidades son presentados como fragmentarios y aportar al esclarecimiento de nuevos conceptos que hacen a planes de administración racionales y eficaces (145).

Modelización farmacocinética-farmacodinámica (PK/PD)

La modelización PK/PD se basa en la vinculación de la farmacocinética y la farmacodinamia de la molécula, describiendo la evolución en el tiempo del efecto farmacológico de una dosis dada (185) (Figura I.3).

Figura I.3: Modelado PK/PD como una combinación de las dos disciplinas farmacológicas clásicas (adaptado de "Rational dosing of antibiotics: the use of plasma concentrations *versus* tissue concentrations" (185))

Los tres parámetros más utilizados en este tipo de modelización para antimicrobianos son: el área bajo la curva concentración tiempo dividida por la concentración inhibitoria mínima (ABC/CIM), la máxima concentración plasmática dividida por la CIM ($C_{\text{máx}}/\text{CIM}$) y el tiempo durante el cual la concentración del antibiótico excede la CIM ($T > \text{CIM}$) (145, 185, 186)(Figura I.4).

Actualmente, estos parámetros son considerados los predictores más robustos de eficacia *in vivo* de los agentes antimicrobianos (136). Cada vez se dispone de más datos sobre experimentos *in vitro* y en modelos animales, que corroboran su importancia y su capacidad para

permitirnos tratar efectivamente infecciones por gérmenes con susceptibilidades menores y prevenir la emergencia de resistencias (187).

Figura I.4: Principales parámetros PK/PD predictores de la eficacia en las terapia antimicrobiana: $C_{máx}/CIM$, ABC/CIM y $T > CIM$

Para que empíricamente un antimicrobiano resulte útil, la CIM_{90} (concentración inhibitoria mínima capaz de inhibir al 90% de los aislamientos evaluados) frente al patógeno responsable de la enfermedad a tratar, debe estar por debajo del punto de inflexión del parámetro PK/PD que mejor describa el comportamiento de ese antibiótico (182).

Una cuestión de importancia en la acción antimicrobiana, como se mencionó anteriormente, es la velocidad de muerte bacteriana. Los aminoglucósidos y fluoroquinolonas son rápidamente bactericidas; por el contrario, los β -Lactámicos, vancomicina, macrólidos, oxazolidonas, clindamicina y tetraciclinas presentan una acción bactericida considerablemente más lenta (186). Estos antibióticos constituyen parte del grupo con acción tiempo dependiente, para los cuáles el objetivo de la terapia consiste en optimizar el tiempo de exposición del patógeno al fármaco (186, 188). Para este tipo de moléculas, quimioterápicos tiempo-dependientes, los efectos post-antibióticos (persistencia de la acción antimicrobiana después de que el antimicrobiano se elimina) son mínimos (182).

La principal pauta a tener en cuenta al idear un plan terapéutico racional basado en el uso de macrólidos es el $T > CIM$. Se deben repetir las dosis a intervalos cortos con el objetivo de

mantener las concentraciones por encima de la CIM durante la mayor cantidad de tiempo posible (186). Esta situación puede ser justificada por la acción esencialmente bacteriostática y porque la actividad será mantenida en la medida que las moléculas antibióticas estén unidas al ribosoma (124). Estudios realizados en animales sugieren que un $T > CIM$ aproximado al 50% del intervalo entre dosis sería, en ciertas condiciones, suficiente para alcanzar la máxima actividad antimicrobiana (182, 189).

Debido al no prudente uso de macrólidos, tanto en medicina humana como veterinaria, ha cobrado gran importancia el avance de antibiótico-resistencia. Por lo tanto, el aplicar pautas PK/PD nos permitirá lograr una óptima utilización de estos antibióticos en pro de mejorar la eficacia clínica y reducir al mínimo la presión de selección de cepas resistentes (123).

I.5. Reseña y situación actual de la terapia antimicrobiana en apicultura

Las enfermedades de la cría de las abejas LA y LE constituyen las afecciones más severas y de mayor impacto económico en la producción apícola. Debido a esto, numerosos han sido los esfuerzos en encontrar su cura e implementar medidas que eviten su propagación.

Antes de la segunda guerra mundial, las principales medidas de lucha frente a estas enfermedades consistían en provocar la muerte de la colonia y destrucción del material remanente mediante la utilización de fuego o transferencia del material vivo a colmenas nuevas con subsiguiente destrucción del material (190).

Haseman y Childers en 1944, fueron los pioneros en la utilización de sulfas para la prevención y el control de LA. Aplicaban el quimioterápico por aspersión junto con jarabe de azúcar o como sustituto de polen. Originalmente utilizaron sulfanilamidas, seleccionando posteriormente al sulfatiazol sódico, por resultar el producto más efectivo (191, 192). Adjudicaban la eficacia al cese de la mortalidad larval por un efecto bacteriostático/bactericida sobre el patógeno, permitiendo a las abejas deshacerse del material infectivo durante el transcurso del tratamiento gracias al aumento del comportamiento de limpieza (193).

Este fue el primer tratamiento químico fiable y eficaz. No fue necesario que transcurriera mucho tiempo para que la práctica se generalizara, requiriendo la misma, menor trabajo que la enjambrazón artificial y menor costo en comparación a provocar la muerte de las colonias y quemar los equipos contaminados (194).

Aunque las sulfas resultaban efectivas contra LA, el medicamento no controlaba a la LE (causada por *Streptococcus pluton*), reportándose en la década de 1950 graves brotes de la

enfermedad en varias partes de Estados Unidos (194). En este transcurso, Katnelzon y Jamieson (1953) testearon varios antibióticos: penicilina, estreptomina, neomicina, clortetraciclina, oxitetraciclina. Encontraron que neomicina y clortetraciclina eran débilmente efectivas contra la enfermedad, pudiendo no ser adecuados para el control. Penicilina y estreptomina se mostraban ineficaces, mientras oxitetraciclina (en diferentes presentaciones) resultaba efectiva. Este hallazgo fue de gran importancia, ya que según Watkins (1966) permitía controlar las dos enfermedades de la cría, cubriendo la falencia del sulfatiazol sódico (190).

A finales de los años 50, oxitetraciclina clorhidrato comercializada bajo la marca terramicina (Pfizer, USA) se comenzó a utilizar ampliamente en apicultura para el tratamiento de la LA y la LE (195). Sin embargo, sulfatiazol se siguió utilizando por muchos años hasta el hallazgo de cepas de *P. larvae* resistentes (196), la comprobación de su baja eficacia (197, 198) y la alta estabilidad de los residuos presentes en miel (82).

Si bien un año después de que oxitetraciclina fuese descubierta algunos autores (Studiert, 1953) alertaban sobre el posible hecho de que las bacterias se hiciesen resistentes al antibiótico (190), tuvieron que pasar varias décadas para que se considerara un verdadero problema. Actualmente, la resistencia a las tetraciclinas está extensamente citada en varios países: Polonia (196), Alemania (197), Argentina (91, 199), Estados Unidos (200, 201, 202) y Canadá (202, 203). En nuestro país, la prevalencia de cepas resistentes a oxitetraciclina en la provincia de Buenos Aires alcanza valores cercanos al 54% (63). Hasta el año 2004, oxitetraciclina era el único antimicrobiano aprobado disponible para LA en Estados Unidos y Argentina, a partir de lo cual, no resulta extraño que el uso indiscriminado y su utilización en forma preventiva favoreciera la resistencia y diseminación de la enfermedad (91, 204).

También se ha demostrado que este antimicrobiano, resulta tóxico para las larvas a las dosis de control (205) y para abejas adultas (91, 206). Los residuos pueden encontrarse fácilmente en miel y jalea real de las colonias tratadas por más de 6 a 9 semanas post-tratamiento (207).

En las últimas décadas se ensayaron varios antimicrobianos pertenecientes a las familias de los beta-lactámicos, lincosamidas, ionóforos y macrólidos buscando una alternativa terapéutica a las tetraciclinas.

La ampicilina resultó un antibiótico con alta efectividad *in vitro*, pero al ser ensayado en las colmenas, altos residuos en miel y bajas concentraciones en las larvas detectadas, dejaron en duda su efectividad (208).

Dentro de las lincosamidas, lincomicina, resultó ser la única con eficacia tanto a nivel de laboratorio (209, 210) como aplicada en polvo a colmenas infectadas con cepas resistentes; demostrando incluso ser no tóxica a las dosis ensayadas (201). Clindamicina (198) y Pirlimicina (211) han sido ensayadas únicamente *in vitro*, sin mostrar ventajas competitivas frente a lincomicina.

Algunos antibióticos pertenecientes al grupo de los ionóforos, han mostrado alta actividad *in vitro* frente al *P. larvae*, pero han sido ineficaces en ensayos a campo, manifestándose inclusive un aumento en la severidad de la infección. Se ha adjudicado la falla terapéutica a la pobre absorción de las formulaciones por parte de las abejas o a la incapacidad de llegada a la crías. Sin embargo no se han continuado las investigaciones que confirmasen estas hipótesis (211).

Eritromicina y tilosina en pruebas de susceptibilidad *in vitro*, mostraron mayor actividad que otros macrólidos (198, 209, 210, 211). Tilosina a campo resultó ser relativamente no tóxica para las abejas y efectiva en el control de la enfermedad (206, 212, 213, 214) incluyendo cepas oxitetraciclina resistentes (210). Los reportes de eficacia de eritromicina resultaron dispares, hallándola Katznelzon y Moffet inefectiva (215, 216) a diferencia de los resultados obtenidos por Machova (217). Otro macrólido ensayado fue mirosamicina, que exhibió muy bajas concentraciones inhibitorias y bactericidas frente al patógeno *in vitro* (209), demostrando además excelente eficacia *in vivo*, logrando altas concentraciones en jalea y abejas adultas mientras que los residuos en miel fueron bajos (218).

Sin embargo, a pesar de la cantidad de moléculas ensayadas como se expuso anteriormente, en la actualidad sólo están registrados para su uso en apicultura oxitetraciclina en Canadá (219) y en Argentina (220) y tetraciclinas y tilosina en los Estados Unidos (221, 222). En nuestro país, tilosina contó con la aprobación por parte del SENASA para uso apícola, sólo durante el transcurso del año 2005 y principios de 2006 en una formulación al 1% desarrollada por el laboratorio Apilab S.R.L (223).

El uso de medicamentos veterinarios en apicultura, no está permitido en Australia (224) ni en la Unión Europea y por lo tanto límites máximos de residuos (LMRs) no han sido establecidos para los productos de consumo derivados (225). De manera que la miel debe estar libre de cualquier residuo químico, estableciéndose una política de "tolerancia cero" para los productos importados.

En el año 2003, la Comunidad Europea suspendió las compras de miel de origen chino (medida que posteriormente fue adoptada por los Estados Unidos), a razón de la presencia de

residuos de cloranfenicol. Este antimicrobiano se encuentra prohibido desde el año 1995, por el riesgo que presenta de inducir anemia aplásica independientemente de la dosis utilizada. En agosto-septiembre de ese mismo año, alertas sanitarias provenientes del Reino Unido, denunciaron la presencia de cloranfenicol y nitrofuranos (antimicrobianos también prohibidos) en mieles provenientes de nuestro país (226). Esto condujo a que en la actualidad, todos los contenedores de miel sean sometidos a un análisis y sólo si su resultado es negativo, se autoriza su exportación.

Como se mencionó anteriormente, la aparición de residuos por encima de los niveles permitidos, es casi nula cuando se trabaja de acuerdo a las especificaciones del laboratorio elaborador. De hecho la aparición de residuos se puede correlacionar estrechamente a: no respeto de los períodos de retirada, utilización de una droga no aprobada para una determinada especie y al fallo en los registros de animales tratados o directamente a su ausencia (146).

La historia del uso de antimicrobianos en apicultura, demuestra que hasta el día de hoy, la utilización de los mismos ha sido indiscriminada y desacertada. Los datos disponibles en cuanto a farmacología de quimioterápicos en abejas son extremadamente limitados, impidiendo contar con bases científicas que respalden la eficacia e inocuidad al implementar un tratamiento. La terapéutica antibiótica no ha evolucionado en forma tan precisa como el diseño y procesamiento de alimentos; identificándose tres problemas concretos frente a la utilización de drogas:

1. No existe en nuestro país un severo control de residuos medicamentosos.
2. Uso ineficiente de drogas:
 - Uso innecesario
 - No utilización cuando son indicadas
 - Desconocimiento de tiempos de retirada (y lo más grave, del concepto de retirada)
 - Uso de dosis inadecuadas
 - Asociación ineficiente o francamente antagónica de antimicrobianos.
 - Terapéutica sin diagnóstico.
3. Desconocimiento del problema farmacocinético/farmacodinámico.

Debe quedar claro que este uso empírico y poco racional, no es responsabilidad de los productores. Ellos son simplemente un eslabón más de la cadena que debería asegurar la calidad de miel. No hay duda que las autoridades deberían controlar mejor los productos que se comercializan oficialmente, pero quizás lo más importante sea la cantidad de antimicrobianos que se comercializa fuera de los canales formales.

La apicultura argentina se encuentra en expansión y condiciones de alta producción. Siendo nuestro país uno de los mayores productores de miel del mundo, no debería estar a la espera de nuevos desarrollos terapéuticos generados en otros países, sino identificar esta área como prioritaria y financiar investigación tecnológica tendiente a la mejora productiva, tanto en calidad como en cantidad.

Si bien cada vez más se trabaja en tratamientos alternativos a los quimioterápicos, los antimicrobianos siguen siendo una herramienta esencial en el Manejo Integrado de Plagas (MIP), y su uso racional una necesidad imprescindible.

Por lo tanto es sumamente importante desarrollar estrategias racionales en el uso de los agentes terapéuticos a emplear en explotaciones apícolas, asegurando la obtención de un producto primario, en este caso la miel, de excelente calidad, apto para el consumo humano y sin restricciones para la exportación.

I.6. Hipótesis

1. El uso irracional y desmesurado de antimicrobianos en explotaciones alternativas o menores, como es la apícola, es el responsable de la presencia de niveles residuales de antimicrobianos en miel.
2. El uso irracional de antimicrobianos es la mejor contribución al avance de la resistencia bacteriana a través de selección de cepas resistentes.
3. Los medicamentos mal utilizados son la causa primaria del fracaso terapéutico y de la producción de alimentos de limitada calidad.
4. La dosificación racional de antimicrobianos basada en pruebas de susceptibilidad e integración farmacocinética/farmacodinámica promueve la cura clínica y bacteriológica; controlando el avance de la resistencia bacteriana.
5. El diseño de formulaciones apropiadas al tipo de explotación mejora la eficacia terapéutica.
6. El diseño de estrategias de dosificación basadas en estudios farmacocinéticos/farmacodinámicos clínicamente controlados es un paso esencial para la obtención de alimentos de calidad libres de residuos perjudiciales para la salud pública, con el consecuente impacto positivo en la exportación de este tipo de productos.

I.7. Objetivos

I.7.1. Objetivos generales

A través del incremento del conocimiento sobre la farmacocinética y la farmacodinamia de los antibacterianos, desarrollar sistemas de administración que aseguren elevada eficacia antibacteriana y control de la presencia de residuos en miel. En un país como el nuestro, cuyo principal objetivo es alcanzar el primer lugar como exportador mundial de esta materia prima, el aseguramiento de la calidad de la miel es insoslayable y la única forma de lograrlo es a través de la investigación, el desarrollo tecnológico y la extensión.

I.7.2. Objetivos particulares

1. Evaluar comparativamente, mediante pruebas de susceptibilidad bacteriana, la actividad de tilosina y un menú de antimicrobianos aceptados internacionalmente, frente a las cepas de *P. larvae* aisladas.
2. Calcular la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antibiótico seleccionado frente a las variedades de *P. larvae* aisladas.
3. Validar metodologías analíticas por cromatografía líquida de alta performance y/o método microbiológico aplicando buenas prácticas de laboratorio (GLP) para la cuantificación del antimicrobiano en miel, larvas y abejas.
4. Evaluar el comportamiento farmacocinético del antibiótico seleccionado en colmenas sanas con diferentes niveles poblacionales (1 o 2 cámaras de cría).
5. Evaluar el comportamiento farmacocinético del antibiótico en colmenas sanas en diferentes épocas productivas (otoño-primavera-verano).
6. Evaluar el comportamiento farmacocinético del antimicrobiano seleccionado en colonias con diferente estado sanitario (sanas y enfermas).
7. Evaluar el comportamiento farmacocinético del antibiótico seleccionado en larvas sanas de 2 y 5 días.
8. Identificar y definir las variables farmacocinéticas más relevantes desde un punto de vista clínico.
9. Evaluar la eficacia del antimicrobiano ensayado.

10. Estudiar el perfil residual del antimicrobiano en miel a los efectos de conocer su persistencia según el nivel productivo.
11. Diseñar en base a los datos obtenidos un régimen de dosificación racional basado en la modelización farmacocinética-farmacodinámica.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Estudio bacteriológico

II.1.1. Materiales

II.1.1.1. Productos, reactivos y materiales para microbiología

1. Tilosina tartrato, 92% p/p (Lote N° 20030934 Tecnofarm, Argentina)
2. Ácido nalidíxico, 99% p/p (Fluka, Suiza)
3. Ampicilina trihidrato, 96% p/p (Fluka, Suiza).
4. Cepa de referencia *Paenibacillus larvae* subespecie *larvae* ATCC 9545
5. Cepas de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y ATCC 29213
6. Cepa de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922
7. Extracto de levadura (Laboratorios Britania, Argentina)
8. Agar agar (Merck, Alemania)
9. Piruvato de sodio (Laboratorios Britania, Argentina)
10. Glucosa (Anedra, Argentina)
11. Fosfato de potasio dibásico anhidro (Mallinckrodt Chemical Works, USA)
12. Tiamina clorhidrato (Laboratorio Bagó, Argentina)
13. Nitrato de potasio (Anedra, Argentina)
14. Almidón (Anedra, Argentina)
15. Gelatina (Anedra, Argentina)
16. Leche descremada en polvo (La Serenísima, Argentina)
17. Hidróxido de potasio (Anedra, Argentina)
18. Glicerol (Anedra, Argentina)
19. Medios de cultivo agar y caldo Müller Hinton (Laboratorio Britania, Argentina)
20. Medio de cultivo Infusión agar cerebro corazón (Laboratorios Britania, Argentina)
21. Medio de cultivo agar para detección de movilidad, producción de indol y sulfuro de hidrógeno (SIM) (Laboratorios Britania, Argentina)
22. Medio de cultivo caldo rojo de metilo-Voges Proskauer (RM-VP) (Laboratorios Britania, Argentina)
23. Medio de cultivo agar citrato de Simmons (Laboratorios Britania, Argentina)
24. Medio de cultivo agar "triple sugar iron" (T.S.I.) (Laboratorios Britania, Argentina)

25. Kit para tinción de Gram (Laboratorios Britania, Argentina)
26. Fucsina básica
27. Ácido fénico
28. Reactivo de Griess (Laboratorios Britania, Argentina)
29. Reactivo de Kovacs (Merck, Alemania)
30. Reactivo rojo de metilo (Anedra, Argentina)
31. α -naftol (Anedra, Argentina)
32. Ácido sulfúrico (UCB, Bélgica)
33. Cintas para medir pH 2,5-4,5 y 6,5-10 (Merck, Alemania)
34. Solución fisiológica estéril (0,85 g de cloruro de sodio en 100 mL de agua destilada).
35. Agua tridestilada estéril
36. Alcohol etílico 96°
37. Peróxido de hidrógeno al 3%
38. Solución de hipoclorito de sodio (10 g/L)
39. Discos de antibiograma: penicilina G (10 UI), ampicilina (10 μ g), amoxicilina-ácido clavulánico (20-10 μ g), teicoplanina (30 μ g), vancomicina (30 μ g), gentamicina (10 μ g), eritromicina (15 μ g), azitromicina (15 μ g), cloranfenicol (30 μ g), nitrofurantoína (300 μ g), rifampicina (5 μ g), tetraciclina (30 μ g), trimetoprima-sulfametoxazol (1,25-23,75 μ g), ciprofloxacina (5 μ g) y discos sin carga para ensayo de antimicrobianos de Laboratorios Britania, Argentina; enrofloxacin (5 μ g), florfenicol (30 μ g), clindamicina (2 μ g), ceftiofur (30 μ g) de Oxoid, Inglaterra; y tilmicosina (15 μ g) de Becton Dickinson, USA.

II.1.1.2. Material descartable y de laboratorio

1. Gradillas para tubos de ensayo de 12 y 16 mm de ancho (Deltalab, España)
2. Erlenmeyers graduados de 100, 250, 500 y 1000 mL (IVA, Argentina)
3. Probetas de vidrio graduadas de 50, 100, 250, 500 y 1000 mL de capacidad (IVA, Argentina)
4. Porta filtro de membrana (Millipore, USA)
5. Membranas filtrantes de 47 mm de diámetro y con una porosidad de 0,45 μ m (GE Osmonics, USA)
6. Puntas para micropipetas de 5-200 μ L y 100-1000 μ L (Deltalab, España)
7. Pipetas de vidrio estériles de 1, 2, 5, 10 y 20 mL (IVA, Argentina)
8. Pissetas plásticas de 500 mL
9. Tubos de vidrio borosilicato fondo redondo de 16 x 150 mm y 17 mL (IVA, Argentina)

10. Tubos de vidrio fondo redondo de 16 x 100 mm y 11mL (Monoject, Sherwood Medical, USA)
11. Tapones de polipropileno (Deltalab, España)
12. Tapones de algodón estériles
13. Placas de Petri estériles descartables de 15 x 90 mm de diámetro (Massobact, Argentina)
14. Crioviales estériles y autoclavables de 3 mL y tapa a rosca (Simport, Canadá)
15. Portaobjetos y cubreobjetos
16. Cubetas para espectrofotometría de poliestireno óptico de 4,5 mL (Deltalab, España)
17. Calibre Vernier
18. Termómetro de laboratorio 0-100°C (IVA, Argentina)
19. Ansa de platino (Laboratorios Britania, Argentina)
20. Hisopos estériles
21. Pinzas anatómicas
22. Cuchara-espátula de acero inoxidable
23. Guantes de látex no estériles
24. Algodón hidrófilo
25. Varillas de vidrio
26. Espátulas de plástico descartables
27. Cinta de enmascarar
28. Bandas elásticas de látex
29. Bolsas de nylon o de papel madera de 20 x 30cm
30. Tijeras
31. Papel de aluminio
32. Fibra indeleble
33. Planillas para registro de datos
34. Diagrama guía para ubicación de los discos de antibiograma
35. Bolígrafo

II.1.1.3. Instrumental

1. Microscopio óptico Leitz, Ortholux II con cámara fotográfica incorporada (Leitz, Alemania)
2. Balanza de precisión (Sartorius, Alemania)
3. Balanza granataria (OHAUS CS200, China)
4. Autoclave de Chamberland
5. Espectrofotómetro (Spectral 24-Crudo Caamaño, Argentina)

6. Estufa de cultivo modelo SL70C (SanJor, Argentina)
7. Micropipetas automáticas de 10 μ L, 20-200 μ L y 100-1000 μ L (HT High Tech Lab, Polonia)
8. Baño termostático modelo Masson (Vicking S.R.L., Argentina)
9. Agitador multitubo (Genie 2, Scientific Industries Inc., USA)
10. Estufa de secado (Elibet, Argentina)
11. Mecheros de Bunsen
12. Cabina de bioseguridad Tipo II (Sherico, Taiwan)
13. Flujo laminar (Filtrar, J.F. Pregliasco, Argentina)
14. Freezers -20°C WVG26 (Whirlpool, Argentina)
15. Heladera con freezer WD365ASW (White-Westinghouse, Argentina)

II.1.2. Método

Marcha Bacteriológica

Figura II.1: Diagrama de flujo correspondiente a la marcha bacteriológica para aislamiento, identificación y susceptibilidad antimicrobiana del agente infeccioso

II.1.2.1. Aislamiento, identificación y selección de cepas de *Paenibacillus larvae*Aislamiento a partir de restos larvales

Se seleccionaron colmenas de diferentes apiarios de las localidades de La Plata, Gonnet, Bavio, Verónica, Pehuajó y Villa Maza, Provincia de Buenos Aires; que presentaban signos clínicos sospechosos de LA, para la obtención de muestras de restos larvales. Las muestras estuvieron constituidas por porciones de panales de aproximadamente 20 cm², conteniendo la mayor cantidad posible de crías muertas o decoloridas (Figura II.2). Se envolvieron en papel de diario o madera y embalaron en cajas de cartón para remisión al laboratorio donde se conservaron a -20°C hasta su análisis, siguiendo los procedimientos recomendados en el “*Manual of standards for diagnostic test and vaccines: list A and B diseases of mammals, birds and bees*” (70).

Figura II.2: Cuadro de la cámara de cría presentando restos larvales en forma de escamas adheridas a las paredes de las celdas

Para el aislamiento de *P. larvae* se suspendieron escamas individuales o material viscoso del interior de las celdas de cría en 9 mL de agua destilada estéril y se sometieron a shock térmico a una temperatura de 80°C durante 10-12 min a baño María para eliminar las formas no esporuladas y activar la germinación de las esporas. Luego, mediante hisopos de algodón estériles

se sembraron alícuotas del líquido sobre la superficie de placas de Petri conteniendo 12 mL de medio de cultivo por triplicado (69). Debido a la incapacidad de desarrollo en medios de cultivos simples, el medio de elección fue el agar MYPGP desarrollado por Dingman & Stahly (75). A este medio se le adicionaron 6 µg/mL de ácido nalidíxico convirtiéndolo en un medio semiselectivo para evitar el crecimiento conjunto de *Paenibacillus alvei*, un habitante normal de las colmenas que se multiplica en forma saprófita en los restos larvales afectados de LA, LE y cría sacciforme (79, 90, 227)(ver Anexo VI.1.4).

Las placas se incubaron invertidas a 36-37°C en microaerofilia, con atmósfera de 10% de CO₂ en aire, por el término de 3-4 días hasta observar crecimiento.

Las muestras provenientes de larvas enfermas resultaron en un crecimiento confluyente en las placas de cultivo (Figura II.3); por consiguiente, se realizó un subcultivo con el fin de obtener colonias aisladas para continuar con los procedimientos diagnósticos (70).

Figura II.3: Aislamiento de *P. larvae* en medio MYPGP a partir de larvas enfermas

Identificación del patógeno

La identificación de la especie *P. larvae* se realizó mediante examen microscópico, características morfológicas y coloración de las colonias en medio MYPGP, junto con el perfil bioquímico de las cepas aisladas (69, 70, 77, 78, 88, 89, 91, 228, 229).

Las técnicas microscópicas empleadas fueron: la técnica de la gota pendiente o *hanging drop*, tinción simple con fucsina fenicada de Ziehl y tinción de Gram (ver Anexo VI.1.2). La técnica de la gota pendiente se considera particularmente adecuada para la detección del movimiento Browniano, el cual es característico de las formas esporuladas del *P. larvae* (71). La técnica de la tinción simple y de Gram permiten diferenciar las esporas o células vegetativas del microorganismo por sus características morfológicas y de agrupación, de los demás microorganismos esporulados pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Brevibacillus*, que pueden estar presentes en las colmenas afectadas (71, 88, 89, 90, 230).

Posteriormente al examen microscópico, las colonias aisladas fueron identificadas mediante su perfil bioquímico, realizado por triplicado, a partir de una placa de cultivo de 24-48 h de incubación, de la cepa bacteriana a ensayar, en medio sólido MYPGP. Los ensayos incluyeron las siguientes pruebas bioquímicas: catalasa, reducción de nitratos a nitritos, hidrólisis de caseína, hidrólisis de almidón, crecimiento y supervivencia en caldo nutritivo, descomposición de gelatina, crecimiento en agar citrato de Simmons, producción de diacetilo (Voges-Proskauer) y producción de indol (ver Anexo VI.1.3).

Se utilizó como cepa control para todos los ensayos al *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* ATCC 9545¹.

Selección de cepas de campo

El agente causal se pudo aislar de la totalidad de las muestras obtenidas, pudiendo confirmar de este modo el estatus sanitario de las colmenas muestreadas sospechosas de LA.

A partir de los 6 apiarios, se obtuvieron 11 aislamientos, sobre los que se realizaron las pruebas de susceptibilidad bacteriana que incluyeron la técnica de antibiograma y la determinación de CIM.

A su vez, se seleccionaron 6 de estos aislamientos originarios de un mismo apiario de la localidad de La Plata, con el objetivo de constituir un lote uniforme de experimentación para llevar a cabo el estudio farmacocinético en colmenas enfermas en período otoñal.

¹ Adquirida a través del American Type Culture Collection (ATCC, USA) con fondos de la Maestría en Tecnología e Higiene de los Alimentos, UNLP.

Acondicionamiento de la cepa de referencia *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* ATCC 9545

Una ampolla conteniendo células liofilizadas de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* ATCC 9545 fue abierta según las especificaciones técnicas de American Type Culture Collection. A partir de un tubo con caldo de cultivo (BHI con 0,1 mg/L de clorhidrato de tiamina), se transfirió 1 mL al vial interno de la ampolla para rehidratar el pellet. La suspensión celular obtenida de esta forma fue transferida asépticamente de vuelta al tubo de cultivo conteniendo el caldo BHIT. Algunas gotas restantes de la suspensión fueron transferidas a un segundo tubo con caldo y a una placa de agar BHIT.

Los tubos y placas se incubaron a 37°C por 48-72 h. Una vez activado, el cultivo de *P. larvae* fue transferido e incubado por 48 h a 37°C en placas con agar MYPGP.

Conservación y mantenimiento de cepas

Con el objetivo de disponer los cultivos para estudios futuros, células vegetativas del microorganismo fueron removidas de colonias crecidas en agar y transferidas a viales conteniendo 3 mL de caldo BHI o caldo MYPGP con 20% de glicerol. Los viales fueron sellados y debidamente rotulados para luego ser almacenados en freezer a -20°C.

Para su recuperación se descongelaron alícuotas de los cultivos y se realizaron siembras en placas con agar MYPGP que se incubaron durante 48 h en estufa con atmósfera del 10% de CO₂ a 37°C.

II.1.2.2. Selección del antimicrobiano a través de pruebas cuali-cuantitativas de susceptibilidad bacteriana

II.1.2.2.1. Prueba cualitativa de susceptibilidad por el método de difusión de discos

Fundamento

El antibiograma tiene como objetivo evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica (231, 232).

El principio del método involucra la aplicación de una cantidad determinada de antimicrobiano en un disco de papel, sobre la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo. Se formará así, por difusión, un gradiente de

concentración de antimicrobiano alrededor del disco, estando la sensibilidad del microorganismo indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano (233). Teóricamente, el borde de esta zona de inhibición se corresponde con la CIM para esa combinación concreta de bacteria y antimicrobiano. En general, cuanto mayor es la zona de inhibición, menor es la concentración de antimicrobiano que se requiere para inhibir el crecimiento de los microorganismos (232). El diámetro obtenido dependerá también del espesor de la capa de agar, pH y composición del medio de cultivo, de la capacidad de difusión de la droga en ese medio, de la temperatura y atmósfera de incubación, de la velocidad de duplicación bacteriana, y del tamaño del inóculo y fase de crecimiento de la bacteria (233).

Debido a la ausencia de estandarización del procedimiento para evaluar al microorganismo, se realizaron modificaciones a la técnica original de antibiograma de Bauer y colaboradores (234) siguiendo las normas generales establecidas por el instituto de estandarización de procedimientos de laboratorios clínicos de E.E.U.U (235, 236), basándonos en métodos previamente descritos (91, 220).

Preparación de las placas con el medio de cultivo

El medio de cultivo MYPGP se preparó en el laboratorio a partir de una base comercial deshidratada de caldo Müller-Hinton suplementado con extracto de levadura, piruvato de sodio y K_2HPO_4 (ver Anexo VI.1.1). Una vez retirado el medio de la autoclave, se permitió su enfriamiento a baño María a 45-50°C; alcanzada esta temperatura se añadió la glucosa previamente esterilizada. Luego, se vertió en placas de Petri estériles un volumen del medio de cultivo de forma tal de obtener una altura uniforme de 4 mm (esto corresponde a 20 mL de agar para placas de 90 mm de diámetro interno).

El pH se controló al preparar cada lote de medio de cultivo, utilizando cintas de papel (Merck KGaA, Alemania) que se introdujeron en un macerado preparado a partir del medio una vez esterilizado, gelificado y a temperatura ambiente. El agar debe tener un pH entre 7,2 y 7,4 en estas condiciones. Las correcciones necesarias se realizaron por el agregado de NaOH 1M o HCl 1M.

Las placas que no se usaron en el día, se mantuvieron en refrigerador (2-8°C) por el período de una semana. Previamente a la utilización, las mismas fueron termostatzadas a 35°C durante 10-30 min antes de la siembra del microorganismo.

Preparación del inóculo a partir de la cepa aislada

La preparación del inóculo se realizó por el método de suspensión directa de colonias, por considerarse el mismo de elección para microorganismos de difícil desarrollo (237, 237). A partir de una placa de cultivo de 24-48 h de incubación de la cepa bacteriana a ensayar (medio sólido MYPGP), se seleccionaron varias colonias uniformes, las cuales se suspendieron en 4 o 5 mL de solución fisiológica estéril. El inóculo se ajustó a una turbidez equivalente al 0,5 de la escala de Mac Farland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL) por comparación visual con el estándar (ver Anexo VI.1.1).

Inoculación de las placas

Antes de que transcurran 15 min de haberse ajustado el inóculo, se introdujo un hisopo estéril dentro de la suspensión y al retirarlo se tuvo la precaución de rotarlo varias veces contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido, con la finalidad de eliminar el exceso.

La superficie seca del agar se inoculó por hisopado en tres direcciones distintas para asegurar una completa y homogénea distribución. Se procedió a esperar de 3 a 5 min, pero no más de 15 min antes de aplicar los discos para que el exceso de humedad superficial fuera absorbido.

Aplicación de los discos de antibiótico en las placas inoculadas

Se utilizaron en este ensayo discos de papel comerciales de los siguientes antibióticos: penicilina G (10 UI), ampicilina (10 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (20-10 µg), teicoplanina (30 µg), vancomicina (30 µg), gentamicina (10 µg), eritromicina (15 µg), azitromicina (15 µg), cloranfenicol (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), rifampicina (5 µg), clindamicina (2 µg), tetraciclina (30 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (1.25-23.75 µg), ciprofloxacina (5 µg), enrofloxacin (5 µg), florfenicol (30 µg), ceftiofur (30 µg), tilmicosina (15 µg).

Los discos de tilosina por su parte, se prepararon en el laboratorio, impregnando 0,02 mL de una solución stock del antibiótico sobre discos sin carga para ensayo de antimicrobianos (Laboratorios Britania), de forma tal de obtener una concentración final de 15 µg/disco. Se los dejó secar al aire en cámara de flujo laminar para evitar contaminación y luego se los colocó en frascos desecadores y almacenó a -20°C. Se realizó un control de calidad del procedimiento, preparando simultáneamente discos de ampicilina y comparando los diámetros de halo obtenidos en contraste con discos comerciales para la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 25923 en medio Müller-Hinton.

Para su utilización, los discos se sacaron del freezer 1 ó 2 h antes de su uso a fin de lograr un equilibrio en la temperatura antes de ser abiertos los frascos o contenedores.

Se colocaron los discos sobre la superficie del agar inoculado, con una pinza de punta fina estéril y aplicando una ligera presión para asegurar una perfecta coaptación con la superficie del agar. Se tomó la precaución de no colocar más de 3 discos por placa de Petri inoculada de forma que no se produjese superposición de los halos de inhibición.

Se efectuaron 3 repeticiones por cada antibiótico probado a cada una de las cepas aisladas (11 cepas x 3 repeticiones x 19 antibióticos).

Incubación

Las placas se incubaron invertidas, en grupos no superiores a 5 placas, a 35°C en atmósfera aerobia dentro de los 15 min posteriores a la aplicación de los discos. El tiempo de incubación fue de 24-48 h.

Lectura de las placas e interpretación de resultados

Los diámetros de las zonas de completa inhibición (incluyendo los discos) se midieron con un calibre Vernier, sobre el reverso de la placa y utilizando luz transmitida para visualizar las colonias diminutas. Todas las mediciones se efectuaron a las 24 y 48 h con aproximación de 1mm (Figura II.4).

Los tamaños de las zonas de inhibición se interpretaron en función de los puntos de corte que establece el CLSI (Tabla II.1). La mayoría de los valores de referencia utilizados corresponden al documento "M31-A3 - *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals*" (235). Los halos producidos por teicoplanina, ciprofloxacina, azitromicina y nitrofurantoína fueron comparados con los puntos de corte que establece el documento "M100-S19 - *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement*" (238) y los organismos se informaron como sensibles, intermedios o resistentes frente al antimicrobiano ensayado.

Figura II.4: Susceptibilidad antimicrobiana de una cepa de *P. larvae* por el método de difusión de discos luego de 48 horas de incubación

El término sensible (S) indica que la infección ocasionada por la cepa evaluada podría tratarse de forma adecuada empleando las dosis habituales del antimicrobiano (235).

El término sensibilidad intermedia (I) indica que el halo de inhibición traducido en valores de CIM se aproxima a las concentraciones de antimicrobiano alcanzables en sangre y/o tejidos, y que podría esperarse eficacia clínica en aquellas localizaciones en las que se alcanzan altas concentraciones de antimicrobiano, o cuando se emplean dosis más elevadas de lo habitual (235).

El término resistente (R) hace referencia a aquellos microorganismos que no se inhiben por las concentraciones del correspondiente antimicrobiano, habitualmente alcanzadas en sangre/tejidos, o a aquellos microorganismos en los que existen mecanismos de resistencia específicos para el agente estudiado, en los que no ha habido una adecuada respuesta clínica cuando se ha usado como tratamiento (235).

Tabla II.1: Puntos de corte establecidos por la CLSI para la interpretación de resultados en ensayos de susceptibilidad por la técnica de difusión de discos

Antimicrobiano	Carga del disco	Diámetro de halo (mm)			Observaciones
		Resistente	Intermedio	Sensible	
Penicilina G ^a	10 UI	≤28	--	≥29	Evalúa susceptibilidad a amoxicilina y hetacilina
Ampicilina ^a	10µg	≤28	--	≥29	
Ceftiofur ^a	30µg	≤17	18-20	≥21	
Amoxicilina/ácido clavulánico ^a	20/10µg	≤13	14-17	≥18	
Vancomicina ^a	30µg	--	--	≥15	
Teicoplanina ^b	30µg	≤10	11-13	≥14	
Eritromicina ^a	15µg	≤13	14-22	≥23	
Azitromicina ^b	15µg	≤13	14-17	≥18	
Tilmicosina ^a	15µg	≤10	11-13	≥14	
Trimetoprim / sulfametoxazol ^a	1,25/23,75 µg	≤10	11-15	≥16	Evalúa TMP-sulfadiazina y ormetoprim-sulfadimetoxina
Gentamicina ^a	10µg	≤12	13-14	≥15	
Ciprofloxacin ^b	5µg	≤15	16-20	≥21	
Enrofloxacin ^a	5µg	≤16	17-22	≥23	
Nitrofurantoína ^b	300µg	≤14	15-16	≥17	
Cloranfenicol ^a	30µg	≤12	13-17	≥18	
Florfenicol ^a	30µg	≤14	15-18	≥19	
Rifampicina ^a	5µg	≤16	17-19	≥20	
Tetraciclina ^a	30µg	≤14	15-18	≥19	Evalúa clortetraciclina, oxitetraciclina, minociclina y doxiciclina
Clindamicina ^a	2 µg	≤14	15-20	≥21	

^a Valores tomados del documento CLSI M31-A3.

^b valores tomados del documento CLSI M100-S19

Control de calidad

Debido a que la metodología utilizada no se encuentra validada y teniendo en cuenta que la adición de sustancias al medio de cultivo puede tener un efecto antagónico con determinados antimicrobianos, se estudió la sensibilidad de dos cepas control en medio Müller Hinton y en el medio suplementado frente a los diferentes antimicrobianos ensayados con el fin de analizar las diferencias. Esto permitió no sólo evaluar la calidad del medio de cultivo, sino también los reactivos, discos (incluida su conservación) y la metodología utilizada. Las cepas utilizadas fueron *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923². Los ensayos se realizaron siguiendo las recomendaciones de la CLSI para la evaluación de dichas cepas y los resultados obtenidos, fueron interpretados por las tablas provistas por dicho organismo (Tabla II.2).

A su vez, la cepa de *P. larvae* ATCC 9545, fue utilizada como estándar de control para los rangos de diámetro de halo de inhibición resultantes de la confrontación de las cepas de campo, frente a cada antimicrobiano ensayado.

² Provistas por el Servicio Antimicrobianos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr. C. G. Malbrán".

Tabla II.2: Rangos de diámetro de halo de inhibición establecidos por la CLSI para las cepas de referencia *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923

Antimicrobiano	Carga del disco	Diámetro del halo de inhibición (mm)	
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922
Penicilina G ^a	10 UI	26-37	-
Ampicilina ^a	10µg	27-35	16-22
Ceftiofur ^a	30µg	27-31	26-31
Amoxicilina/ácido clavulánico ^a	20/10µg	28-36	18-24
Vancomicina ^a	30µg	17-21	-
Teicoplanina ^b	30µg	15-21	-
Eritromicina ^a	15µg	22-30	-
Azitromicina ^b	15µg	21-26	-
Tilmicosina ^a	15µg	17-21	-
Trimetoprim /sulfametoxazol ^a	1,25/23,75	24-32	23-29
Gentamicina ^a	10µg	19-27	19-26
Ciprofloxacina ^b	5µg	22-30	30-40
Enrofloxacin ^a	5µg	27-31	32-40
Nitrofurantoína ^b	300µg	18-22	20-25
Cloranfenicol ^a	30µg	19-26	21-27
Florfenicol ^a	30µg	22-29	22-28
Rifampicina ^a	5µg	26-34	8-10
Tetraciclina ^a	30µg	24-30	18-25
Clindamicina ^a	2µg	24-30	-

^a Valores tomados del documento CLSI M31-A3

^b valores tomados del documento CLSI M100-S19

Conservación de cepas control

Las cepas de *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 fueron mantenidas a una temperatura de -20°C en crioviales con caldo tripticasa soya y 15% de glicerol con el fin de preservar su viabilidad y minimizar posibles modificaciones.

Para resembrarlas se utilizó un ansa de platino, con el que se frotó la superficie del material congelado y se sembró en una placa de agar sangre. Se incubó a 35°C, de 18 a 20 h, y a partir de este cultivo, se realizó una nueva resiembra para poder emplearse en el ensayo (231).

El mantenimiento de la cepa de *P. larvae* ATCC 9545 fue descrito en el punto II.1.2.1.5

II.1.2.2.2. Prueba cuantitativa de susceptibilidad por el método de dilución en agar

Fundamento

La finalidad de los métodos de dilución, es determinar la concentración más baja del antimicrobiano ensayado que es capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria analizada, CIM, que normalmente se expresa en microgramos/mililitro o miligramos/litro (232).

El principio del método, implica la incorporación de un agente antimicrobiano a concentraciones progresivamente decrecientes, en un medio solidificado con agar y la aplicación de un inóculo bacteriano definido sobre la superficie de la placa (232). Como se realiza utilizando una escala discontinua (habitualmente concentraciones decrecientes en base 2), los valores de CIM reales de un determinado antimicrobiano, se encontrarán en algún valor situado entre la concentración más baja del ensayo que inhibe el crecimiento de la bacteria y la concentración inmediatamente inferior (231, 237, 237).

Los resultados derivados de estos ensayos se consideran de referencia para la determinación cuantitativa de la actividad de los antimicrobianos (231, 232).

Se determinó la CIM₅₀ y la CIM₉₀ de tilosina para cada una de las cepas aisladas por el método de dilución en agar, utilizando el medio MYPGP, siguiendo los lineamientos generales establecidas por el CLSI (235, 239), basándonos en métodos previamente descritos (91, 213).

Preparación de las diluciones de antimicrobiano

Se preparó una solución stock madre de tilosina, a una concentración 10 veces mayor a la dilución más alta utilizada (235). Para tal fin, la sustancia valorada fue pesada en una balanza de precisión (Ecuación II.1) y posteriormente se añadieron 10 mL de etanol al 95% como solvente. Esta solución fue el punto de partida para la preparación de diluciones seriadas de trabajo (1:2), utilizando agua bidestilada estéril como diluyente. La utilización de estas diluciones se limitó al día de su preparación.

$$\text{Peso}(mg) = \frac{\text{Volumen (mL)} \times \text{Concentración} \left(\frac{\mu g}{mL}\right)}{\text{Potencia} \left(\frac{\mu g}{mg}\right)} \quad \text{Ecuación II.1}$$

Preparación de las placas con el medio de cultivo

El medio de cultivo agar MYPGP fue elaborado en el laboratorio como fue descrito anteriormente para la técnica de antibiograma. Una vez retirado el medio de la autoclave, se permitió su enfriamiento a baño María a 45-50°C; se añadió la glucosa previamente esterilizada y se procedió a incorporar el antimicrobiano cuando el medio aún estaba fundido. Luego, se vertió en placas de Petri estériles un volumen de 20 mL de medio con antimicrobiano (19:1) por placa de 90 mm de diámetro interno. Las concentraciones ensayadas fueron: 0,0039; 0,0078; 0,0156; 0,0312; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1 y 2 µg/mL de medio para las cepas de *P. larvae* de campo y referencia. En el caso de la cepas control de *E. coli* y *S. aureus*, se agregaron 4 diluciones crecientes más (4, 8, 16 y 32 µg/mL de medio de cultivo), para abarcar los rangos de aceptación establecidos por la CLSI para estas cepas (235).

El pH se controló al preparar cada lote de medio de cultivo, para asegurar un valor entre 7,2 y 7,4 una vez esterilizado, gelificado y a temperatura ambiente.

Las placas se dejaron solidificar a temperatura ambiente y se utilizaron inmediatamente.

Preparación del inóculo a partir de la cepa aislada

Se seleccionaron varias colonias uniformes, provenientes de una placa de cultivo de 24-48 h de incubación a 37°C en medio sólido MYPGP, de la cepa bacteriana a ensayar. Las mismas se suspendieron en 4 o 5 mL de solución fisiológica estéril (método de suspensión directa de colonias) y se estandarizaron a una concentración de $1-2 \times 10^8$ células/mL (equivalente a 0,5 de la escala de Mc Farland, absorbancia de 0,258 medida a 620 nm). Posteriormente, se realizó una dilución 1:100 para alcanzar una concentración de 10^6 células/mL y a partir de esta solución se procedió a la inoculación de las placas de cultivo.

Inoculación de las placas e incubación

Para la inoculación se prepararon las series de placas, de modo de que se comenzó sembrando un control sin antimicrobiano, se continuó a partir de la placa con menor

concentración de tilosina y se finalizó inoculando una nueva placa de control sin antimicrobiano (231).

Las diferentes suspensiones bacterianas se sembraron sobre la superficie del agar perfectamente seco, utilizando una micropipeta automática (HT High Tech Lab, Polonia) para depositar gotas de 10 µL, conteniendo aproximadamente 10⁴ UFC/gota. Se realizaron 10 réplicas en cada placa y a su vez cada cepa se ensayó por duplicado. Las placas inoculadas se dejaron a temperatura ambiente hasta que las gotas de inóculo estuvieran secas. Posteriormente todas las placas (incluso los controles) se incubaron a 37°C ± 0,5 en aerobiosis evaluándose el desarrollo a las 48 h. En el caso de las cepas control de *E. coli* y *S. aureus* la evaluación se realizó entre las 18-20 h (235).

Control de calidad

Para evaluar esterilidad del medio de cultivo y pureza de las cepas, se incluyeron en la prueba placas sin antimicrobiano como controles positivos (inoculadas con el microorganismo) y negativos (sin inocular).

La cepa *P. larvae* ATCC 9545 fue utilizada como estándar de control del rango de la CIM y se utilizaron también las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213 para evaluar la exactitud y fiabilidad de la metodología utilizando el medio MYPGP. Los resultados obtenidos fueron contrastados con los valores propuestos por la CLSI (Tabla II.3), del mismo modo que se hizo en el ensayo de antibiograma.

Tabla II.3: Puntos de corte establecidos por la CLSI para la interpretación de resultados en la determinación de CIM y valores de aceptación para *E. coli* ATCC 25922 y ATCC *S. aureus* 29213

Macrólido	CIM (µg/mL)			<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
	Resistente	Intermedio	Sensible	ATCC 29213	ATCC 25922
Eritromicina	≥ 8	1-4	≤ 0,5	0,25-1	-
Tilmicosina	≥ 32	16	≤ 8	1-4	-
Tulatromicina	≥ 64	32	≤ 16	2-8	-
Tilosina*	-	-	-	0,5-4	-

Valores tomados del documento CLSI M31-A3.

*No existen datos disponibles para la interpretación de aislamientos patógenos veterinarios.

Lectura de las placas e interpretación de resultados

Tras la incubación se procedió a la lectura de los resultados, colocando las placas sobre un fondo oscuro no refractivo, para una correcta visualización (Figura II.5). La CIM se definió como la menor concentración de antimicrobiano que a simple vista inhibió completamente el crecimiento del microorganismo estudiado; no se consideró crecimiento la aparición de una colonia aislada o de un halo tenue debido al propio inóculo (231, 235).

Figura II.5: Determinación de la concentración inhibitoria mínima de *P. larvae* frente al antimicrobiano tilosina por el método de dilución en agar

II.2. Estudio farmacocinético

II.2.1. Materiales

II.2.1.1. Colmenas

Se utilizaron un total de 36 colonias de abejas (*Apis mellifera*) alojadas en colmenas de tipo Langstroht de 10 cuadros por alza constituidas por una o dos cámaras de cría y un alza de miel. Las colmenas se seleccionaron de 3 apiarios particulares de las localidades de La Plata, Verónica y Gonnet, Provincia de Buenos Aires.

II.2.1.2. Fármaco

Se empleó tilosina tartrato suministrada por el laboratorio Tecnofarm (Argentina) con una pureza del 92% p/p, ya sea como sustancia patrón para la cuantificación a partir de las diferentes matrices biológicas, como para la preparación de la formulación destinada a los tratamientos aplicados a las colmenas experimentales.

II.2.1.3. Productos biológicos y reactivos

1. Cepa de referencia *Micrococcus luteus* ATCC 9341
2. Metanol PA (Dorwil, Argentina)
3. Metanol calidad HPLC (Mallinckrodt Chemical Works, USA)
4. Fosfato monobásico de sodio (Anedra, Argentina)
5. Fosfato dibásico de sodio (Mallinckrodt Chemical Works, USA)
6. Hidróxido de potasio (Anedra, Argentina)
7. Medio de cultivo agar Müller Hinton (Laboratorio Britania, Argentina)
8. Medio para ensayo antibiótico N° 1 (Laboratorio Britania, Argentina)
9. Miel, abejas y larvas libres de residuos de antimicrobianos
10. Solución fisiológica estéril (0.85 g de cloruro de sodio en 100 mL de agua destilada).
11. Agua bidestilada estéril
12. Alcohol etílico 96°
13. Alcohol isopropílico (Sintorgan, Argentina)
14. Cloroformo (Anedra, Argentina)
15. Glicerol (Anedra, Argentina)
16. Ácido sulfúrico (UCB, Bélgica)

II.2.1.4. Material descartable y de laboratorio

1. Gradillas para tubos de ensayo de 10 y 16 mm de ancho (Deltalab, España)
2. Gradillas de madera
3. Erlenmeyers graduados de 100, 250, 500 y 1000 mL (IVA, Argentina)
4. Probetas de vidrio de 50, 100, 250, 500 y 1000 mL (IVA, Argentina)
5. Matraces aforados de vidrio de 10, 100 y 250 mL (IVA, Argentina)
6. Micropipetas automáticas de 20-200 μ L y 100-1000 μ L (HT High Tech Lab, Polonia); 1-5 mL Pipetman (Gilson inc, Francia)
7. Puntas para micropipetas de 5-200 μ L y 100-1000 μ L (Deltalab, España)
8. Pipetas de vidrio estériles de 1, 2, 5, 10 y 20 mL (IVA, Argentina)
9. Cubetas para espectrofotometría de poliestireno óptico de 4,5 mL (Deltalab, España)
10. Tubos de vidrio borosilicato fondo redondo de 16 x 150 mm y 17 mL (IVA, Argentina)
11. Tubos de vidrio fondo redondo de 16 x 100 mm y 11mL (Monoject, Sherwood Medical, USA)
12. Tapones de goma (Monoject, Sherwood Medical, USA)
13. Tapones de polietileno (Deltalab, España)
14. Tapones de algodón estériles
15. Tubos de polipropileno fondo cónico con faldón de 29,5 mm y 50 mL con tapa de polietileno a rosca con cierre hermético (Deltalab, España)
16. Tubos de polipropileno fondo cónico de 17 mm y 15 mL con tapa de polietileno a rosca con cierre hermético (Tecnon, Argentina)
17. Recipiente colector de polipropileno de 100mL
18. Pipetas Pasteur de polietileno de 3 mL
19. Placas de vidrio estériles (25 cm x 25 cm y 2,5 cm de alto)
20. Cilindros de acero inoxidable estériles (10 mm de alto, 6 mm de diámetro interno y 8 mm de diámetro externo)
21. Cuchara-espátula de acero inoxidable
22. Calibre Vernier
23. Cintas para medir pH 2,5-4,5 y 6,5-10 (Merck, Alemania)
24. Termómetro de laboratorio 0-100°C (IVA, Argentina)
25. Ansa de platino (Laboratorios Britania, Argentina)
26. Pinzas anatómicas
27. Varillas de vidrio
28. Espátulas de plástico descartables

29. Algodón hidrófilo
30. Cinta de enmascarar
31. Marcador de fibra indeleble, varios colores
32. Bandas elásticas de látex
33. Planilla de distribución de muestras y patrones en los cilindros
34. Diagrama guía para la ubicación de números y cilindros

II.2.1.5. Instrumental

1. Balanza de precisión (Sartorius, Alemania)
2. Balanza granataria (OHAUS CS200, China)
3. Baño termostático modelo Masson I (Vicking S.R.L., Argentina)
4. Baño ultrasónico modelo 250 T (Aquasonic, VWR Scientific Products, USA)
5. Evaporador concentrador de muestras
6. Agitador multitubo (Genie2, Scientific Industries Inc, New York, USA)
7. Aparato de dispersión Ultra-Turrax T 25 basic (Janke & Kunkel, Alemania)
8. Centrifuga refrigerada DSC-16 RV (Presvac, Argentina)
9. Bomba de vacío
10. Autoclave
11. Estufa de cultivo modelo SL70C (SanJor, Argentina)
12. Estufa de secado (Elibet, Argentina)
13. Mecheros de Bunsen
14. Flujo laminar (Filtrar, J.F. Pregliasco, Argentina)
15. Espectrofotómetro (Spectral 24- Crudo Caamaño, Argentina)
16. Freezers -20°C WVG26 (Whirlpool, Argentina)
17. Heladera con freezer WD365ASW (White-Westinghouse, Argentina)
18. Indumentaria y herramientas de trabajo para manejo de colmenas: máscara, sombrero, mameluco, botas, pinzas y ahumador.
19. Extractor mecánico de 16 cuadros
20. Extractor manual Cowan de 3 cuadros.

II.2.1.6. Equipamiento informático

1. Calculadora científica Casio FX-570 AD
2. Computadora personal Toshiba Satellite A305-S6858

3. Impresora Epson C65
4. Hoja de cálculo Microsoft Excel
5. Programa para análisis farmacocinético: WinNonlin Professional 5.2 (Scientific consulting Inc., Cary, N.C.)
6. Programa para análisis estadístico: Software estadístico Statgraphic Centurion XV versión 15.2.05 (StatPoint Inc., 1982-2007)

II.2.2. Método

Estudio farmacocinético

Figura II.6: Diseño experimental del estudio farmacocinético

II.2.2.1. Colmenas y diseño experimental

Se seleccionaron 36 colmenas provenientes de 3 apiarios particulares diferentes de las localidades de La Plata, Verónica y Gonnet, Provincia de Buenos Aires. A partir de las mismas, se conformaron 6 lotes de experimentación de 6 colmenas cada uno teniendo en cuenta tres variables: nivel poblacional (1 o 2 cámaras de cría), época del año del tratamiento (otoño, primavera y verano) y estado sanitario (sanas y enfermas).

Lote A: Alto nivel poblacional (35-40000 habitantes aproximadamente), sanas, tratamiento en otoño.

Lote B: Bajo nivel poblacional (12-15000 habitantes aproximadamente), sanas, tratamiento en otoño.

Lote C: Bajo nivel poblacional (12-15000 habitantes aproximadamente), enfermas, tratamiento en otoño.

Lote D (control): Bajo nivel poblacional (12-15000 habitantes aproximadamente), enfermas, sin tratamiento en otoño. Se procedió a la evaluación del estado general de las colmenas y cuantificación estimativa del número de habitantes por observación, en cada punto de muestreo de los lotes B y C.

Lote E: Bajo nivel poblacional (25-35000 habitantes aproximadamente), sanas, tratamiento en primavera.

Lote F: Bajo nivel poblacional (20-25000 habitantes aproximadamente), sanas, tratamiento en verano.

El nivel poblacional se determinó en un primer momento por el número de cámaras de cría que ocupaba la colonia y posteriormente a partir de la estimación del número de cuadros ocupados por las abejas en cada cámara.

El estado sanitario de las colonias se determinó a partir de la detección de signos clínicos de la enfermedad por observación directa de los marcos de cría y posterior confirmación diagnóstica en el laboratorio a partir de restos larvales.

Al comienzo de cada ensayo, las colmenas de cada lote se manipularon para asegurar un número similar de individuos adultos, áreas de cría y reservas alimenticias (polen y miel) entre las mismas. En caso de ser necesario, recibieron suplemento dietario a base de jarabe de sacarosa al 50%.

Durante todo el estudio farmacocinético se tomó la precaución de mantener a los lotes de colmenas sometidos a tratamiento a una distancia mayor a 3 km de la presencia de otras colmenas, para impedir el pillaje entre las mismas y la contaminación cruzada.

II.2.2.2. Administración del fármaco y toma de muestras

Al comenzar el estudio experimental, se realizaron varios pilotos para establecer la mejor forma de administrar el antimicrobiano para asegurar el consumo de la formulación en el período inter-dosis y también la metodología de recolección de las muestras de miel.

Previamente a la administración del principio químico se tomaron muestras de miel, abejas y larvas de cada colmena denominadas muestras blanco, libres de agentes antibacterianos, para utilizar posteriormente en la puesta a punto del método analítico y como control negativo durante el análisis.

Cada uno de los grupos experimentales recibió tilosina tartrato al 1% en una base de azúcar finamente molida formulada en nuestro laboratorio. La dosis total fue de 600 mg del principio activo en 60 g de azúcar repartida en tres aplicaciones con un intervalo de 7 días cada una. Estas dosis fueron establecidas en base a trabajos previos de eficacia a campo (240, 241, 242).

La formulación fue preparada el día inmediato anterior a la aplicación, e individualizada en dosis para administrar a cada colmena en bolsas de papel madera. La administración se realizó mediante espolvoreo de la formulación en la cámara de cría sobre los cabezales de los marcos (Figura II.7). Se determinó como día 0, al día de la última dosis de antimicrobiano administrado.

Las colmenas seleccionadas no formaban parte de ningún experimento paralelo, ni habían recibido medicación alguna en los últimos dos años previos al ensayo.

Todos los muestreos se realizaron entre las 10 y 16 h con el propósito de que la manipulación y apertura de las colmenas fuera coincidente con el momento de mayor registro de temperatura diurna. Se utilizó equipo de trabajo y protección recomendada para apicultor y en caso de ser necesario, las colmenas fueron manejadas con ayuda de ahumador.

Figura II.7: Colocación de la formulación de tilosina sobre los cabezales de los marcos dentro de la cámara de cría

Las muestras de abejas se obtuvieron mediante cepillado de las superficies laterales de 2 cuadros de cría de cada colmena y se recolectaron dentro de un recipiente colector plástico de 100 mL para muestras biológicas previamente rotulado (Figura II.8 y II.9).

La toma de muestras de larvas de dos días de vida (larva joven) y cinco días de vida (larva adulta), se realizó mediante aguja de transferencia modificada, a los tiempos estipulados. Se extrajeron aproximadamente 150-200 larvas al azar de 1 o 2 cuadros de la cámara de cría, que fueron recolectadas en tubos de polipropileno de fondo cónico de 15 y 50 mL de capacidad para larvas jóvenes y adultas respectivamente (Figura II.11).

Las muestras de miel se tomaron de 2 cuadros de la cámara de cría y/o 2 cuadros del alza melífera por colmena según el ensayo. En caso de ser necesario, en un primer momento se desopercularon los cuadros y luego con pipeta Pasteur, se procedió a la recolección de miel a partir de diferentes celdas de cada cara del cuadro extraído. La misma fue almacenada en tubos de polipropileno cónicos de 15 mL de capacidad (Figura II.10). Una vez finalizado el muestreo, se extrajeron los cuadros por completo mediante centrifugación, utilizando un extractor motorizado o manual, para luego ser devueltos a la colmena. En todos los casos, los cuadros

fueron marcados con precintos plásticos y rotulados con el objetivo de utilizar siempre los mismos cuadros a cada tiempo de muestreo.

Lote A: Obtención de muestras de abejas y miel de la cámara de cría a los siguientes tiempos post-administración: 1, 7, 14, 21, 28 y 43 días. En este lote, se recolectaron muestras de miel adicionales a los 371 días post-tratamiento, durante la cosecha del año siguiente para cuantificar los niveles residuales del antimicrobiano.

Lote B: Recolección de abejas y miel a los siguientes tiempos post-administración: 1, 7, 14, 21, 28, 43, 56, 70 y 84 días. En este caso se pudo prolongar en tres puntos el tiempo de muestreo hasta el comienzo de la primavera. Sin embargo, no fue factible, por razones ajenas al experimento, la obtención de muestras de miel previas a la cosecha siguiente.

Lote C: Recolección de las mismas muestras biológicas y a los mismos tiempos post-tratamiento que los obtenidos en el lote B.

Lote E: Recolección de abejas y larvas a los siguientes tiempos post-administración: 1, 3, 7, 14, 21, 28, 43, 56, 70, 84 y 98 días. Se tomaron también dos muestras inter-dosificación entre la 1° y 2° dosis; y entre la 2° y 3° dosis. A partir de la muestra del día 21 post-dosificación se procedió a recolectar muestras de miel del alza superior e inferior de cada colmena a intervalos regulares de 14 días hasta el momento de la cosecha. Momento en el cual, se obtuvieron también muestras de miel de cuadros de las alzas superiores, no utilizados con anterioridad para cuantificar niveles residuales de tilosina.

Lote F: Obtención de abejas, larvas y miel a los siguientes tiempos post-dosificación: 1, 3, 7, 14, 21 y 28 días. Se tomaron también dos muestras inter-dosificación entre la 1° y 2° dosis; y entre la 2° y 3° dosis.

El registro de la toma de muestras se llevó a cabo en planillas diseñadas a tal fin en las que constaban los datos de todas las colmenas (identificación, estado sanitario, nivel poblacional), fecha del ensayo y observaciones.

Todas las muestras recolectadas fueron almacenadas en freezer a -20°C hasta su posterior análisis.

Figura II.8, Figura II.9, Figura II.10 y Figura II.11: Toma de muestras a campo de abejas, larvas y miel

II.2.2.3. Procedimiento analítico

II.2.2.3.1. Preparación de las muestras

Miel

La metodología para la detección de tilosina fue desarrollada modificando el método publicado por Nakajima y col. (218), considerando las propiedades físico-químicas de la molécula en estudio.

Dos gramos de miel problema fueron pesados en tubos individuales de polipropileno (50 mL) y diluidos con 10 mL de una solución compuesta por buffer fosfato pH 8, metanol y propanol en proporción 4:5:1 v/v. Previamente a la extracción, las muestras fueron entibiadas a 35°C en un baño termostático para reducir su viscosidad. Fueron homogeneizadas y posteriormente sometidas a una doble extracción líquido-líquido con 10 mL de cloroformo. Ambos extractos

acumulados fueron evaporados a seco en corriente de aire en baño a 45°C y el residuo resultante fue reconstituido en 500 µL de buffer fosfato (pH 8) previamente a la siembra por duplicado.

Abejas

Se ensayaron varios métodos de extracción y concentración tanto en fase líquida como en fase sólida, a partir de los trabajos publicados por Nakajima y col. (218) y Prats y col. (243), sin obtención de buenos resultados; por lo que finalmente se decidió trabajar directamente, con el homogenato de abejas sin efectuar extracción alguna.

Las muestras de abejas fueron descongeladas a temperatura ambiente y a cada tubo con 1 g de muestra se le agregó 1 mL de buffer fosfato 0,07 M pH 8,5. Las muestras se homogeneizaron con un aparato de dispersión Ultra-turrax por el lapso de 1,5 min y para evitar pérdidas de material en el equipo, el vástago del mismo se lavó con 0,5 mL del buffer. El procesado resultante, se sometió a agitación con vórtex durante 10 min y luego a sonicación por 5 min. Por último, se centrifugó a 5000 r.p.m durante 30 min y el sobrenadante resultante se trasvasó a un tubo limpio para ser analizado posteriormente.

Larvas

Se pesaron 0,5 g de muestra de larvas en tubos Eppendorf y se diluyeron con 0,25 mL de buffer fosfato 0,07 M pH 8,5. Las muestras fueron sometidas a ultrasonido durante 10 min, posteriormente a agitación en vórtex por otros 10 min y finalmente se centrifugaron a 5000 r.p.m. durante 30 min. El sobrenadante resultante se trasvasó a un tubo limpio y 200 µL se sembraron en las placa de cultivo con micropipeta automática (HT high tech lab, Polonia).

II.2.2.3.2. Método biológico para la determinación de concentraciones de antibióticos

La detección y cuantificación de tilosina en las diferentes matrices biológicas obtenidas, se efectuó por método microbiológico a partir de los procedimientos descriptos previamente por Grove & Randall (244), basados en la técnica de cilindro-placa y modificado por nosotros (245).

El mismo consiste en la determinación de los halos de inhibición provocados por concentraciones previamente estipuladas del antibiótico a ensayar, sobre un cultivo bacteriano estandarizado y sensible al mismo. De esta forma, se elabora una curva patrón y por interpolación de los diámetros de halo producidos por las muestras de concentración desconocida, se extrapolan los datos de concentración correspondientes.

Preparación del inóculo y del medio de cultivo

El microorganismo que se utilizó para la cuantificación de tilosina en las muestras biológicas, fue *Micrococcus luteus* ATCC 9341³. A partir del mismo se realizaron repiques en pico de flauta con medio de cultivo Müller-Hinton, los que se incubaron 48 h a 37°C.

Transcurrido este tiempo, a partir de esos picos de flauta se realizaron nuevos repiques de 24 h de incubación para la preparación del inóculo del día de la siembra. Cada repique se lavó con 1,5 mL de solución fisiológica estéril. La suspensión bacteriana obtenida fue diluida con solución fisiológica hasta alcanzar un 75% de transmisión a 670 nm de longitud de onda ($2-2,6 \times 10^7$ UFC/mL). A partir de esta suspensión, se tomó 1 mL para inocular el medio de cultivo, cuyo volumen fue de 120 mL por placa.

Preparación de las placas y siembra del inóculo en el medio de cultivo

Se pesaron 3,66 g de medio de cultivo para antibióticos N° 1 y se solubilizaron en 120 mL de agua destilada. Se agitó constantemente hasta que el medio estuvo completamente disuelto y luego fue calentado hasta ebullición y esterilizado en autoclave a 1 atmósfera de presión, a 120°C durante 20 min. Una vez retirado de la misma, fue colocado en el baño termostático a 49-50°C y a esta temperatura se le adicionó 1 mL de la suspensión de *Micrococcus luteus*. Se ajustó el pH a 8 con el agregado de 300 µL de hidróxido de potasio 3 M, para el análisis de muestras de miel. Mientras que para el análisis de muestras de abejas y larvas, el pH fue llevado a 9 por el agregado de 700 µL de hidróxido de potasio 3 M. Posteriormente se homogeneizó, sin agitar para evitar la formación de burbujas, y se vertió el contenido (medio de cultivo-inóculo) en una placa previamente esterilizada, termostatizada y perfectamente nivelada.

Por último y una vez solidificado el agar, se colocaron los cilindros de acero sobre los lugares seleccionados por el mapa guía, ejerciendo una ligera presión sobre los mismos para lograr una correcta coaptación entre estos y la superficie del medio.

Preparación de las soluciones patrones de tilosina

Se pesaron 10,87 mg de tilosina tartrato (92% potencia), que se disolvieron en 10 mL de metanol calidad HPLC para preparar una solución stock de 1 mg/mL. Esta solución fue estable por 2 meses a -20°C.

³ Provistas por el Servicio Antimicrobianos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr. C. G. Malbrán".

A partir de la solución stock, se prepararon diluciones patrones en buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 8 para el análisis de miel y en buffer fosfato 0,07 M pH 8,5 para el análisis de abejas y larvas.

Las soluciones patrones en matrices biológicas fueron preparadas diariamente utilizando muestras libres de antimicrobianos y fortificadas con 5 concentraciones conocidas de tilosina en buffer fosfato. La relación masa/volumen utilizada fue 1:2 en miel, 1:1,5 en abejas y 1:0,5 en larvas respectivamente (ver Anexo VI.2.2.).

El rango de concentraciones incluido en las rectas de calibración fue 0,0078-0,125 y 0,25-4 $\mu\text{g/g}$ de miel y 0,125-2 $\mu\text{g/g}$ de abejas o larvas.

Aplicación de las soluciones patrones o muestras de estudio al medio de cultivo

Alícuotas de 200 μL de diluciones patrón o muestras problema fueron sembradas con micropipeta por duplicado, siguiendo la planilla de distribución de las muestras en los cilindros. Las placas fueron incubadas en estufa a 35°C durante 18 h.

Lectura y análisis de datos

Cumplidas las 18 h de incubación, se leyeron con calibre Vernier los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y el valor final utilizado fue la media de las dos concentraciones obtenidas (Figura II.12).

A partir de los valores de las diluciones patrones se trazó una línea de regresión para cada placa de análisis con los diámetros de los halos y la concentración de tilosina que los produjo.

La actividad inhibitoria equivalente en las muestras problema fue calculada por interpolación de los diámetros de halo de inhibición en dicha recta y la extrapolación de los valores de concentración expresados en $\mu\text{g/g}$.

Figura II.12: Placa de cultivo inoculada con *Micrococcus luteus* ATCC 9341 para la determinación cuantitativa de tilosina en muestras biológicas

II.2.2.3.3. Validación del método microbiológico

Todos los procedimientos de preparación/extracción y cuantificación de tilosina en miel, abejas y larvas fueron validados previamente a la realización de los análisis de las muestras problema obtenidas de cada experimento.

Los siguientes parámetros: linealidad, especificidad, precisión, exactitud y límite de cuantificación fueron evaluados para el análisis de cada matriz, siguiendo las recomendaciones de la farmacopea argentina (246).

Linealidad

Se determinó la linealidad del método microbiológico, definiéndose como la capacidad de la técnica analítica de obtener resultados en diámetros de halo, proporcionales a la concentración del antimicrobiano presente en la muestra.

Las curvas de calibración estándar se construyeron midiendo los halos de inhibición obtenidos a partir de alícuotas de buffer fosfato y muestras blanco de cada matriz, enriquecidas

con tilosina y realizadas por cuadruplicado, en un rango de concentraciones entre 0,0078-0,125 µg/g y 0,25-4 µg/g para la técnica de miel y entre 0,125-2 µg/g para las técnicas de abejas y larvas.

Las rectas de calibración se realizaron en 4 días diferentes y fueron caracterizadas por su coeficiente de regresión, pendiente e intersección. La ecuación que representa a dichas rectas es la siguiente:

$$y = b + ax \quad \text{Ecuación II.2}$$

Donde y es la concentración del antimicrobiano, b es el punto de intersección con el eje de la ordenada, a es la pendiente de la recta y x es el diámetro del halo de inhibición.

Los estimadores de a y b fueron calculados de la siguiente manera:

$$a = \frac{\sum Y_i - b \sum X_i}{n} \quad \text{Ecuación II.3}$$

$$b = \frac{\sum X_i Y_i - (\sum X_i \sum Y_i) / n}{\sum X_i^2 - (\sum X_i)^2 / n} \quad \text{Ecuación II.4}$$

Donde X_i es la concentración estimada del antimicrobiano, Y_i es el diámetro del halo de inhibición y n es el número de ensayos.

El estimador del ajuste fue el coeficiente de correlación (r) que se calculó como:

$$r = \frac{n \sum (X_i Y_i) - (\sum X_i \sum Y_i)}{\sqrt{[n \sum X_i^2 - (\sum X_i)^2][n \sum Y_i^2 - (\sum Y_i)^2]}} \quad \text{Ecuación II.5}$$

Los valores de r para ser considerados aceptables debieron ser superiores a 0,95 en todas las placas.

Especificidad

Es la capacidad del método analítico para evaluar inequívocamente al analito en presencia de los componentes que pueden estar presentes en la muestra, tales como impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz, etc (246).

La especificidad se evaluó sembrando en cada placa y por cuadruplicado buffer, miel, abejas y larvas libres de residuos de antimicrobianos. El objetivo fue corroborar la ausencia de sustancias con actividad inhibitoria intrínseca que pudieran interferir con la actividad inhibitoria del antimicrobiano a ensayar.

Precisión

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea (246). Se describe por el coeficiente de variación, que se expresa como porcentaje y que no debe ser superior al 15%.

Se determinaron los coeficientes de variación interdía e intradía identificando así, la repetitividad (CV intradía) y la reproducibilidad (CV interdía). Para tal fin, cada concentración en buffer o matriz biológica, se ensayó por cuadruplicado en cada placa y dicho proceso se repitió durante cuatro días.

Exactitud

La exactitud de un método analítico es la proximidad entre el resultado obtenido y el valor real (246). La exactitud en la determinación de las concentraciones fue expresada como porcentaje de recuperación. Se obtuvo, a partir de comparar los diámetros de halo de inhibición obtenidos tras la extracción de tilosina de las diferentes matrices biológicas y los halos que correspondieron a las mismas concentraciones preparadas en buffer fosfato.

Para la validación de miel, se prepararon soluciones estándar procesando miel libre de antimicrobianos y fortificando el extracto evaporado final con tilosina. Estas muestras se confrontaron en las placas de cultivo con las muestras enriquecidas previamente al procedimiento de extracción con cloroformo.

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{C_c}{C_r} \times 100 \quad \text{Ecuación II.6}$$

Donde C_c es la concentración calculada, C_r es la concentración real.

Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LOQ) es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud en una muestra, bajo las condiciones experimentales establecidas (246).

El objetivo fue determinar la menor concentración donde la reproducibilidad de los análisis replicados no excedió un coeficiente de variación del 20%.

II.2.2.4. Análisis farmacocinético

El objetivo de la farmacocinética consiste en estudiar el curso que siguen en función del tiempo las concentraciones de los fármacos y sus metabolitos en los diversos fluidos, tejidos y excretas del organismo, y construir modelos idóneos que permitan interpretar tales datos (247).

La farmacocinética antimicrobiana obedece a las reglas generales de la farmacocinética. La mayoría de los agentes antimicrobianos son electrolitos orgánicos débiles (ya sea ácidos o bases) y su naturaleza química, así como las propiedades físico-químicas relacionadas, gobiernan ampliamente la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los mismos. Sin embargo, frente a un mismo fármaco y un mismo esquema terapéutico, existen diferencias en las respuestas que son atribuibles a la variabilidad farmacocinética. Dicha variabilidad incluye las diferencias de especie, la variabilidad individual y la influencia que ejercen los estados patológicos sobre los procesos que atraviesan los fármacos en el organismo (248).

II.2.2.4.1. Análisis farmacocinético no compartimental

El análisis no compartimental fue aplicado por primera vez en la resolución de problemas farmacocinéticos en el año 1978 por Yamaoka y col. (249). Este modelo está basado en la Teoría de los momentos estadísticos. Las teorías estadísticas de probabilidad y distribución se utilizan para describir y/o predecir la cinética del fármaco desde su administración hasta el momento de la medida. Al realizar el análisis farmacocinético, las curvas concentración en función del tiempo se tratan como si fueran curvas de distribución estadística.

El tratamiento de los datos experimentales permite estimar los parámetros farmacocinéticos sin necesidad de ajustarlos a un modelo compartimental determinado (248). A pesar de su nombre, el método asume que al menos un compartimento existe y parte del supuesto que la absorción y disposición del fármaco cumplen una farmacocinética de primer orden (lineal) (248, 250).

Los primeros tres momentos (cero al segundo) de la curva pueden definirse como:

- Área bajo la curva o *momento cero*.
- Tiempo medio de residencia o *primer momento*.
- Varianza del tiempo medio de residencia o *segundo momento*.

Estos momentos pueden ser calculados mediante integración numérica usando el método trapezoidal (251). Sólo el momento cero y el primer momento son usados en los análisis estadísticos, debido a que los momentos mayores aumentan la magnitud del error (250).

Área bajo la curva

El área bajo la curva concentración en función del tiempo (ABC) representa la cantidad total de fármaco presente en el tejido o fluido analizado.

El cálculo de la misma, aplicando el método de los trapezoides (251), considera una curva de disposición farmacológica compuesta por un número finito de concentraciones (C) correspondientes a los tiempos de muestreo (t). Si la $C_{(1)}$ corresponde al $t_{(1)}$ y la $C_{(2)}$ al $t_{(2)}$, ambas concentraciones pueden unirse por una línea recta descendente desde la $C_{(1)}$ hasta la $C_{(2)}$, quedando conformado un trapecio (Figura II. 13), cuyo cálculo del área de superficie se realiza por medio de la siguiente ecuación:

$$ABC_{t_1-t_2} = \frac{C_1 + C_2}{2} \times (t_2 - t_1) \quad \text{Ecuación II.7}$$

Figura II.13: Representación gráfica en una curva de eliminación exponencial del trapecio delimitado por dos concentraciones (C_1 y C_2) y sus respectivos tiempos de muestreo (t_1 y t_2)

La sumatoria de todas las ABC parciales da como resultado el ABC comprendida desde el $t_{(0)}$ hasta el tiempo de la última concentración medida $t_{(n)}$.

$$ABC_{0-t_n} = \sum_{i=1}^n \frac{C_{(i)} + C_{(i+1)}}{2} (t_{(i+1)} - t_{(i)}) \quad \text{Ecuación II.8}$$

Para el cálculo completo del ABC, es necesario calcular el área comprendida entre la última concentración medida (t_n) y el infinito (∞). La extrapolación, se realiza dividiendo la última concentración medida en el experimento (C_n) por el valor de la pendiente de la fase terminal (λ_z) (251):

$$ABC_{0-\infty} = ABC_{0-t_n} + \frac{C_n}{\lambda_z} \quad \text{Ecuación II.9}$$

El procedimiento de cálculo acarrea un error, ya que asume que la relación entre las concentraciones es una función lineal y no una exponencial. De lo anterior resulta que en los tramos descendentes de la curva las áreas de los trapecios estarán sobreestimadas, mientras que en los tramos ascendentes de la curva, estarán subestimadas.

Tiempo medio de residencia

Se define el primer momento estadístico, como el tiempo promedio que residen en el organismo las moléculas de fármaco o que, en promedio, tardan en abandonarlo. Este parámetro puede ser calculado de acuerdo a la expresión siguiente:

$$TMR = \frac{ABMC}{ABC} \quad \text{Ecuación II.10}$$

Donde ABC es el área debajo de la curva (momento cero) y ABMC es el área debajo del (primer) momento de la curva. El cálculo de este último parámetro para un intervalo de tiempo determinado se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$ABMC_{t_1-t_2} = \frac{C_1+C_2}{2} \times (t_2 - t_1) \quad \text{Ecuación II.11}$$

El ABMC total se calcula por medio de la sumatoria de los valores parciales dando como resultado el ABMC comprendida desde el $t_{(0)}$ hasta el tiempo de la última concentración medida $t_{(n)}$.

$$ABMC_{0-t_n} = \sum_{i=1}^n \frac{C_{(i)}+C_{(i+1)}}{2} (t_{(i+1)} - t_{(i)}) \quad \text{Ecuación II.12}$$

Del mismo modo, que para el caso de ABC, el cálculo completo del ABMC incluye el área comprendida entre la última concentración medida (t_n) y el infinito (∞). El cálculo de la fracción extrapolada se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$ABMC_{n-\infty} = \frac{t_n C_n}{\lambda_z} + \frac{C_n}{\lambda_z^2} \quad \text{Ecuación II.13}$$

En una curva de distribución normal, la media se encuentra en el 50% de la población; en cambio en una distribución acumulativa log-normal se encuentra en el 63,2%. De allí, que el tiempo medio de residencia represente el tiempo para que el 63,2% de la dosis administrada sea eliminada por todos los procesos.

Semivida de eliminación

En farmacocinética, la semivida de eliminación o $t_{1/2el}$ es definida como el tiempo necesario para que la cantidad de un medicamento presente en el organismo disminuya a la mitad de su valor, o sea el 50%.

Este concepto sólo es aplicable a los procesos de orden uno, en cuya ecuación diferencial se expresa la velocidad del proceso como la variación de masa sobre una cantidad de tiempo infinitesimal cuyo valor tiende a cero:

$$\frac{dC}{dt} = -KC \quad \text{Ecuación II.14}$$

Sin embargo, no presupone inconveniente alguno, ya que los valores correspondientes a la semivida media de la mayoría de los fármacos que se utilizan como agentes terapéuticos en el hombre y en los animales, son independientes de la dosis administrada (247).

Por lo tanto, podemos deducir las ecuaciones para el cálculo de $t_{1/2el}$, considerando que $C_{(t)}$ es igual a la mitad de la cantidad inicial de $C_{(0)}$ (250):

$$t_{1/2el} = (\ln C_{(0)} - \frac{\ln C_{(0)}}{2}) / \beta \quad \text{Ecuación II.15}$$

$$t_{1/2el} = \frac{\ln 2}{\beta} \quad \text{Ecuación II.16}$$

$$t_{1/2el} = \frac{0,693}{\beta} \quad \text{Ecuación II.17}$$

Donde β es la constante de la fase de eliminación total; siendo este parámetro igual al valor negativo de la pendiente de la fase de eliminación lineal del trazado, obtenido al relacionar el $\ln$ de la concentración con el tiempo, luego de una administración intravenosa. En el análisis no compartimental, se determina el parámetro análogo, λ_z que se obtiene de la pendiente de la fase

terminal lineal del trazado semilogarítmico de la concentración del fármaco en plasma en función del tiempo, tras la administración por una vía distinta de la intravenosa (247).

Desde el punto de vista biológico, la semivida es un parámetro que permite estimar el momento en el que un medicamento ha sido eliminado casi en su totalidad. Se puede considerar que el 99% de la cantidad administrada de un medicamento, ha sido eliminada luego de haber transcurrido un período equivalente a $10 t_{1/2el}$ desde su administración (250).

A partir de la determinación de las concentraciones en cada grupo de colmenas tratadas, se realizaron las curvas de disposición de tilosina en función del tiempo y se realizó el análisis farmacocinético utilizando el programa WinNonlin Professional 5.2 (Scientific consulting Inc., Cary, N.C.). Los parámetros determinados incluyeron:

1. Concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$)
2. Tiempo al que se produce la concentración máxima ($T_{m\acute{a}x}$)
3. Semivida de eliminación ($T_{1/2\lambda}$)
4. Constante de eliminación (λ)
5. Área bajo la curva concentración en función del tiempo desde el tiempo 0 al tiempo t (ABC_{0-t})
6. Área bajo la curva concentración en función del tiempo extrapolada al infinito ($ABC_{0-\infty}$)
7. Tiempo medio de residencia desde el tiempo 0 al tiempo t (TMR_{0-t})
8. Tiempo medio de residencia extrapolado a infinito ($TMR_{0-\infty}$)

Las gráficas de las curvas concentración de tilosina para cada matriz-tiempo y el cálculo de los parámetros cinéticos fueron realizadas para cada colmena en forma individual y luego se procedió al cálculo de la media y del desvío estándar de las 6 colmenas que conformaron cada uno de los lotes del ensayo realizado.

II.2.2.5. Análisis estadístico

Para la realización del análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa Statgraphic Centurion XV versión 15.2.05 (StatPoint Inc., 1982-2007). Los valores de las variables farmacocinéticas hallados en cada una de las experiencias realizadas se sometieron a un estudio descriptivo y se expresaron como media aritmética, corregida por una medida de dispersión (desviación estándar-DE-). Sobre la base de estos resultados crudos o transformados se aplicó el análisis paramétrico de la Varianza (ANOVA) y contraste de rango múltiple. De no ser posible se

aplicó el análisis no paramétrico de Kruskal Wallis. El límite de significancia fue establecido en un valor $\alpha \leq 0,05$.

II.3. Estudio de estabilidad de tilosina en miel

La finalidad de este ensayo consistió en determinar el comportamiento de tilosina dentro de la compleja matriz que constituye la miel, sometiéndola a tres temperaturas diferentes de almacenamiento: temperatura del interior de la colmena (35°C), temperatura ambiente (20°C) y temperatura de refrigeración (4°C).

Debido a la importancia que presenta el nivel de residuos hallados en miel luego de la aplicación de un zoterápico, el ensayo se realizó al cabo del transcurso de aproximadamente un año (357 días).

II.3.1. Materiales

El fármaco, productos biológicos, reactivos así como el material descartable, de laboratorio, instrumental y equipamiento informático utilizado en este estudio, fue el mismo que el descrito en el apartado II.2.1 del estudio farmacocinético.

II.3.2. Método

II.3.2.1. Unidades y diseño experimental

El estudio de estabilidad se llevó a cabo con 9 unidades experimentales de 100 g de miel libre de antimicrobianos, en envases de polipropileno de 150 mL. De la totalidad, tres de las muestras fueron fortificadas con tilosina para obtener una concentración final de 2 µg/g, otras tres para alcanzar 1 µg/g de miel, y por último se dejaron tres envases sin fortificar como controles negativos. Las mismas, se sometieron a agitación con un aparato de dispersión Ultraturrax durante 5 min para lograr homogeneidad.

Posteriormente, alícuotas de 2 g de miel de cada envase se analizaron por método microbiológico, para determinar la concentración inicial al tiempo cero. A continuación, se separaron en tres lotes de tres muestras cada uno que se almacenaron protegidas de la luz a 35°C, 20°C y 4°C. El análisis para la valoración del antimicrobiano se efectuó cada 21 días hasta el día 357.

II.3.2.2. Procedimiento analítico

La preparación de las muestras, la determinación de las concentraciones por método microbiológico y la validación del método para un rango de concentraciones entre 0,25-4 µg/g de miel fueron realizadas según los procedimientos descriptos en el apartado II.2.2.3.

II.3.2.3. Análisis matemático de los datos

II.3.2.3.1. Cinética de degradación de tilosina en miel

La ley de la velocidad expresa la relación de la velocidad de una reacción química con la constante de velocidad y la concentración de los reactivos, elevados a alguna potencia (252).

Para la reacción general:

La ley de la velocidad tiene la forma:

$$velocidad = K[A]^x [B]^y \dots \quad \text{Ecuación II.18}$$

Donde los exponentes X e Y , especifican las relaciones entre las concentraciones de los reactivos y la velocidad de la reacción. Al sumarlos, se obtiene el orden de la reacción global, que se define como la suma de los exponentes a los que se elevan todas las concentraciones de reactivos que aparecen en la ley de velocidad.

A su vez K , es una constante de proporcionalidad entre la velocidad de la reacción y la concentración de los reactivos, denominada constante de velocidad.

Las leyes de la velocidad permiten determinar las concentraciones de los reactivos en cualquier momento durante el curso de una reacción.

Reacciones de orden cero

Una reacción de orden cero es una reacción cuya velocidad es una constante, independiente de la concentración de las sustancias que reaccionan (252, 253).

En una reacción de orden cero del tipo:

La ley de la velocidad, está dada por:

$$velocidad = K [A]^0 \quad \text{Ecuación II.19}$$

Mediante el cálculo se puede demostrar que:

$$[A]_t = -Kt + [A]_0 \quad \text{Ecuación II.20}$$

Esta expresión tiene la forma de una ecuación lineal y la gráfica de $[A]_t$ respecto del tiempo, compone una recta con una pendiente igual a $-K$ y una intersección igual a $[A]_0$. Por lo tanto, se puede calcular la constante de la velocidad con base en la pendiente de esta gráfica.

Figura II.14: Gráfica de $[A]_t$ con respecto al tiempo para una reacción de orden cero

Reacciones de primer orden

Una reacción de primer orden es una reacción cuya velocidad depende de la concentración de reactivos elevadas a la primera potencia (252).

En una reacción de primer orden del tipo:

La velocidad es:

$$velocidad = -\frac{d[A]}{dt} \quad \text{Ecuación II.21}$$

A partir de la ley de la velocidad, también se sabe que:

$$velocidad = K [A] \quad \text{Ecuación II.22}$$

Por lo tanto, al combinar las dos primeras ecuaciones para la velocidad obtenemos:

$$-\frac{d[A]}{dt} = K [A] \quad \text{Ecuación II.23}$$

Una forma de análisis de la Ecuación II.23, consiste en expresar a $[A]$ como una función del tiempo, separando las variables e integrando entre $t=0$ y $t=t$:

$$\int_{[A]_0}^{[A]_t} \frac{d[A]}{[A]} = -K \int_0^t dt \quad \text{Ecuación II.24}$$

$$\ln[A]_t = -Kt + \ln[A]_0$$

Donde $\ln$ es el logaritmo natural, y $[A]_0$ y $[A]_t$ son las concentraciones de A a los tiempos $t=0$ y $t=t$, respectivamente.

Para una reacción de primer orden, si se elabora una gráfica de $\ln [A]_t$ respecto del tiempo, se obtiene una recta con una pendiente igual a $-K$ y una intersección igual a $\ln [A]_0$ (Figura II.15).

Figura II.15: Gráfico logaritmo natural de la concentración vs. tiempo para una reacción de primer orden

Reacciones de segundo orden

Una reacción de segundo orden, es aquella cuya velocidad depende de la concentración de uno de los reactivos, elevada a la segunda potencia, o de la concentración de dos reactivos diferentes, cada uno elevado a la primera potencia (252).

En una reacción de segundo orden del tipo:

La velocidad se expresa como la Ecuación II.21 y a partir de la ley de velocidad también sabemos que la misma es igual:

$$velocidad = K [A]^2 \quad \text{Ecuación II.25}$$

Por consiguiente, al combinar estas dos ecuaciones para la velocidad se obtiene:

$$-\frac{d[A]}{dt} = K[A]^2 \quad \text{Ecuación II.26}$$

Integrando entre $t=0$ y $t=t$, se establece:

$$\int_{[A]_0}^{[A]_t} \frac{d[A]}{[A]^2} = -K \int_0^t dt \quad \text{Ecuación II.27}$$

$$\frac{1}{[A]_t} = \frac{1}{[A]_0} + Kt$$

Resulta aparente a partir de la ecuación II.27 que el perfil concentración-tiempo resulta lineal. Una gráfica de $1/[A]_t$, en relación con t forma una recta con una pendiente igual a K y la intersección resulta $1/[A]_0$, como puede observarse en la Figura II.16.

Figura II.16: Gráfica de la inversa de la concentración vs. tiempo para una reacción de segundo orden

II.3.2.3.2. Efecto de la temperatura: Modelo de Arrhenius

En base a los resultados obtenidos, se trató de describir la dependencia de la constante de velocidad de la reacción química con respecto de la temperatura, mediante la siguiente ecuación conocida como la *ecuación de Arrhenius*:

$$K = Ae^{-E_a/RT} \quad \text{Ecuación II.28}$$

Donde E_a es la energía de activación de la reacción (en KJ/mol), R es la constante de los gases (8,314 J/K.mol), T es la temperatura absoluta y e es la base de la escala de logaritmos naturales. La cantidad A representa la frecuencia de colisiones y se puede tratar como una constante para un sistema de reacción determinado en un amplio intervalo de temperatura.

La ecuación puede expresarse también, aplicando el logaritmo natural en ambos lados:

$$\ln K = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad \text{Ecuación II.29}$$

En una gráfica de $\ln K$ respecto de $1/T$, forma una línea recta, cuya pendiente es igual a $-E_a/RT$ y cuya intersección con la ordenada es $\ln A$, como se observa en la figura II.17.

Figura II.17: Gráfica del logaritmo natural de K vs. $1/T$

II.3.2.3.3. Determinación de la semivida de la reacción

Otra medición de la velocidad de una reacción, que se relaciona con la concentración y el tiempo, es la semivida ($t_{1/2}$); la cual representa el tiempo requerido para que la concentración de uno de los reactivos disminuya a la mitad de su concentración inicial (252).

Cuando $t = t_{1/2}$, $[A]_t = [A]_0/2$, por lo tanto su valor puede fácilmente calcularse para cada orden de reacción, de la siguiente manera:

Reacciones de orden cero:

$$t_{1/2} = \frac{[A]_0}{2K} \quad \text{Ecuación II.30}$$

Reacciones de orden uno:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K} \quad \text{Ecuación II.31}$$

Reacciones de orden dos:

$$t_{1/2} = \frac{1}{K[A]_0} \quad \text{Ecuación II.32}$$

III. RESULTADOS

III.RESULTADOS

III.1. Estudio bacteriológico

III.1.1. Aislamiento, identificación y selección de cepas de *Paenibacillus larvae*

A partir de las muestras larvales de las colmenas seleccionadas, se aislaron en medio MYPGP con el agregado de ácido nalidíxico, 11 cepas bacterianas microaerófilas, a las que se caracterizó mediante la coloración de Gram (Figura III.1). En los extendidos realizados se observaron bacilos delgados, Gram positivos, esporulados, con tendencia a formar cadenas de longitud variable y con los extremos ligeramente redondeados (69).

Figura III.1: Micrografía de *Paenibacillus larvae* aislado a partir de restos larvales de colmenas experimentales con tinción de Gram

En los frotis efectuados directamente a partir de restos larvales, teñidos con fucsina fenicada, se pudieron caracterizar las esporas bacterianas como pequeños cuerpos de forma elipsoidal en posición central a terminal, con paredes de color rojo púrpura y el centro claro. Estas observaciones resultaron concordantes con la descripción de Shimanuki y col (69) para la especie *P. larvae*. No se pudo demostrar a través de la utilización de la técnica de *hanging drop* el movimiento *browniano* de las esporas en la totalidad de las muestras analizadas.

Para completar su identificación se realizaron pruebas bioquímicas resultando catalasa y Voges Proskauer negativas, hidrólisis de caseína, licuefacción de gelatina y reducción de nitratos a nitritos positivas e hidrólisis de almidón negativas (Figuras III.2 y III.3). Ninguna de las cepas produjo indol o utilizó el citrato como única fuente de carbono (Figuras III.4 y III.5). El número de repiques que soportaron en caldo nutritivo fue variable sin superar en ninguno de los casos los 10 repiques.

Figura III.2: Reducción de nitrato a nitrito

Figura III.3: Hidrólisis de almidón

Figura III.4: Utilización de citrato

Figura III.5: Voges-Proskauer

Figura III.2, Figura III.3, Figura III.4, Figura III.5: Pruebas bioquímicas para caracterización de aislamientos procedentes de restos larvales de colmenas sospechosas de Loque Americana

Los aislamientos fueron identificados como *Paenibacillus larvae*, confirmándose el diagnóstico clínico de Loque Americana en los 6 apiarios.

III.1.2. Selección del antimicrobiano a través de pruebas cuali-cuantitativas de susceptibilidad bacteriana

III.1.2.1. Prueba cualitativa de susceptibilidad por el método de difusión de discos

Las cepas utilizadas como control de calidad, *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923, mostraron en el medio MYPGP halos de inhibición mayores a los observados en medio Müller-Hinton; sin embargo estuvieron dentro de los rangos de aceptación establecidos para los aislamientos provenientes de animales descriptos por la CLSI (235). Estos valores junto a los diámetros de halo de inhibición de *P. larvae* ATCC 9545, utilizada como estándar de control de las cepas de campo, se presentan en la Tablas VI.3 del Anexo.

Las 11 cepas aisladas, mostraron alta susceptibilidad a los antibióticos del grupo de los β lactámicos, macrólidos, florfenicol y rifampicina. Los aminoglucósidos y trimetoprima/sulfadimetoxazol resultaron inactivos a las concentraciones ensayadas; sin embargo cabe destacar la sensibilidad de todos los aislamientos a las tetraciclinas, como puede observarse en la Figura III.6 y la Tabla VI.4 del Anexo.

Figura III.6: Susceptibilidad *in vitro* de 11 aislamientos de *Paenibacillus larvae* por el método de difusión de discos (media $\pm$ DE; n=11)

III.1.2.2. Prueba cuantitativa de susceptibilidad por el método de dilución en agar

Para la totalidad de los aislamientos el valor de CIM₅₀ de tilosina fue 0,03125 μ g/mL y de CIM₉₀ 0,0625 μ g/mL. La CIM para la cepa de referencia *P. larvae* ATCC 9545 fue 0,0156 μ g/mL, para *S. aureus* ATCC 29213 fue 1 μ g/mL y para *E. coli* ATCC 25922 fue >32 μ g/mL como se pueden ver representadas en la Figura III.7. El porcentaje de cepas de campo inhibidas frente a cada concentración de tilosina ensayada se presenta en la Figura VI.1 del Anexo.

Aislamientos de diferentes apiarios de la provincia de Buenos Aires. BS1: Verónica; BS2: La Plata; BS3: Gonnet; BS4: Villa Maza; BS5: Pehuajó; C13-18: colmenas experimentales del lote C.

Figura III.7: Valores de CIM para tilosina de 11 aislamientos de *Paenibacillus larvae* y cepas de referencia determinado por el método de dilución en agar

III.2. Estudio farmacocinético

III.2.1. Procedimiento analítico

III.2.1.1. Validación del método microbiológico

III.2.1.1.1. Validación de la técnica de cuantificación en miel

La relación entre la concentración de tilosina solubilizada en el extracto de miel o en miel y el diámetro de halo obtenido resultó lineal para las concentraciones ensayadas (0,0078-0,125 y 0,125-4 µg/g).

Las curvas de calibración fueron caracterizadas por su pendiente, intersección y coeficiente de correlación (Tablas III.1 y Figuras III.8, III.9). El coeficiente de correlación promedio (n=4) obtenido para soluciones patrones conteniendo tilosina en miel en concentraciones entre 0,0078-0,125 µg/g y entre 0,125-4 µg/g fue de $0,9765 \pm 0,01$ y $0,9659 \pm 0,005$ respectivamente. Estas soluciones patrones fueron las utilizadas para determinar las concentraciones del analito en las muestras problema.

Los resultados del análisis de regresión de los datos se encuentran en las Tablas VI.5, VI.6, VI.7, VI.8, VI.9, VI.10, VI.11 y VI.12 del Anexo.

Tabla III.1: Valores de pendiente, intersección y coeficiente de correlación ($\bar{x} \pm DE$) en rectas de calibración de tilosina en extracto de miel y miel para un rango de concentraciones de 0,0078 a 0,125 µg/g y 0,25 a 4 µg/g

	Concentraciones 0,078-0,125 µg/g		Concentraciones 0,25-4 µg/g	
	Estándar en Extracto	Estándar en Matriz	Estándar en Extracto	Estándar en Matriz
Pendiente	0,1058±0,0056	0,1337±0,0081	3,7137±0,2891	3,3407±0,1797
Intersección	-0,0816±0,0060	-0,1052±0,084	-7,2470±0,6351	-5,7915±0,4370
Coeficiente de correlación	0,9496±0,0104	0,9765±0,0099	0,9419±0,0192	0,9659±0,0047

Figura III.8: Representación de las rectas de calibración mediante regresión lineal de los diámetros de halo de inhibición de tilosina en extracto de miel y en miel para el rango de concentraciones comprendidas entre 0,0078 y 0,125 $\mu\text{g/g}$

Figura III.9: Representación de las rectas de calibración mediante regresión lineal de los diámetros de halo de inhibición de tilosina en extracto de miel y en miel para el rango de concentraciones comprendidas entre 0,25 y 4 $\mu\text{g/g}$

La especificidad fue evaluada procesando y analizando miel libre de antimicrobianos sin observar halo de inhibición alguno en las placas de cultivo sembradas.

El porcentaje de recuperación promedio fue de 95,39% con un coeficiente de variación interdía de 4,91% para la escala de diluciones de menor rango, y de 92,31% con un coeficiente de variación interdía de 2,07% para la escala de mayor rango. En la Tablas III.2, III.3, III.4 y III.5 se presentan los resultados del análisis de precisión y exactitud correspondiente a los 4 días de análisis para cada serie de diluciones.

El límite de cuantificación de tilosina en miel fue de 0,0156 µg/g.

Tabla III.2: Resultados del análisis de precisión de miel fortificada con tilosina para el rango de concentraciones entre 0,0078 y 0,125 µg/g en 4 días diferentes

Concentración	Coeficiente de variación									
	Intra-día 1		Intra-día 2		Intra-día 3		Intra-día 4		Inter-día	
	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV
0,0078	0,80	0,00	0,80	0,00	0,80	0,00	0,80	0,00	0,80	0,00
0,0156	0,93	3,12	1,08	4,65	0,91	2,74	0,90	0,00	0,95	8,59
0,0312	1,11	2,25	1,13	8,51	0,96	1,57	0,98	2,96	1,04	8,49
0,0625	1,28	2,26	1,31	1,90	1,31	5,71	1,20	6,80	1,28	4,16
0,1250	1,65	3,50	1,75	3,30	1,70	6,79	1,63	5,89	1,68	3,30

Tabla III.3: Resultados del análisis de precisión de miel fortificada con tilosina para el rango de concentraciones entre 0,25 y 4 µg/g en 4 días diferentes

Concentración	Coeficiente de variación									
	intra-día 1		intra-día 2		intra-día 3		intra-día 4		inter-día	
	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV
0,25	1,73	1,00	1,70	4,00	1,74	1,00	1,69	1,76	1,72	1,32
0,50	2,02	1,98	1,87	5,84	1,88	5,11	1,85	2,21	1,90	4,13
1,0	2,21	0,68	2,16	3,93	2,14	1,17	2,08	4,61	2,15	2,58
2,0	2,41	3,97	2,38	1,22	2,38	0,99	2,40	4,17	2,39	0,59
4,0	2,85	2,03	2,89	2,96	2,78	3,45	2,81	2,24	2,83	1,71

Tabla III.4: Resultados del análisis de exactitud de miel fortificada con tilosina para el rango de concentraciones entre 0,0078 y 0,125 µg/g para 4 días diferentes

Concentración agregada (µg/g)	Recuperación											
	Intra-día 1		Intra-día 2		Intra-día 3		Intra-día 4		Inter-día			
	$\bar{x}$ (µg/g)	% Recup.	$\bar{x}$ (µg/g)	% Recup.	$\bar{x}$ (µg/g)	% Recup.	$\bar{x}$ (µg/g)	% Recup.	$\bar{x}$ (µg/g)	% Recup.	DE	CV
0,0078	0,0078	100,00	0,0078	100,00	0,0078	100,00	0,0078	100,00	0,0078	100,00	0,00	0,00
0,0156	0,0163	104,23	0,0190	121,70	0,0161	103,40	0,0163	104,35	0,0169	108,42	8,86	8,18
0,0312	0,0302	96,74	0,0302	96,77	0,0272	87,05	0,0259	82,98	0,0284	90,88	6,98	7,68
0,0625	0,0540	86,44	0,0547	87,50	0,0513	82,03	0,0492	78,69	0,0523	83,67	4,08	4,87
0,1250	0,1162	92,96	0,1232	98,59	0,1181	94,44	0,1125	89,99	0,1175	94,00	3,58	3,81
MEDIA		96,07		100,91		93,38		91,20				
DE		6,80		12,60		8,86		10,91				
CV		7,08		12,49		9,49		11,96				

Tabla III.5: Resultados del análisis de exactitud de miel fortificada con tilosina para el rango de concentraciones entre 0,25 y 4 µg/g para 4 días diferentes

Concentración agregada (µg/g)	Recuperación											
	Intra-día 1		Intra-día 2		Intra-día 3		Intra-día 4		Inter-día			
	$\bar{x}$ (µg/g)	% Recup.	$\bar{x}$ (µg/g)	% Recup.	$\bar{x}$ (µg/g)	% Recup.	$\bar{x}$ (µg/g)	% Recup.	$\bar{x}$ (µg/g)	% Recup.	DE	CV
0,25	0,2221	88,85	0,2267	90,67	0,2228	89,10	0,2212	88,50	0,2232	89,28	0,00	0,00
0,50	0,4698	93,95	0,4410	88,19	0,4464	89,29	0,4134	82,68	0,4426	88,53	4,63	5,23
1,0	0,9598	95,98	0,9058	90,58	0,9243	92,43	0,9121	91,21	0,9255	92,55	2,41	2,61
2,0	1,9144	95,72	1,8095	90,48	1,9060	95,30	1,8641	93,20	1,8735	93,68	2,40	2,56
4,0	3,8974	97,44	3,9319	98,30	3,8609	96,52	3,9130	97,83	3,9008	97,52	0,75	0,77
MEDIA		94,39		91,64		92,53		90,68				
DE		3,34		3,86		3,39		5,62				
CV		3,53		4,21		3,66		6,20				

III.2.1.1.2. Validación de la técnica de cuantificación en abejas

Se obtuvieron curvas de calibración lineal en buffer y abejas fortificadas para el rango de concentraciones entre 0,125 y 2 µg/g de tilosina. Las curvas fueron caracterizadas por su pendiente, intersección y coeficiente de correlación (Tabla III.6 y Figura III.10). El coeficiente de correlación promedio (n=4) obtenido para las soluciones estándar en abejas conteniendo tilosina fue de $0,9871 \pm 0,01$. Estas soluciones patrones fueron las utilizadas para determinar las concentraciones del analito en las muestras problema.

Los resultados del análisis de regresión de los datos se encuentran en las Tablas VI.13, VI.14, VI.15 y VI.16 del Anexo.

Tabla III.6: Valores de pendiente, intersección y coeficiente de correlación ($\bar{x} \pm DE$) en rectas de calibración de tilosina en buffer y abejas para un rango de concentraciones entre 0,125 y 2 $\mu\text{g/g}$

	Estándar en Buffer	Estándar en Matriz
Pendiente	1,6515 $\pm$ 0,0990	1,7640 $\pm$ 0,0770
Intersección	2,3525 $\pm$ 0,1072	1,3118 $\pm$ 0,0394
Coeficiente de correlación	0,9366 $\pm$ 0,0259	0,9871 $\pm$ 0,0072

Figura III.10: Representación de las rectas de calibración mediante regresión lineal de los diámetros de halo de inhibición de tilosina en buffer fosfato 0,007 M pH 8,5 y en abejas para el rango de concentraciones comprendidas entre 0,125 y 2 $\mu\text{g/g}$

La especificidad fue evaluada procesando y analizando abejas libres de antimicrobianos sin observar halo de inhibición alguno en las placas de cultivo ensayadas.

El porcentaje de recuperación promedio fue de 92,02% con un coeficiente de variación interdía de 3,18%. En la Tablas III.7 y III.8 se presentan los resultados del análisis de precisión y exactitud correspondiente a los 4 días de análisis.

El límite de cuantificación de tilosina en abejas fue de 0,125 $\mu\text{g/g}$.

Tabla III.7: Resultado del análisis de precisión de abejas fortificadas con tilosina para el rango de concentraciones entre 0,125 y 2 µg/g en 4 días diferentes

Concentración	Coeficiente de variación									
	Intra-día 1		Intra-día 2		Intra-día 3		Intra-día 4		Inter-día	
	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV
0,125	0,80	0,00	0,80	0,00	0,80	0,00	0,80	0,00	0,80	0,00
0,25	0,84	1,79	0,86	2,90	0,82	2,51	0,88	4,47	0,85	3,12
0,50	1,14	1,53	0,98	5,13	1,13	4,44	1,08	2,69	1,08	6,79
1,00	1,38	3,64	1,32	4,54	1,34	3,58	1,41	1,77	1,36	3,15
2,00	1,88	2,67	1,78	1,63	1,80	6,42	1,88	2,67	1,83	2,81

Tabla III.8: Resultados del análisis de exactitud de abejas fortificadas con tilosina para el rango de concentraciones entre 0,125 y 2 µg/g en 4 días diferentes

Concentración agregada (µg/g)	Recuperación											
	Intra-día 1		Intra-día 2		Intra-día 3		Intra-día 4		Inter-día			
	$\bar{x}$ (µg/g)	% Recup.	$\bar{x}$ (µg/g)	% Recup.	$\bar{x}$ (µg/g)	% Recup.	$\bar{x}$ (µg/g)	% Recup.	$\bar{x}$ (µg/g)	% Recup.	DE	CV
0,125	0,1121	89,72	0,1029	82,33	0,1126	90,06	0,1034	82,76	0,1078	86,22	0,01	0,01
0,25	0,2166	86,64	0,1848	73,93	0,2036	81,44	0,1985	79,39	0,2009	80,35	5,26	6,54
0,50	0,4899	97,99	0,3611	72,22	0,5037	100,75	0,4031	80,63	0,4395	87,89	13,73	15,62
1,00	0,9717	97,17	0,8394	83,94	0,9835	98,35	0,9334	93,34	0,9320	93,20	6,53	7,01
2,00	2,3810	119,05	2,0882	104,41	2,2979	114,89	2,2277	111,39	2,2487	112,43	6,20	5,51
MEDIA		98,11		83,37		97,10		89,50				
DE		12,66		12,82		12,51		13,42				
CV		12,91		15,38		12,89		14,99				

III.2.1.1.3. Validación de la técnica de cuantificación en larvas

La relación entre la concentración de tilosina solubilizada en buffer o en larvas y el diámetro de halo obtenido resultó lineal para las concentraciones ensayadas (0,125-2 µg/g).

Las curvas de calibración fueron caracterizadas por su pendiente, intersección y coeficiente de correlación (Tabla III.9 y Figura III.11). El coeficiente de correlación promedio (n=4) obtenido para soluciones patrones conteniendo tilosina en larvas en concentraciones entre 0,125 y 2 µg/g, fue de $0,9657 \pm 0,01$ y fueron estas soluciones patrones las utilizadas para determinar las concentraciones del analito en las muestras problema.

Los resultados del análisis de regresión de los datos se encuentran en las Tablas VI.17, VI.18, VI.19 y VI.20 del Anexo.

Tabla III.9: Valores de pendiente, intersección y coeficiente de correlación ($\bar{x} \pm DE$) en rectas de calibración de tilosina en buffer y larvas para un rango de concentraciones entre 0,125 y 2 $\mu\text{g/g}$

	Estándar en Buffer	Estándar en Matriz
Pendiente	1,6042 $\pm$ 0,1922	1,2536 $\pm$ 0,0741
Intersección	2,0909 $\pm$ 0,2564	1,0348 $\pm$ 0,0433
Coeficiente de correlación	0,9542 $\pm$ 0,0177	0,9657 $\pm$ 0,0084

Figura III.11: Representación de las rectas de calibración mediante regresión lineal de los diámetros de halo de inhibición de tilosina en buffer fosfato 0,007 M pH 8,5 y en larvas para el rango de concentraciones comprendidas entre 0,125 y 2 $\mu\text{g/g}$

La especificidad fue evaluada procesando y analizando larvas libres de antimicrobianos sin observar halo de inhibición alguno en las placas de cultivo analizadas.

El porcentaje de recuperación promedio fue de 97,97% con un coeficiente de variación interdía de 3,52%. En la Tablas III.10 y III.11 se presentan los resultados del análisis de precisión y exactitud correspondiente a los 4 días de análisis.

El límite de cuantificación de tilosina en larvas fue de 0,125 $\mu\text{g/g}$.

Tabla III.10: Resultado del análisis de precisión de larvas fortificadas con tilosina para el rango de concentraciones entre 0,125 y 2 µg/g en 4 días diferentes

Concentración	Coeficiente de variación									
	Intra-día 1		Intra-día 2		Intra-día 3		Intra-día 4		Inter-día	
	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV	$\bar{x}$	CV
0,125	0,80	0,00	0,80	0,00	0,80	0,00	0,81	3,00	0,80	0,78
0,25	1,08	13,95	0,94	8,00	1,05	5,50	1,08	8,06	1,03	6,35
0,50	1,39	3,45	1,35	4,28	1,36	3,51	1,38	2,10	1,37	1,18
1,00	1,80	4,54	1,64	2,92	1,75	3,30	1,83	5,25	1,75	4,74
2,00	2,33	6,45	2,12	4,37	2,35	3,01	2,29	3,28	2,27	4,56

Tabla III.11: Resultados del análisis de exactitud de larvas fortificadas con tilosina para el rango de concentraciones entre 0,125 y 2 µg/g en 4 días diferentes

Concentración agregada (µg/g)	Recuperación											
	Intra-día 1		Intra-día 2		Intra-día 3		Intra-día 4		Inter-día			
	$\bar{x}$ (µg/g)	% Recup.	$\bar{x}$ (µg/g)	% Recup.	$\bar{x}$ (µg/g)	% Recup.	$\bar{x}$ (µg/g)	% Recup.	$\bar{x}$ (µg/g)	% Recup.	DE	CV
0,125	0,0971	77,67	0,0901	72,07	0,0962	76,92	0,1036	82,91	0,0967	77,39	0,01	0,01
0,25	0,2278	91,10	0,2003	80,13	0,2169	86,78	0,2337	93,48	0,2197	87,87	5,86	6,67
0,50	0,4752	95,03	0,5075	101,50	0,5240	104,81	0,5169	103,38	0,5059	101,18	4,32	4,27
1,00	1,0169	101,69	1,0108	101,08	0,9943	99,43	1,1851	118,51	1,0518	105,18	8,94	8,50
2,00	2,3134	115,67	2,2083	110,42	2,4103	120,51	2,5276	126,38	2,3649	118,25	6,81	5,76
MEDIA		96,23		93,04		97,69		104,93				
DE		13,96		16,16		16,77		17,77				
CV		14,51		17,37		17,17		16,93				

III.2.2. Análisis farmacocinético

III.2.2.1 Ensayo otoñal en colmenas sanas con diferentes niveles poblacionales (lotes A y B)

Durante el transcurso del ensayo, el consumo de la formulación por parte de las abejas adultas fue completo, entre los períodos de 7 días que separaban cada una de las tres administraciones realizadas a cada lote de colmenas.

Al final del ensayo se evaluó la condición clínica de las colmenas determinándose la ausencia de signos clínicos adversos, efectos secundarios o disminución del número de individuos como consecuencia de la aplicación del tratamiento.

Curvas de concentración en abejas y miel

Tras la administración por espolvoreo de los 600 mg de tilosina (divididos en 3 dosis de 200 mg cada 7 días) se obtuvieron las concentraciones en abejas y miel que se presentan en las Tablas VI.21, VI.22, VI.23 y VI.24 del Anexo. Las representaciones gráficas de los valores medios $\pm$ DE de las mismas se observan en las Figuras III.12, III.13 y III.14. Las representaciones individuales se observan en la Figura VI.2 y VI.3 del Anexo.

Figura III.12: Perfil de concentraciones de tilosina (media $\pm$ DE; n=6) en miel obtenida de colonias sanas con alto y bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg por espolvoreo en la cámara de cría en otoño

Figura III.13: Perfil de concentraciones de tilosina (media $\pm$ DE; n=6) en abejas pertenecientes a colonias sanas con alto y bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg por espolvoreo en la cámara de cría en otoño

Figura III.14: Perfil de concentraciones de tilosina en abejas y miel luego de la administración de una formulación de tartrato de tilosina, a razón de 600 mg/colmena aplicados en la cámara de cría de colonias de abejas sanas con alto y bajo nivel poblacional en otoño (media $\pm$ DE; n=6)

Análisis farmacocinético no compartimental

Los resultados del cálculo de los parámetros farmacocinéticos tras análisis no compartimental se describen en las Tablas III.12 y III.13. Los parámetros individuales obtenidos para cada colmena se presentan en las Tablas VI.34, VI.35, VI.36 y VI.37 del Anexo.

Tabla III.12: Parámetros farmacocinéticos en miel luego de la administración por espolvoreo de 600 mg de tilosina en colmenas con diferente nivel poblacional en otoño. Los valores se expresan como media $\pm$ DE (n=6)

PARÁMETRO	UNIDAD	Miel	
		Bajo nivel poblacional	Alto nivel poblacional
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/g}$	$0,45 \pm 0,06$	$0,42 \pm 0,02$
$T_{m\acute{a}x}$	ds	$4 \pm 3,29^*$	$15,17 \pm 2,86^*$
λ	d^{-1}	$0,004 \pm 0,001$	$0,004 \pm 0,002$
$T_{1/2}\lambda$	ds	$161,10 \pm 35,86$	$214,84 \pm 123,08$
ABC_{0-t}	$\mu\text{g.d/g}$	$29,60 \pm 4,53^*$	$14,26 \pm 2,76^*$
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.d/g}$	$104,70 \pm 16,43$	$132,09 \pm 69,82$
TMR_{0-t}	ds	$38,03 \pm 2,91^*$	$22,41 \pm 3,15^*$
$TMR_{0-\infty}$	ds	$234,77 \pm 51,68$	$315,21 \pm 178,68$

$C_{m\acute{a}x}$: máxima concentración observada; $T_{m\acute{a}x}$: tiempo al que se produce la máxima concentración; λ : constante híbrida de eliminación; $T_{1/2}\lambda$: semivida de eliminación; ABC_{0-t} : área bajo la curva del tiempo 0 al tiempo t; $ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva extrapolada al infinito; TMR_{0-t} : tiempo medio de residencia del tiempo 0 al tiempo t; $TMR_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia extrapolado al infinito. *Expresa diferencias significativas para un nivel de $\alpha \leq 0,05$.

Tabla III.13: Parámetros farmacocinéticos en abejas luego de la administración por espolvoreo de 600 mg de tilosina en colmenas con diferente nivel poblacional en otoño. Los valores se expresan como media $\pm$ DE (n=6)

PARÁMETRO	UNIDAD	Abejas	
		Bajo nivel poblacional	Alto nivel poblacional
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/g}$	$5,32 \pm 0,40^*$	$3,4 \pm 0,28^*$
$T_{m\acute{a}x}$	ds	$1 \pm 0,00$	$1 \pm 0,00$
λ	d^{-1}	$0,045 \pm 0,007$	$0,046 \pm 0,013$
$T_{1/2}\lambda$	ds	$15,71 \pm 2,44$	$16,13 \pm 4,48$
ABC_{0-t}	$\mu\text{g.d/g}$	$133,98 \pm 13,09^*$	$73,29 \pm 12,79^*$
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.d/g}$	$136,18 \pm 14,58^*$	$89,49 \pm 20,74^*$
TMR_{0-t}	ds	$22,49 \pm 2,39^*$	$15,40 \pm 1,65^*$
$TMR_{0-\infty}$	ds	$23,77 \pm 2,88$	$24,32 \pm 5,93$

$C_{m\acute{a}x}$: máxima concentración observada; $T_{m\acute{a}x}$: tiempo al que se produce la máxima concentración; λ : constante híbrida de eliminación; $T_{1/2}\lambda$: semivida de eliminación; ABC_{0-t} : área bajo la curva del tiempo 0 al tiempo t; $ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva extrapolada al infinito; TMR_{0-t} : tiempo medio de residencia del tiempo 0 al tiempo t; $TMR_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia extrapolado al infinito. *Expresa diferencias significativas para un nivel de $\alpha \leq 0,05$.

Análisis estadístico

Se realizó una estadística descriptiva a partir de los datos obtenidos para cada nivel productivo. El test de Kolmogorov-Smirnov fue utilizado para corroborar normalidad y el test de Bartlett para homogeneidad. Luego de esto, al no existir normalidad y homogeneidad de datos se aplicó el test de Kruskal-Wallis. Los valores de *P* determinados se presentan en la Tabla VI.47 del Anexo.

III.2.2.2. Ensayo otoñal en colmenas sanas y enfermas con iguales niveles poblacionales (lotes B, C y D)

El consumo de la formulación entre los periodos inter dosificación por parte de las abejas adultas fue total, sin encontrar al momento de repetir el tratamiento, rastro vestigial alguno del preparado sobre los cabezales de los marcos.

No se observó ningún efecto adverso como consecuencia de la medicación en los lotes B y C, e incluso se destacó el aumento de la vigorosidad de las colmenas enfermas durante el transcurso del muestreo; manifestando a la finalización del mismo (98 días) una franca mejoría de la condición general de la colonia.

En el caso del lote experimental D, durante el transcurso del ensayo se observó el despoblamiento y la muerte paulatina de las colonias, que condujo a la pérdida total del lote a los 3 meses de iniciado el estudio. Se procedió a la eliminación de los cuadros con crías muertas, abejas, cera y miel o polen junto a los materiales de la colmena (piso, alzas, techo, rejilla excluidora, entretapa y cuadros) por incineración.

Curvas de concentración en abejas y miel

En las Tablas VI.22, VI.24, VI.25 y VI.26 del Anexo se presentan las concentraciones de tilosina determinadas por método microbiológico en muestras de abejas y miel, obtenidas tras la administración de 600 mg del antimicrobiano formulado en azúcar finamente molida y administrada por espolvoreo en la cámara de cría de colmenas con diferente estatus sanitario. En las Figuras III.15, III.16, y III.17 se presentan las curvas de disposición promedio de las mismas. Las representaciones gráficas individuales se observan en las Figuras VI.3 y VI.4 del Anexo.

Figura III.15: Perfil de concentraciones de tilosina (media $\pm$ DE; n=6) en miel de colonias sanas y enfermas con bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg por espolvoreo en la cámara de cría en otoño

Figura III.16: Perfil de concentraciones de tilosina (media $\pm$ DE; n=6) en abejas de colonias sanas y enfermas de bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg por espolvoreo en la cámara de cría en otoño

Figura III.17: Perfil de concentraciones de tilosina en abejas y miel luego de la administración de una formulación de tartrato de tilosina, a razón de 600 mg/colmena aplicados en la cámara de cría de colonias de abejas sanas y enfermas con bajo nivel poblacional en otoño (media $\pm$ DE; n=6)

Análisis farmacocinético no compartimental

En las Tablas III.14 y III.15 se describen los parámetros farmacocinéticos de tilosina en abejas y miel de colmenas sanas y enfermas, obtenidos por análisis no compartimental, luego de una administración de 600 mg. Los parámetros individuales calculados para cada colmena se presentan en las Tablas VI.35, VI.37, VI.38 y VI.39 del Anexo.

Tabla III.14: Parámetros farmacocinéticos en miel luego de la administración por espolvoreo de 600mg de tilosina en colmenas con diferente nivel sanitario en otoño. Los valores se expresan como media $\pm$ DE (n=6)

PARÁMETRO	UNIDAD	Miel	
		Sanas	Enfermas
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/g}$	$0,45 \pm 0,06$	$0,42 \pm 0,05$
$T_{m\acute{a}x}$	ds	$4 \pm 3,29$	$7,17 \pm 4,12$
λ	d^{-1}	$0,004 \pm 0,001$	$0,007 \pm 0,003$
$T_{1/2}\lambda$	ds	$161,10 \pm 35,86$	$127,14 \pm 61,98$
ABC_{0-t}	$\mu\text{g.d/g}$	$29,60 \pm 4,53$	$26,71 \pm 3,10$
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.d/g}$	$104,70 \pm 16,43$	$79,72 \pm 40,63$
TMR_{0-t}	ds	$38,03 \pm 2,91$	$37,21 \pm 3,57$
$TMR_{0-\infty}$	ds	$234,77 \pm 51,68$	$184,54 \pm 90,92$

$C_{m\acute{a}x}$: máxima concentración observada; $T_{m\acute{a}x}$: tiempo al que se produce la máxima concentración; λ : constante híbrida de eliminación; $T_{1/2}\lambda$: semivida de eliminación; ABC_{0-t} : área bajo la curva del tiempo 0 al tiempo t; $ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva extrapolada al infinito; TMR_{0-t} : tiempo medio de residencia del tiempo 0 al tiempo t; $TMR_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia extrapolado al infinito.

Tabla III.15: Parámetros farmacocinéticos en abejas luego de la administración por espolvoreo de 600mg de tilosina en colmenas con diferente nivel sanitario en otoño. Los valores se expresan como media $\pm$ DE (n=6)

PARÁMETRO	UNIDAD	Abejas	
		Sanas	Enfermas
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/g}$	$5,32 \pm 0,4$	$4,9 \pm 0,25$
$T_{m\acute{a}x}$	Ds	$1 \pm 0,0$	$1 \pm 0,0$
λ	d^{-1}	$0,045 \pm 0,007$	$0,054 \pm 0,011$
$T_{1/2}\lambda$	Ds	$15,71 \pm 2,44$	$13,37 \pm 3,09$
ABC_{0-t}	$\mu\text{g.d/g}$	$133,98 \pm 13,09$	$128,65 \pm 15,08$
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.d/g}$	$136,18 \pm 14,58$	$132,01 \pm 12,97$
TMR_{0-t}	Ds	$22,49 \pm 2,39$	$20,37 \pm 2,72$
$TMR_{0-\infty}$	Ds	$23,77 \pm 2,88$	$22,12 \pm 3,40$

$C_{m\acute{a}x}$: máxima concentración observada; $T_{m\acute{a}x}$: tiempo al que se produce la máxima concentración; λ : constante híbrida de eliminación; $T_{1/2}\lambda$: semivida de eliminación; ABC_{0-t} : área bajo la curva del tiempo 0 al tiempo t; $ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva extrapolada al infinito; TMR_{0-t} : tiempo medio de residencia del tiempo 0 al tiempo t; $TMR_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia extrapolado al infinito.

Análisis estadístico

Realizamos la comparación estadística de los parámetros farmacocinéticos, con el objetivo de relacionar los hallazgos en las colmenas sanas y enfermas, aplicando el test paramétrico de la varianza. No se encontraron diferencias significativas (considerando un nivel de probabilidad de $\alpha \leq 0,05$) para ninguno de los datos analizados ni en abejas ni en miel, en la misma época y a igualdad de nivel productivo entre sanas y enfermas (Tabla VI.48 del Anexo).

De esta forma, consideramos valederos los datos de colmenas sanas para realizar la modelización farmacocinética-farmacodinámica.

Eficacia del tratamiento

Se evaluó la eficacia de la aplicación del quimioterápico a través de la observación y control de los lotes experimentales en los diferentes puntos de muestreo y a la finalización del mismo, a los 3 meses y medio de la última dosis de tilosina. Como se enunció anteriormente, en el lote enfermo tratado no se perdió ninguna colmena tras el periodo de hibernación y se observó una mejoría manifiesta a través del número de individuos que constituían las mismas al comienzo de la primavera. Se decidió continuar con el control del lote hasta el otoño siguiente, sin observar cambios en la condición sanitaria durante el transcurso, ni al finalizar el mismo.

A diferencia de esto en el lote testigo, enfermo no tratado, no hubo sobrevida de las colonias al finalizar el invierno, mostrando conforme avanzaba el ensayo, un rápido despoblamiento de las colmenas con comportamiento de pillaje y finalmente la muerte de las mismas.

III.2.2.3 Ensayo en colmenas sanas en diferentes épocas productivas (lotes B y E)

Curvas de concentración en abejas y miel

Tras la administración de 600 mg de tilosina en una base de azúcar finamente molida se obtuvieron las concentraciones en abejas y miel de colmenas en otoño y primavera que se presentan en las Tablas VI.22, VI.24, VI.27 y VI.29 del Anexo. Las representaciones gráficas de los valores medios $\pm$ DE de las mismas se observan en las Figuras III.18, III.19, III.20 y III.21. Las representaciones individuales se presentan en las Figuras VI.3 y VI.5 del Anexo.

Figura III.18: Perfil de concentraciones de tilosina (media $\pm$ DE; n=6) en miel de colonias sanas en diferente época productiva y bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg por espolvoreo en la cámara de cría

Figura III.19: Perfil de concentraciones de tilosina (media $\pm$ DE; n=6) en miel del alza superior e inferior de colonias sanas en primavera luego de la administración de 600 mg por espolvoreo en la cámara de cría

Figura III.20: Perfil de concentraciones de tilosina (media $\pm$ DE; n=6) en abejas de colonias sanas en diferente época productiva y bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg por espolvoreo en la cámara de cría

Figura III.21: Perfil de concentraciones de tilosina en abejas y miel luego de la administración de una formulación de tilosina, a razón de 600 mg/colmena aplicados en la cámara de cría de colonias de abejas sanas en otoño y primavera (media $\pm$ DE; n=6)

Análisis farmacocinético no compartimental

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos tras análisis no compartimental se describen en las Tablas III.16, III.17 y III.18. Los parámetros individuales obtenidos para cada colmena se presentan en las Tablas VI.35, VI.37, VI.40, VI.41 y VI.42 del Anexo.

Tabla III.16: Parámetros farmacocinéticos en miel luego de la administración por espolvoreo de 600mg de tilosina en colmenas sanas con diferente nivel productivo. Los valores se expresan como media $\pm$ DE (n=6)

PARÁMETRO	UNIDAD	Miel	
		Otoño	Primavera
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/g}$	$0,45 \pm 0,06$	$0,44 \pm 0,04$
$T_{m\acute{a}x}$	ds	$4 \pm 3,29^*$	$22,17 \pm 2,86^*$
λ	d^{-1}	$0,004 \pm 0,001^*$	$0,022 \pm 0,011^*$
$T_{1/2}\lambda$	ds	$161,10 \pm 35,86^*$	$38,26 \pm 17,30^*$
ABC_{0-t}	$\mu\text{g.d/g}$	$29,60 \pm 4,53^*$	$22,87 \pm 5,06^*$
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.d/g}$	$104,70 \pm 16,43^*$	$29,87 \pm 11,11^*$
TMR_{0-t}	ds	$38,03 \pm 2,91^*$	$43,71 \pm 3,69^*$
$TMR_{0-\infty}$	ds	$234,77 \pm 51,68^*$	$67,71 \pm 23,59^*$

$C_{m\acute{a}x}$: máxima concentración observada; $T_{m\acute{a}x}$: tiempo al que se produce la máxima concentración; λ : constante híbrida de eliminación; $T_{1/2}\lambda$: semivida de eliminación; ABC_{0-t} : área bajo la curva del tiempo 0 al tiempo t; $ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva extrapolada al infinito; TMR_{0-t} : tiempo medio de residencia del tiempo 0 al tiempo t; $TMR_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia extrapolado al infinito. *Expresa diferencias significativas para un nivel de $\alpha \leq 0,05$.

Tabla III.17: Parámetros farmacocinéticos en miel de diferentes alzas luego de la administración por espolvoreo de 600mg de tilosina en colmenas sanas en primavera. Los valores se expresan como media $\pm$ DE (n=6)

PARÁMETRO	UNIDAD	Miel	
		Alza Superior	Alza Inferior
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/g}$	$0,35 \pm 0,08$	$0,44 \pm 0,04$
$T_{m\acute{a}x}$	ds	$32,40 \pm 16,27$	$22,17 \pm 2,86$
λ	d^{-1}	$0,036 \pm 0,012$	$0,022 \pm 0,011$
$T_{1/2}\lambda$	ds	$22,38 \pm 11,36$	$38,26 \pm 17,30$
ABC_{0-t}	$\mu\text{g.d/g}$	$15,36 \pm 4,57^*$	$22,87 \pm 5,06^*$
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.d/g}$	$17,83 \pm 7,25$	$29,87 \pm 11,11$
TMR_{0-t}	ds	$46,65 \pm 10,82$	$43,71 \pm 3,69$
$TMR_{0-\infty}$	ds	$57,09 \pm 16,36$	$67,71 \pm 23,59$

$C_{m\acute{a}x}$: máxima concentración observada; $T_{m\acute{a}x}$: tiempo al que se produce la máxima concentración; λ : constante híbrida de eliminación; $T_{1/2}\lambda$: semivida de eliminación; ABC_{0-t} : área bajo la curva del tiempo 0 al tiempo t; $ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva extrapolada al infinito; TMR_{0-t} : tiempo medio de residencia del tiempo 0 al tiempo t; $TMR_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia extrapolado al infinito. *Expresa diferencias significativas para un nivel de $\alpha \leq 0,05$.

Tabla III.18: Parámetros farmacocinéticos en abejas luego de la administración por espolvoreo de 600mg de tilosina en colmenas sanas con diferente nivel productivo. Los valores se expresan como media $\pm$ DE (n=6)

PARÁMETRO	UNIDAD	Abejas	
		Otoño	Primavera
$C_{\max}$	$\mu\text{g/g}$	$5,32 \pm 0,4^*$	$3,13 \pm 0,26^*$
$T_{\max}$	ds	$1 \pm 0,0$	$1 \pm 0,0$
λ	d^{-1}	$0,045 \pm 0,007^*$	$0,229 \pm 0,017^*$
$T_{1/2\lambda}$	ds	$15,71 \pm 2,44^*$	$3,04 \pm 0,23^*$
ABC_{0-t}	$\mu\text{g.d/g}$	$133,98 \pm 13,09^*$	$14,48 \pm 6,97^*$
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.d/g}$	$136,18 \pm 14,58^*$	$14,61 \pm 6,93^*$
TMR_{0-t}	ds	$22,49 \pm 2,39^*$	$2,82 \pm 1,79^*$
$TMR_{0-\infty}$	ds	$23,77 \pm 2,88^*$	$3,07 \pm 1,68^*$

$C_{\max}$: máxima concentración observada; $T_{\max}$: tiempo al que se produce la máxima concentración; λ : constante híbrida de eliminación; $T_{1/2\lambda}$: semivida de eliminación; ABC_{0-t} : área bajo la curva del tiempo 0 al tiempo t; $ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva extrapolada al infinito; TMR_{0-t} : tiempo medio de residencia del tiempo 0 al tiempo t; $TMR_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia extrapolado al infinito. *Expresa diferencias significativas para un nivel de $\alpha \leq 0,05$.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico descriptivo para los datos obtenidos para cada época productiva; utilizando el test de Levene y posteriormente los resultados fueron comparados aplicando Anova o Kruskal-Wallis (Statgraphic 5.0). Los valores de P determinados se presentan en las Tablas VI.49 y VI.50 del Anexo.

III.2.2.4 Ensayo en colmenas sanas en época estival (lote F)

Curvas de concentración en abejas, miel, larvas jóvenes y larvas adultas

En la Figura III.22 se exponen las representaciones gráficas de los valores medios de las concentraciones dosadas en abejas, larvas de dos y cinco días de vida y miel del alza inferior de 6 colmenas tras la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en época estival.

Los valores y representaciones individuales se observan en las Tablas VI.30, VI.31, VI.32, VI.33 y Figura VI.6 del Anexo respectivamente.

Figura III.22: Perfil de concentraciones de tilosina (media $\pm$ DE; $n=6$) en miel de colonias sanas de bajo nivel poblacional en verano luego de la administración de 600 mg por espolvoreo en la cámara de cría

Análisis farmacocinético no compartimental

Los parámetros farmacocinéticos tras análisis no compartimental se describen en las Tablas III.19 y III.20. Los parámetros individuales obtenidos para cada colmena se presentan en las Tablas VI.43, VI.44, VI.45 y VI.46 del Anexo.

Tabla III.19: Parámetros farmacocinéticos en abejas nodrizas y en larvas de 2 y 5 días de edad (estadíos previos a la operculación) luego de la administración por espolvoreo de 600 mg de tilosina en colmenas de bajo nivel poblacional en verano. Los valores se expresan como media $\pm$ DE (n=6)

PARÁMETRO	UNIDAD	Abejas	Larvas 5 días	Larvas 2 días
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/g}$	$3,44 \pm 0,31^a$	$1,93 \pm 0,23^a$	$1,61 \pm 0,28^a$
$T_{m\acute{a}x}$	ds	$1 \pm 0,00$	$1 \pm 0,00$	$1 \pm 0,00$
λ	d^{-1}	$0,083 \pm 0,040^b$	$0,159 \pm 0,141^c$	$0,281 \pm 0,096^{bc}$
$T_{1/2}\lambda$	ds	$9,99 \pm 4,33^d$	$6,12 \pm 2,66^e$	$2,73 \pm 0,92^{de}$
ABC_{0-t}	$\mu\text{g.d/g}$	$38,79 \pm 6,07^f$	$12,80 \pm 5,37^f$	$6,24 \pm 2,09^f$
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.d/g}$	$44,74 \pm 10,71^g$	$14,11 \pm 6,13^g$	$6,81 \pm 2,26^g$
TMR_{0-t}	ds	$10,13 \pm 1,24^{ij}$	$6,51 \pm 2,64^j$	$3,10 \pm 0,94^i$
$TMR_{0-\infty}$	ds	$14,70 \pm 5,18^k$	$8,76 \pm 3,83^k$	$4,05 \pm 1,24^k$

$C_{m\acute{a}x}$: máxima concentración observada; $T_{m\acute{a}x}$: tiempo al que se produce la máxima concentración; λ : constante híbrida de eliminación; $T_{1/2}\lambda$: semivida de eliminación; ABC_{0-t} : área bajo la curva del tiempo 0 al tiempo t; $ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva extrapolada al infinito; TMR_{0-t} : tiempo medio de residencia del tiempo 0 al tiempo t; $TMR_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia extrapolado al infinito. *a,b,c, etc.: Letras iguales significan diferencias significativas a un nivel de significancia de $\alpha \leq 0,05$.

Tabla III.20: Parámetros farmacocinéticos en miel luego de la administración por espolvoreo de 600mg de tilosina en colmenas de bajo nivel poblacional en verano. Valores expresados como media $\pm$ DE (n=6)

PARÁMETRO	UNIDAD	Miel
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/g}$	$0,48 \pm 0,03$
$T_{m\acute{a}x}$	ds	$1,67 \pm 1,03$
λ	d^{-1}	$0,007 \pm 0,003$
$T_{1/2}\lambda$	ds	$118,45 \pm 38,69$
ABC_{0-t}	$\mu\text{g.d/g}$	$13,73 \pm 0,81$
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.d/g}$	$84,38 \pm 26,69$
TMR_{0-t}	ds	$15,25 \pm 0,28$
$TMR_{0-\infty}$	ds	$171,36 \pm 56,41$

$C_{m\acute{a}x}$: máxima concentración observada; $T_{m\acute{a}x}$: tiempo al que se produce la máxima concentración; λ : constante híbrida de eliminación; $T_{1/2}\lambda$: semivida de eliminación; ABC_{0-t} : área bajo la curva del tiempo 0 al tiempo t; $ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva extrapolada al infinito; TMR_{0-t} : tiempo medio de residencia del tiempo 0 al tiempo t; $TMR_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia extrapolado al infinito.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico aplicando ANOVA a los parámetros logotransformados para determinar las diferencias entre rangos. Posteriormente se realizó un test de contraste de rango múltiple, que utiliza el método de las diferencias mínimas significativas (DMS) de Fischer,

para discernir las medias significativamente diferentes (Statgraphic 5.0). Los valores de P determinados se presentan en la Tabla VI.51 del Anexo.

Relación farmacocinética/Farmacodinámica

Considerando una CIM_{90} de tilosina para *P. larvae* de 0,0625 $\mu\text{g/mL}$ y que el $T > CIM$ es el parámetro que mejor describe el comportamiento de este antimicrobiano; observamos que las concentraciones halladas en el sitio de infección permanecen por arriba de ese valor al menos 17 días en larvas jóvenes y 40 días en larvas adultas aún desoperculadas. El porcentaje de tiempo sobre la CIM (% $T > CIM$) en el segundo intervalo inter dosis, resultó de 42,86% y 100% para cada grupo etario de larvas respectivamente. Otro hallazgo fue que las concentraciones máximas determinadas en las larvas sobrepasaron el valor de CIM ($C_{\text{máx}}/CIM$) unas 25,76 y 30,88 veces respectivamente.

Figura III.23: Perfil de concentraciones de tilosina (media $\pm$ DE; $n=6$) en larvas de 2 y 5 días de edad en relación a la concentración inhibitoria mínima del 90% (CIM_{90}) de las cepas aisladas de *P. larvae*, luego de la administración de 600 mg de principio activo

III.3. Estudio de estabilidad de tilosina en miel

III.3.1. Estabilidad de tilosina en miel *in vitro*

III.3.1.1. Procedimiento analítico

III.3.1.1.1. Validación del método microbiológico

Los resultados del método de validación para la cuantificación de tilosina en miel utilizando un rango de concentraciones entre 0,25-4 µg/g de miel se muestran en el apartado III.2.1.1.1 del estudio farmacocinético.

III.3.1.2. Degradación de tilosina en miel a diferentes temperaturas

Los resultados obtenidos durante el presente ensayo al tiempo cero, y hasta los 357 días, se encuentran representados en las Figuras III.24 y III.25. Las Tablas III.21 y III.22 contienen los valores medios de concentración y los desvíos estándar determinados. Los valores individuales se presentan en las Tablas VI.52 y VI.53 del Anexo.

Tabla III.21: Valoración de tilosina en miel a diferentes temperaturas (35°C, 20°C y 4°C) en función del tiempo iniciando el estudio con una concentración de 1 µg/g

Tpo(ds)	35°C	20°C	4°C
0	1,17±0,04	1,23±0,12	1,37±0,16
21	1,14±0,44	1,30±0,01	1,42±0,03
42	1,13±0,03	1,38±0,04	1,25±0,11
63	1,10±0,11	1,36±0,16	1,36±0,12
84	0,83±0,24	1,33±0,02	1,52±0,01
105	0,92±0,07	1,35±0,00	1,40±0,07
126	1,10±0,02	1,19±0,02	1,30±0,04
147	0,88±0,05	1,16±0,00	1,21±0,00
168	1,04±0,11	1,10±0,11	1,36±0,00
189	0,86±0,05	1,16±0,26	1,41±0,10
210	0,69±0,00	0,96±0,10	1,21±0,03
231	0,74±0,12	1,03±0,04	1,28±0,10
252	0,77±0,08	1,02±0,20	1,38±0,08
273	0,96±0,04	1,07±0,04	1,21±0,08
294	0,82±0,07	1,08±0,07	1,33±0,14
315	0,65±0,00	1,11±0,04	1,30±0,12
336	0,76±0,28	0,97±0,07	1,16±0,05
357	0,77±0,17	1,06±0,08	1,26±0,04

Tabla III.22: Valoración de tilosina en miel a diferentes temperaturas (35°C, 20°C y 4°C) en función del tiempo iniciando el estudio con una concentración de 2 µg/g

Tpo(ds)	35°C	20°C	4°C
0	1,99±0,24	1,99±0,24	2,18±0,04
21	1,95±0,03	1,86±0,09	1,92±0,08
42	2,14±0,06	2,07±0,04	2,23±0,07
63	1,88±0,12	2,07±0,23	2,26±0,03
84	1,80±0,08	2,00±0,04	2,06±0,04
105	1,67±0,37	1,92±0,06	2,17±0,07
126	1,84±0,03	2,00±0,06	2,13±0,01
147	1,83±0,04	1,93±0,06	2,03±0,04
168	1,80±0,27	1,93±0,00	2,21±0,04
189	1,80±0,00	2,00±0,10	2,14±0,05
210	1,59±0,22	1,75±0,09	1,87±0,00
231	1,63±0,16	1,86±0,00	1,94±0,12
252	1,66±0,08	1,72±0,00	2,01±0,06
273	1,72±0,08	1,63±0,06	1,89±0,04
294	1,59±0,22	1,75±0,13	1,95±0,06
315	1,69±0,02	1,87±0,12	2,14±0,14
336	1,53±0,22	1,76±0,04	1,97±0,04
357	1,58±0,07	1,82±0,03	1,94±0,01

Figura III.24: Perfil de degradación de 1 µg/g de tilosina en miel a las tres temperaturas de estudio (35°C, 20°C y 4°C)

Figura III.25: Perfil de degradación de 2 µg/g de tilosina en miel a las tres temperaturas de estudio (35°C, 20°C y 4°C)

III.3.1.3. Análisis matemático de los datos

III.3.1.3.1. Discriminación del modelo cinético de degradación

Se realizó un análisis de regresión lineal de los valores experimentales obtenidos, determinándose los valores de coeficiente de correlación (r), ordenada en el origen y pendiente (K) para cada orden de reacción considerada. A su vez, se evaluó la relación entre las variables (concentración y tiempo) aplicando ANOVA para un nivel de confianza del 95%. Los resultados del análisis, se exponen en las Tablas III.23 y III.24.

Tabla III.23: Análisis de regresión lineal y estadístico de los perfiles de degradación de 1 µg/g de tilosina en miel a diferentes temperaturas

Cinética de orden	Temperatura	Coeficiente de correlación (r)	Pendiente (K)	Ordenada al origen	Valor p (ANOVA)
Cero	35°C	-0,6629	0,0012±0,0002	1,1199±0,0483	0,0000
	20°C	-0,7178	0,0010±0,0002	1,3391±0,0351	0,0000
	4°C	-0,4170	0,0004±0,0002	1,3933±0,0329	0,0114
Uno	35°C	-0,6524	0,0013±0,0003	0,1118±0,0544	0,0000
	20°C	-0,7093	0,0009±0,0001	0,2928±0,0309	0,0000
	4°C	-0,4144	0,0003±0,0001	0,3294±0,0249	0,0120
Dos	35°C	0,6326	0,0015±0,0003	0,8914±0,0652	0,0000
	20°C	0,6939	0,0008±0,0001	0,7447±0,0280	0,0000
	4°C	0,4139	0,0002±0,0001	0,7208±0,0190	0,0121

Tabla III.24: Análisis de regresión lineal y estadístico de los perfiles de degradación de 2µg/g de tilosina en miel a diferentes temperaturas

Cinética de orden	Temperatura	Coefficiente de correlación (r)	Pendiente (K)	Ordenada al origen	Valor p (ANOVA)
Cero	35°C	-0,6817	0,0012±0,0002	1,9778±0,0470	0,0000
	20°C	-0,6190	0,0008±0,0002	2,0289±0,0368	0,0001
	4°C	-0,4879	0,0006±0,0002	2,0289±0,0376	0,0025
Uno	35°C	-0,6649	0,0007±0,0001	0,6814±0,0277	0,0000
	20°C	-0,6153	0,0004±0,0001	0,7067±0,0196	0,0001
	4°C	-0,4853	0,0003±0,0001	0,7699±0,0182	0,0027
Dos	35°C	0,6439	0,0004±0,0001	0,5061±0,0166	0,0000
	20°C	0,6119	0,0002±0,0001	0,4933±0,0105	0,0001
	4°C	0,4809	0,0001±0,0000	0,4636±0,0089	0,0030

A partir de estas tablas, se puede apreciar que los valores de probabilidad se hallaron en todos los casos, por debajo del límite de confianza establecido ($P \leq 0,05$). Esto demuestra la relación estadísticamente significativa entre las variables. Por su parte, los valores de coeficiente de correlación resultaron ligeramente superiores, cuando los valores experimentales fueron ajustados al modelo de cinética de orden cero, respecto de los otros dos modelos. De esta forma, justificamos la elección del modelo matemático más sencillo, cinética de orden cero, para explicar la reacción de degradación del complejo tilosina en miel.

III.3.1.3.2. Dependencia de la tasa de eliminación con la temperatura

Las constantes de velocidad de degradación (K), fueron estimadas por regresión lineal de los datos experimentales, presentándose sus valores en la Tabla III.25, para cada temperatura y concentración inicial. En la misma se puede observar cómo los valores de la constante aumentan claramente con la temperatura.

Tabla III.25: Constantes de degradación (K) estimadas por regresión lineal de los datos experimentales a diferentes temperaturas (35°C, 20°C y 4°C)

Concentración	Temperatura	K
1ppm	35°C	0,0012
	20°C	0,0010
	4°C	0,0004
2ppm	35°C	0,0012
	20°C	0,0008
	4°C	0,0006

Se estableció una relación entre el valor de k y la temperatura mediante la aplicación de la ecuación de Arrhenius (Ecuación II.28). Por ajuste lineal, se determinaron los valores de la constante A en $3,822 \text{ ds}^{-1}$ y E_a en $20543,69 \text{ J/mol}$.

Figura III.26: Gráfica del logaritmo natural de K en función de la inversa de la temperatura ($1/T$)

Como se puede observar en la Figura III.26, la constante K no sólo resulta independiente del tiempo sino también de la concentración. Por lo tanto, a partir de la ecuación de Arrhenius y los valores determinados de A y E_a , se podrán calcular las tasas de eliminación de tilosina en miel interpolando otras temperaturas de análisis.

III.3.1.3.3 Determinación de la semivida de eliminación

Asumiendo que la degradación de tilosina en miel se corresponde con un modelo cinético de orden cero, se calculó la semivida de eliminación de $1 \mu\text{g/g}$ a diferentes temperaturas. Para ello, se utilizó la Ecuación II.30 y los valores de K obtenidos mediante la ecuación de Arrhenius. Se consideraron para el análisis, la temperatura de almacenaje en estante (20°C), temperatura del interior de la colmena (35°C) y temperatura de pasteurización (65°C), a fin de evaluar la posibilidad de instaurar diferentes medidas de manejo para disminuir los niveles residuales. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla III.26. También se procedió al cálculo a partir de $0,5 \mu\text{g/g}$ tomando como referencia las concentraciones máximas determinadas en miel en los diferentes ensayos farmacocinéticos del estudio, presentándose los resultados en la Tabla VI.54 del Anexo.

Tabla III.26: Semivida de eliminación de 1 µg/g de tilosina en miel a diferentes temperaturas

Temperatura	Días	Meses	Años
4°C	973,78	32,46	2,67
20°C	598,60	19,95	1,64
35°C	397,15	13,24	1,09
65°C	194,99	6,50	0,53

III.3.2. Estabilidad de tilosina en miel *in vivo*

Como parte del diseño de los ensayos farmacocinéticos, se contempló la toma de muestras previamente a la cosecha siguiente, con el fin de detectar la presencia de niveles residuales del antimicrobiano a las dosis ensayadas. Este objetivo se pudo alcanzar en dos lotes experimentales, obteniéndose muestras a los 371 días post tratamiento, en el caso del lote B (otoño, alto nivel poblacional) y a los 126 días post tratamiento en el lote E (primavera, bajo nivel poblacional).

En ambos lotes se hallaron niveles de tilosina cuantificables en el orden de $0,16 \pm 0,02$ µg/g de miel luego del tratamiento otoñal ($n=2$) y de $0,22 \pm 0,1$ µg/g de miel posteriores al tratamiento de primavera ($n=5$), como se representa en la Figura III.27.

Figura III.27: Niveles residuales de tilosina en miel al momento de la cosecha luego de la aplicación de 600 mg en otoño y primavera

IV. DISCUSIÓN

IV. DISCUSIÓN

IV.1. Estudio bacteriológico

IV.1.1. Aislamiento, identificación y selección de cepas de *P. larvae*

El diagnóstico de un brote de LA se basa en la presencia de signos clínicos y la identificación del agente patógeno (70, 254).

Las muestras de elección para el aislamiento fueron restos larvales viscosos o en forma de escama, ya que los mismos constituyen un material altamente infectivo, que contiene billones de esporas en su interior (80, 255). Si bien el aislamiento puede realizarse a partir de un amplio rango de muestras (abejas, miel, polen y/o cera), las técnicas empleadas para las mismas son más complejas y engorrosas, dificultando el análisis (227, 256, 257, 258, 259).

En la última década, fueron desarrolladas numerosas técnicas moleculares, altamente sensibles y precisas en el diagnóstico de *P. larvae* (96, 97, 99, 100, 254, 260). La reciente reclasificación de las dos subespecies *larvae* y *pulvificiens* dentro de la misma especie sin diferenciación en subespecies (57), ha dejado sin efecto varias de estas técnicas diagnósticas, que tenían como fin su diferenciación. La importancia de la caracterización fenotípica y genotípica de las dos subespecies se justificaba en que las mismas originaban diferentes patologías (68). Para tal fin, también se evaluaban las características pigmentarias de las colonias (68) y la capacidad de sobrevida en caldo nutritivo (77), junto con perfiles bioquímicos diferenciales en la utilización de determinados carbohidratos como manitol (77, 261) y salicilina (262).

Los métodos tradicionales de cultivo a partir de larvas enfermas y microscopía proveen las herramientas necesarias para un diagnóstico efectivo y económico (263).

Hoy en día, existe una hipótesis que relaciona el genotipo infectante con el progreso de la enfermedad y la transmisión de la misma dentro del apiario, la que se encuentra sustentada en bioensayos de exposición (61, 85). En caso de demostrarse a campo estos resultados, las técnicas moleculares, especialmente las basadas en la determinación de los diferentes genotipos ERIC, resultarían de gran utilidad (57).

IV.1.2. Prueba cualitativa de susceptibilidad por el método de difusión de discos

Actualmente existen métodos estandarizados para la realización de ensayos de susceptibilidad antimicrobiana por diferentes técnicas para patógenos de origen veterinario (235). Los mismos se encuentran desarrollados para evaluar microorganismos aerobios, no exigentes de rápido crecimiento, especialmente pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp. y la mayoría de los bacilos Gram negativos no fermentativos. Teniendo en cuenta determinadas consideraciones, se pueden evaluar estreptococos, neumococos, *Haemophilus* spp y *Neisseria gonorrhoeae* (231).

Para el caso particular de *P. larvae*, no se encuentra normalizada hasta el momento ninguna metodología para realizar pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Consideramos que las mismas, correctamente interpretadas, constituyen el punto de partida para la selección criteriosa de un protocolo terapéutico. En el desarrollo de nuestro trabajo de investigación, adaptamos la técnica original de Bauer y col. (234) siguiendo los lineamientos de control de calidad establecidos por la CLSI (235, 236).

Contemplando el difícil desarrollo de la bacteria en medios de cultivo simples y la lenta velocidad de crecimiento, se utilizó el medio MYPGP agar en lugar de Müller-Hinton, ya que contiene sustancias nutritivas suplementarias a las que aporta el medio de cultivo estándar; permitiendo un desarrollo satisfactorio del microorganismo. Otra medida implementada, fue la comparación de los diámetros de los halos de inhibición de las cepas control (*E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923) en medio MYPGP, junto con los valores de las tablas de la CLSI para dichas cepas en medio Müller-Hinton. Esta comparación, permitió establecer que las sustancias presentes en el medio de cultivo, no tuvieron un efecto antagónico con los antibióticos ensayados, al mismo tiempo que se pudieron evaluar los reactivos, los discos (incluida su conservación) y la metodología utilizada. Consideramos por lo tanto, que la técnica modificada resultó apropiada para discriminar los principales grupos de antimicrobianos frente a los cuales nuestros aislamientos presentaron susceptibilidad o resistencia.

La selección de los antimicrobianos a evaluar, se realizó tratando de abarcar todos los grupos que, por sus características, pudieran tener actividad frente al patógeno. La enorme variabilidad entre las técnicas reportadas en la bibliografía, hace que la comparación de patrones de susceptibilidad deba realizarse con cautela, siendo este uno de los principales motivos por los que se decidió confrontar los aislamientos a un amplio número de agentes antimicrobianos bajo las mismas condiciones de estudio.

Las 11 cepas aisladas, mostraron alta susceptibilidad a penicilinas de espectro reducido (penicilina G), de espectro ampliado (ampicilina) y cefalosporinas de 3^{ra} generación (ceftiofur), todos estos antimicrobianos pertenecientes al grupo de los β lactámicos. También se utilizó un disco de amoxicilina-ácido clavulánico (combinación de un β lactámicos con un inhibidor de β lactamasa), hallándose susceptibles el 100% de los aislamientos a todos los β lactámicos utilizados. La alta sensibilidad a ampicilina y amoxicilina fue reportada en otros países (98, 209).

Resultó interesante, el hecho que los diámetros promedio de los halos de inhibición exhibidos por el grupo de los glucopéptidos (teicoplanina y vancomicina), estuviesen en rangos sensiblemente menores (38,84 y 34,85 mm respectivamente) a los exhibidos por los β lactámicos (65,46-74,50 mm). Ambos grupos de antimicrobianos, comparten el modo de acción bactericida al inhibir la síntesis de pared bacteriana; aunque su mecanismo fino de acción difiera, ya que actúan en pasos metabólicos diferentes en la formación de los peptidoglucanos constitutivos de la pared. Nuestra observación concuerda en términos generales con el patrón de susceptibilidad reportado previamente para aislamientos en nuestro país (198), a pesar de que los antimicrobianos evaluados dentro de cada grupo no fuesen exactamente los mismos. Sin embargo, en Brasil y los Estados Unidos han encontrado al grupo de los glucopéptidos muy poco activo frente a cepas de *P. larvae* (111, 210). Se trata de detalles muy particulares del mecanismo de los inhibidores de la síntesis de la pared frente al microorganismo que nos ocupa; diferentes puntos de ataque sobre la misma cadena sintética no dan lugar a los mismos resultados. Es algo que debe ser cuidadosamente considerado en la selección de antimicrobianos frente a esta patología.

En los estudios de susceptibilidad, normalmente se utiliza como representante de los macrólidos solamente a eritromicina (presenta un anillo macrocíclico de 14 átomos de carbono). No obstante, se decidió evaluar el comportamiento *in vitro* de representantes con anillo 15 membrados (azitromicina) y 16 membrados (tilmicosina y tilosina). Tilmicosina es un macrólido semisintético, sintetizado a partir de tilosina y desarrollada exclusivamente para ser usado en medicina veterinaria. Tanto tilmicosina como tilosina ofrecen ventajas importantes sobre eritromicina, ya que poseen un espectro bacteriano más amplio, mejores características farmacocinéticas y menores efectos colaterales (127, 264). Azitromicina por su parte, posee mayor resistencia frente a la degradación ácida, tiene un volumen de distribución más amplio y una semivida de eliminación más prolongada que la eritromicina (123, 265, 266, 267); y a diferencia de los macrólidos tradicionales, posee un marcado EPA *in vivo* (186). Las propiedades mencionadas permitieron suponer *a priori*, que azitromicina y tilmicosina podrían resultar alternativas viables e interesantes para el tratamiento de infecciones bacterianas causadas por *P.*

larvae; razón por la cual fueron seleccionados para este ensayo, a pesar de no contar en el caso de la azitromicina con autorización para su uso en medicina veterinaria.

Eritromicina, tilmicosina y tilosina presentaron muy buena actividad *in vitro*, mostrando halos de inhibición promedio entre 53,60 y 58,93 mm con discos conteniendo 15 µg de principio activo. Los valores para tilmicosina (entre 53,33 y 57,10 mm) resultaron superiores y más homogéneos a los documentados en otro estudio realizado en nuestro país (268); aunque se debe tener en cuenta, que en ese caso fueron 23 las cepas confrontadas al antimicrobiano, y su origen fue cosmopolita, lo que lógicamente incrementó la variabilidad de respuesta de los microorganismos.

En nuestro ensayo también se probaron discos de tilosina con 5 y 30 µg de concentración del fármaco (Tabla VI.4 del Anexo). Para el caso de los discos con menor concentración, los aislamientos se comportaron aún como altamente sensibles (45,71 mm de diámetro promedio), siendo los resultados comparables a los obtenidos en Brasil (111), en cuyo análisis se utilizaron discos conteniendo 8 µg de tilosina. Con los discos que contenían mayor concentración (30 µg de principio activo), nuestros hallazgos difieren notoriamente con un estudio realizado también en nuestro país, doblando en valor los diámetros de los halos de inhibición a aquellos previamente reportados (198).

Curiosamente, frente a azitromicina, el microorganismo mostró menor susceptibilidad que al resto de los integrantes del grupo, con halos promedio de 47,37 mm. De todas formas, este valor representa alta sensibilidad del microorganismo al fármaco, coincidiendo con lo informado en cepas aisladas en Estados Unidos (211).

En todos los trabajos publicados, los macrólidos, han sido considerados como moléculas altamente activas frente al microorganismo, sin reportarse aún casos de resistencia (111, 198, 209, 210, 211, 268).

Rifampicina exhibió muy buena actividad *in vitro*, encontrándose diámetros de halo de inhibición cercanos a los descriptos para el grupo de los β lactámicos. Este antimicrobiano bactericida de amplio espectro de actividad (269), no está disponible para su utilización frente a patógenos aislados de animales. Sin embargo, la alta susceptibilidad de *P. larvae* a este agente fue descripta también en ensayos realizados por otros autores (198, 210).

Clindamicina se utilizó como disco representante de la familia de las lincosamidas, permitiendo estimar también la susceptibilidad de la bacteria a lincomicina (235). Todos los

aislamientos resultaron sensibles al antimicrobiano, con halos de 45,62 mm de diámetro promedio, concordando estos valores con los resultados obtenidos por otros investigadores de Argentina y Japón (198, 209). No obstante, en un estudio llevado a cabo en Estados Unidos, resultan remarcables las diferencias halladas respecto de la susceptibilidad de las cepas frente a diferentes lincosamidas. Los investigadores encontraron activa a lincomicina hasta 0,04 µg de principio activo por disco, mientras que clindamicina sólo resultó activa a una concentración 10 veces mayor (210).

Ciprofloxacina y enrofloxacin, fueron utilizadas como representantes de la familia de las fluoroquinolonas, un grupo de antimicrobianos sintéticos usados en medicina tanto humana como veterinaria para el tratamiento de una variedad de enfermedades infecciosas (270). Ambos antimicrobianos presentaron aceptable actividad *in vitro*, mostrando halos de inhibición promedio de 41,74 mm para ciprofloxacina y 45,51 mm para enrofloxacin, con discos conteniendo 5 µg de principio activo. Este patrón de susceptibilidad es comparable con un estudio anterior efectuado por otros autores, aunque en ese caso las fluoroquinolonas ensayadas fueron pefloxacina y norfloxacina (198). En Japón y Estados Unidos fue documentada moderada actividad de este grupo (enrofloxacin, danofloxacina) frente a *P. larvae* (209, 211). Como dato interesante, podemos agregar que *in vivo*, enrofloxacin es metabolizada a ciprofloxacina, por lo que la determinación de susceptibilidad del microorganismo a ambas moléculas resulta de importancia. En mamíferos la proporción de ciprofloxacina producida por metabolismo no es muy elevada, pero, de todos modos, contribuye con la eficacia terapéutica (270). No tenemos datos sobre el metabolismo de enrofloxacin en abejas, aunque se trata de un proyecto interesante, próximo a encararse por nuestro grupo de trabajo.

Los fenicoles, representados por el cloranfenicol, en ensayos anteriores mostraron muy poca actividad (210, 211) o incluso resistencia (198). En nuestro estudio, el grupo demostró un perfil de susceptibilidad moderado, con diámetros de halo de inhibición de 39,70 mm para cloranfenicol y 53,45 mm para florfenicol. El comportamiento de este último, concuerda con el estudio realizado en Japón por Okayama y col., donde 28 aislamientos de *P. larvae* fueron reportados como moderadamente sensibles al antimicrobiano (209). La decisión de evaluar en forma conjunta cloranfenicol y florfenicol, se encuentra justificada en que la prohibición del cloranfenicol en animales productores de alimentos en Estados Unidos y Canadá, acentuó la necesidad de buscar un antibiótico efectivo y de amplio espectro para ser utilizado en animales destinados al consumo humano. Las modificaciones estructurales del florfenicol le han conferido ciertas ventajas relativas a seguridad y eficacia sobre el tianfenicol y cloranfenicol (162, 271). En

trabajos anteriores hemos desarrollado estudios cinéticos y de distribución de cloranfenicol, florfenicol y tianfenicol en mamíferos (163, 272, 273, 274, 275, 276). Hemos insistido en la importancia que los residuos de cloranfenicol tienen en salud pública. No se ha determinado el nivel de cloranfenicol capaz de disparar el proceso de anemia aplástica en un ser humano, pero existe coincidencia en que se trata de una patología independiente de la dosis. Solamente se requiere susceptibilidad del paciente para que una pequeña cantidad de cloranfenicol inicie el proceso nosológico. Esto genera una limitante de peso en la utilización de cloranfenicol en animales productores de alimentos y por eso su uso en este tipo de animales está prohibido en muchos países.

De desempeño similar a los glucopéptidos y cloranfenicol encontramos a nitrofurantoína, el cual ha sido citado con anterioridad, como activo frente a cepas del microorganismo (98, 198).

Para el caso de las tetraciclinas, se utilizó un disco conteniendo 30 µg de tetraciclina activa, permitiendo evaluar la susceptibilidad no sólo a tetraciclina, sino también a clortetraciclina, oxitetraciclina, minociclina y doxiciclina, entre las que existiría resistencia cruzada y susceptibilidades similares según lo establecido por la CLSI (235). En estudios donde se evaluó la susceptibilidad de cepas de *P. larvae* frente a diferentes tetraciclinas, se demostró que todas (a excepción de minociclina) son menos efectivas contra cepas oxitetraciclina-resistentes que contra cepas oxitetraciclina-sensibles (210, 220), quedando confirmada la resistencia cruzada frente a este grupo de antimicrobianos. Por otro lado, es sabido que actualmente en nuestro país, así como en otras regiones del mundo la incidencia de cepas resistentes a oxitetraciclina, resulta cada vez más elevada (63, 196, 197, 199, 200, 202). Esta situación se ve reflejada, en resultados variables de susceptibilidad, al evaluar un número significativo de cepas de orígenes geográficos disímiles (91, 202, 220). Sin embargo, estudios de resistencia a oxitetraciclina realizados en Uruguay (98, 277) y Japón (209), demuestran que los aislamientos en estos países aún no manifiestan resistencia a las tetraciclinas. En nuestro ensayo, todos los aislamientos se comportaron como sensibles a las mismas, con valores de diámetro de halo promedio de 46,37 mm. Este valor resulta intermedio entre los documentados por otros autores, frente a cepas sensibles utilizando discos homólogos (111, 220). Aducimos que nuestro resultado simplemente difiere de los estudios realizados por otros investigadores, por la cercanía geográfica de los apiarios de origen, lo que implicaría menor variabilidad de respuestas. Los hallazgos reflejan una situación específica, limitada a un sitio geográfico particular y de ninguna manera representan el perfil epidemiológico de resistencia a oxitetraciclina de nuestra provincia.

Todos nuestros aislamientos resultaron resistentes a los aminoglucósidos, (gentamicina) y a la combinación trimetoprima-sulfametoxazol (TMS), en las concentraciones ensayadas. La resistencia a los aminoglucósidos fue descrita previamente en aislamientos de Estados Unidos (210). En nuestro país, se observó que cepas de distinto origen geográfico presentaban patrones de sensibilidad diferentes (198). El único informe de susceptibilidad de *P. larvae* frente a gentamicina, fue descrito en aislamientos de Uruguay (98). Para el caso de la combinación TMS nuestros resultados no tienen discrepancias con trabajos anteriores (198, 209).

En general, los halos de inhibición para la cepa de referencia ATCC 9545, así como para las cepas de campo, resultaron notoriamente amplios frente a la mayoría de los antimicrobianos, con respecto a los valores de referencia indicativos de susceptibilidad (235). Al comparar nuestros resultados con estudios realizados a través de diversas técnicas de antibiograma, pudimos comprobar que este efecto se repite en los resultados documentados por varios autores (91, 111, 198, 202, 210, 211, 220, 268, 277). Esto, puede indicar tanto alta susceptibilidad o simplemente, representar la afectación por la lenta tasa de desarrollo de la bacteria (278). El proceso de difusión de un antimicrobiano inoculado con un microorganismo representa un fenómeno dinámico, en el cual la velocidad de difusión compite con la del crecimiento del microorganismo; cuanto más lento el crecimiento de la bacteria, más grande será el halo de inhibición. Este podría ser el caso del *P. larvae*, aunque no se cuenta aún, con adecuados estudios para desarrollar estándares reproducibles que permitan la interpretación de la prueba de difusión de discos con este microorganismo (235). Sin embargo, pequeñas zonas de inhibición o ausencia completa de halos, se pueden interpretar con fidelidad como indicativo de resistencia (278).

Destacamos la necesidad de la armonización para la realización de este tipo ensayo frente a *P. larvae*. Los estudios epidemiológicos, son una de las principales indicaciones de la prueba de antibiograma (235); ya que los resultados pueden ser considerados como el primer marcador epidemiológico del que se dispone (231). El continuo avance de la resistencia a las tetraciclinas, junto a la necesidad de contar con nuevas herramientas terapéuticas para combatir este flagelo de la apicultura mundial, lo justifican ampliamente.

IV.1.2. Prueba cuantitativa de susceptibilidad por el método de dilución en agar

Para la realización de esta prueba se eligió el método de dilución en agar, por ser considerado de referencia para la determinación cuantitativa de la actividad de los antimicrobianos (231, 232). Debido a la ausencia de estandarización, se adaptó la técnica,

siguiendo los lineamientos generales establecidos por la CLSI (235, 239). Se utilizó como medio base el agar MYPGP, que como se explicó anteriormente permite un buen desarrollo del microorganismo y repetitividad en los resultados. Se utilizaron las cepas de referencia *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213 para evaluar la metodología, a partir del contraste de los resultados obtenidos para dichas cepas con los valores propuestos por la CLSI, del mismo modo que se hizo en el ensayo de antibiograma. Esto nos permitió contar con una técnica adecuada, para la valoración cuantitativa de la susceptibilidad *in vitro* del microorganismo, frente al antibiótico seleccionado.

A partir de la prueba cualitativa, se distinguieron 3 grupos de antimicrobianos a los cuales las 11 cepas aisladas mostraron alta susceptibilidad: β lactámicos, macrólidos y rifampicina. También fue destacable la actividad de florfenicol, no así la de cloranfenicol. De actividad similar o levemente inferior a los macrólidos, podemos mencionar a las fluoroquinolonas y la clindamicina.

Los datos bibliográficos de susceptibilidad al grupo de los fenicoles y fluoroquinolonas, muestran amplias discrepancias (198, 209, 210, 211). Por otra parte, existe un aumento en la resistencia a las fluoroquinolonas en cepas aisladas a partir de muestras de origen animal, en mayor medida a partir de productos destinados al consumo humano (279), así como en infecciones nosocomiales (280). Esto convierte en un factor controversial, la utilización de estas moléculas en medicina veterinaria (281), y consideramos no apropiado continuar, por el momento, en la investigación de estas clases de antimicrobianos en apicultura.

Los β lactámicos y rifampicina también fueron descartados como potenciales fármacos frente al *P. larvae*, debido a fallas de eficacia en pruebas *in vivo* de los primeros (208, 282) y la carencia de autorización para uso veterinario por parte de la rifampicina.

Con respecto a las lincosamidas, como se mencionó previamente, existen diferencias en los patrones de susceptibilidad *in vitro* reportados (198, 209, 210). Aunque existen resultados preliminares de eficacia y seguridad *in vivo* frente a cepas oxitetraciclina-resistentes (201, 242). Sin embargo, no han mostrado ventajas competitivas frente a los macrólidos; destacando, que comparten con estos últimos, el mecanismo de acción de inhibición proteica a nivel de la subunidad 50s bacteriana. Creemos que la utilización de este tipo de antimicrobianos, sólo incrementaría las posibilidades del desarrollo de resistencias cruzadas entre ambas familias de antibióticos, compartiendo lo expuesto por Kochansky y colaboradores (211).

Hasta aquí, observamos que todas las clases de antimicrobianos activos ensayados, manifiestan carencias; ya sea en presentar actividad *in vitro* pero no *in vivo*, exhibir riesgo de

desarrollo de cepas resistentes, no resultar seguros o incluso no estar autorizados para su uso en medicina veterinaria. De esta forma, los macrólidos resultan sin duda, el grupo de elección que presenta el mayor potencial para su utilización frente a esta enfermedad actualmente.

En la prueba cualitativa, los cuatro macrólidos ensayados mostraron un perfil homogéneo, débilmente exceptuado por la azitromicina. Entre ellos, se eligió a tilosina, sobre eritromicina y tilmicosina, principalmente por las siguientes razones:

- En pruebas *in vitro*, independientemente de la metodología utilizada siempre ha demostrado alta actividad frente a cepas de *P. larvae* (111, 116, 198, 209, 210, 211, 213, 283).

- Resulta segura frente abejas adultas (206, 212) y larvas (212, 213, 284); y existen suficientes datos bibliográficos de su eficacia a campo (206, 212, 213, 213, 214, 240, 241, 242, 285, 286).

- Sus características físico-químicas y farmacocinéticas generales aventajan a eritromicina: es una base débil de pK 7,73 y muy liposoluble (129). Su sal tartrato es estable al ácido gástrico y se absorbe con facilidad desde el intestino (120). Propiedades de relevancia considerando que, debe absorberse por el canal alimentario, ser secretada a través de jalea real y ser consumida por las larvas, donde la espora germina y se convierte en bacilo vegetativo susceptible al fármaco (183).

- Cuenta con autorización para su uso en medicina veterinaria e incluso ha sido recientemente aprobada, para su utilización en apicultura en los Estados Unidos (221, 222).

- Carencia de datos farmacocinéticos para su utilización en abejas melíferas.

A partir de la totalidad de los aislamientos obtenidos, se determinó un valor de CIM₅₀ frente a tilosina de 0,03125 µg/mL y de CIM₉₀ de 0,0625 µg/mL. Para el caso de la cepa de referencia *P. larvae* ATCC 9545, la CIM se determinó en 0,0156 µg/mL. Los resultados obtenidos para las cepas de campo, coinciden con datos previos obtenidos por otros autores para un número sensiblemente mayor de aislamientos ensayados (209, 213). En el caso del estudio llevado a cabo en Japón, por Okayama y col. la CIM₅₀ para 29 cepas fue de 0,05 µg/mL y la CIM₉₀ de 0,1 µg/mL; y en el estudio realizado en la Argentina, por Alippi y col. para 67 cepas de orígenes geográficos diferentes, la CIM₅₀ resultó en 0,0625 µg/mL y la CIM₉₀ en 0,25 µg/mL. Teniendo en cuenta que estos estudios se realizan utilizando una escala discontinua (habitualmente concentraciones decrecientes en base 2), y los valores de CIM reales, se encontrarán en algún valor situado entre la concentración más baja del ensayo que inhibe el crecimiento de la bacteria, y la concentración

inmediatamente inferior (231, 237, 237); estas diferencias entre los datos publicados y nuestros hallazgos no resultan significativas. Incluso, para todos los casos las diferencias entre CIM₅₀ y CIM₉₀, no difieren en más de dos órdenes de magnitud.

Recientemente otros investigadores, han llevado a cabo ensayos de susceptibilidad *in vitro* con tilmicosina, sin obtener resultados comparativos superiores a los obtenidos con tilosina (268, 283). Siendo evaluadas 23 cepas e incluyendo especímenes oxitetraciclina-resistentes, hallaron valores de CIM₅₀ y CIM₉₀ para tilmicosina de tan sólo 0,25 µg/mL (268). A su vez, cuando se compararon los valores de CIM, CBM (concentración bactericida mínima) y la relación CIM/CBM de oxitetraciclina, tilosina, tilmicosina y lincomicina, el mejor desempeño fue acreditado al macrólido tilosina (283).

IV.2. Estudio farmacocinético

IV.2.1. Dosificación y forma farmacéutica empleada

La determinación de aplicar tilosina a una dosis de 600 mg divididos en tres administraciones por colmena, se basó en la eficacia y seguridad demostrada por la misma, en estudios a campo, sobre cepas oxitetraciclina-sensibles (212) y oxitetraciclina-resistentes a *P. larvae* (241, 242, 285). También se tuvo en cuenta, que actualmente es la dosis aprobada y recomendada en los Estados Unidos para su utilización en apicultura (222).

Se ensayó en forma piloto la administración y formulación del antimicrobiano en tres formas farmacéuticas distintas (jarabe de glucosa, azúcar finamente molida o torta medicamentosa a base de azúcar, aceite y harina de soja). Las tortas conteniendo el fármaco, resultaron en un consumo incompleto e irregular entre las colonias de abejas, coincidiendo con reportes de otros investigadores (206, 240). Consideramos que una larga permanencia del producto en la colmena, no sólo traería aparejado un perfil errático del fármaco, sino también la posible aparición de cepas resistentes, al encontrarse expuestas a concentraciones sub-inhedorias del medicamento mediante esta metodología. La subdosificación durante períodos prolongados es una de las formas más eficaces de seleccionar microorganismos resistentes y eso es lo que se estaría haciendo al administrar el antimicrobiano en forma de torta.

La administración en forma de jarabe de glucosa, resultó en un consumo más irregular aún, variando entre 1 y 10 días el tiempo necesario para la incorporación total. En algunos casos, se observó incluso, la fermentación de la formulación en el periodo inter-dosis. Asimismo, datos

bibliográficos sugieren que este método implicaría mayor riesgo de aportar altos niveles de antimicrobiano en miel (218, 287). Las drogas aplicadas como sustituto de néctar, recorrerían una vía distinta dentro del organismo de la abeja con respecto a aquellas administradas como sustituto de polen (218). El néctar proveniente de las flores, recolectado por las abejas obreras, es regurgitado desde el buche melífero con el agregado de saliva, para que otras abejas produzcan miel. De esta forma, el antimicrobiano podría ser depositado dentro de las celdas melíferas directamente, sin sufrir proceso metabólico alguno por parte del insecto.

A partir de lo anteriormente expuesto, se decidió no seguir adelante con la investigación en formulaciones factibles, adoptando la administración con azúcar molida (sustituto de polen), como la forma farmacéutica más adecuada a los fines de estudio. La misma resulta de fácil y rápida manipulación y aplicación por parte de los apicultores. El principio activo es consumido en forma completa y más rápida que con las dos formas anteriores. A su vez, las abejas no sólo se alimentan de la medicación a su conveniencia, sino que son obligadas a ingerirla durante su limpieza e incluso transferirla por la alimentación, a las larvas abiertas (214). Esto aseguraría la administración del fármaco en forma eficaz, en el sitio de infección de la colmena.

IV.2.2. Procedimiento analítico

La metodología analítica validada está basada en un método microbiológico, técnica cilindro-placa (288) modificada, que permite cuantificar la actividad inhibitoria total del complejo tilosina.

La cuantificación de residuos marcadores en tejidos seleccionados de animales, por métodos analíticos validados, es esencial para poder hacer cumplir los LMR (289). En el caso particular de la miel, la tilosina B (desmicosina) es el mayor producto final resultante de la conversión de tilosina A en medio ácido (290, 291), no siendo constante la proporción de cada uno de los metabolitos en la matriz (292). Pruebas *in vitro* frente a *P. larvae*, demostraron que tilosina y desmicosina presentan actividad inhibitoria equivalente frente al microorganismo (129, 211, 290). Esto requiere que al menos ambos metabolitos (tanto tilosina A como B) sean tenidos en cuenta al considerar la ingesta alimentaria de los mismos (219, 293). De esta forma, se concluye que tilosina A, no resulta un marcador adecuado para evaluar los residuos de tilosina en miel, a diferencia de lo que sucede con tejidos y productos derivados de pollos, cerdos, ganado de carne, leche y huevos (292).

Varios métodos analíticos fueron desarrollados para determinar residuos de tilosina en miel (133, 219, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299). Sin embargo, un ensayo adecuado para el análisis microbiológico de tilosina A más tilosina B, no se encuentra disponible (292). Según Lakritz. la determinación de antibióticos macrólidos usando ensayos microbiológicos es equivalente a la cromatografía líquida de alta resolución (300). Este tipo de ensayos, ha sido utilizado por diversos autores para determinar concentraciones residuales de tilosina en leche y otros tejidos (301, 302, 303, 304, 305), así como para la realización de estudios farmacocinéticos en diferentes especies (144, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312).

Los ensayos microbiológicos, una vez validados, se convierten en una herramienta esencial debido a la practicidad, rapidez y economía de recursos. En nuestro trabajo de investigación, hemos validado una metodología analítica adecuada y confiable que permite medir la actividad inhibitoria total del complejo tilosina, alcanzando un límite de cuantificación de 0,0156 µg/g en miel, y de 0,125 µg/g en larvas y abejas adultas. Este desarrollo es la continuación de muchos años de trabajo con metodología microbiológica para el dosaje de antimicrobianos en matrices biológicas.

IV.2.3. Efecto del nivel poblacional de la colmena sobre los parámetros farmacocinéticos y concentraciones de tilosina dosados en miel en otoño

Encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros farmacocinéticos obtenidos en abejas y en miel para los diferentes niveles poblacionales evaluados.

En abejas, la concentración tisular máxima ($C_{\text{máx}}$) fue $5,32 \pm 0,40$ µg/g en colmenas de baja población y $3,40 \pm 0,28$ µg/g en colmenas de alta población, en ambos casos presentándose al día 1 post-administración ($T_{\text{máx}}$), observándose un descenso gradual en los niveles del antimicrobiano determinado en ambos grupos a lo largo del resto del muestreo.

Las colmenas con doble cámara de cría están constituidas por una población mayor, que aquellas alojadas en una sola cámara cría. Teniendo en cuenta que el antimicrobiano fue administrado como un sustituto de polen, el consumo en este tipo de colmenas debe ser distribuido entre un número mayor de individuos. Por lo tanto, resulta lógico que las concentraciones sean menores en muestras de abejas pertenecientes a colmenas de alto nivel poblacional; explicando las diferencias estadísticamente significativas halladas en la $C_{\text{máx}}$ ($P=0,004$) entre ambas unidades experimentales. Se trata de un hallazgo importante dada la incidencia de

este parámetro farmacocinético en la implementación de planes de administración de antimicrobianos.

A su vez, el número de individuos en cada lote tuvo un efecto significativo en los parámetros ABC_{0-t} ($P=0,004$), $ABC_{0-\infty}$ ($P=0,006$) y TMR_{0-t} ($P=0,004$). En las colmenas de baja población estos parámetros resultaron mayores, sugiriendo que el fármaco está presente en elevadas cantidades y por largos períodos de tiempo en este tipo de explotaciones. En este caso, como en el de la $C_{máx}$, las diferencias en ABC_{0-t} , deben ser mencionadas como posibles responsables de diferencias en eficacia, ya que el parámetro Pk/Pd ABC/CIM es esencial en el diseño de planes de administración.

La semivida de eliminación en abejas no exhibió diferencias significativas entre grupos. Esto estaría sugiriendo que la velocidad de eliminación en la colmena, es independiente del número de individuos que la componen. No obstante, creemos que éste parámetro podría estar relacionado con factores estacionales y el estado metabólico de los insectos.

Las concentraciones de tilosina halladas en miel coincidieron a los 14 días post-administración en colmenas de alto y bajo nivel poblacional. A partir de allí, las concentraciones no declinaron significativamente hasta el día 84, donde se cuantificó 0,31 $\mu\text{g/g}$ en el lote B (bajo nivel poblacional). Debido a que la miel es un producto de secreción activa por parte de las abejas, su producción debería considerarse, una ruta principal de eliminación del fármaco. Teniendo en cuenta que las concentraciones medidas representan el pasaje desde las abejas a la miel en el lapso de tiempo transcurrido entre cada punto de muestreo, se puede observar que la tasa de eliminación es relativamente constante, disminuyendo muy lentamente a lo largo del tiempo.

En consecuencia, los resultados claramente sugieren que el nivel poblacional a la dosis ensayada, puede influenciar los niveles residuales de tilosina en miel. Este hallazgo sumado a la estabilidad del fármaco, debe ser considerado a fin de determinar el momento óptimo de aplicación, teniendo en cuenta el número de individuos por colmena. De esta manera se mejorará la eficacia y se evitará la presencia de residuos perjudiciales en productos de colmena.

La diferencia en el número de puntos de muestreo obtenidos en uno y otro lote, radicó en que los ensayos fueron llevados a cabo en años distintos; debido principalmente a la dificultad operativa de realizar ambos ensayos en forma simultánea. Los apiarios de experimentación se encontraban en las ciudades de La Plata y Verónica, distantes entre sí por 80 km. Una vez analizadas las muestras y obtenidos los resultados del primer muestreo (en colmenas de alto nivel

poblacional), observamos que los niveles de antimicrobiano alcanzados en las muestras biológicas justificaban extender el tiempo de muestreo, con el fin de alcanzar una mejor comprensión del comportamiento farmacocinético del antimicrobiano en estudio.

IV.2.4. Efecto de la época productiva sobre los parámetros farmacocinéticos e incidencia de residuos en miel

Hallamos diferencias significativas, desde el punto de vista estadístico, en los parámetros farmacocinéticos de colmenas tratadas, en primavera con aquellas tratadas en otoño.

En las abejas, la $C_{m\acute{a}x}$ fue determinada al primer día de finalizado el tratamiento en ambos lotes experimentales. El valor de $3,13 \pm 0,26 \mu\text{g/g}$ alcanzado por el lote E en primavera, resultó semejante al obtenido por las colmenas de alto nivel poblacional en otoño (lote A). Este resultado, creemos se encuentra respaldado por nuestra hipótesis inicial respecto a la distribución del consumo de la formulación, la cual consideramos dependiente del número de individuos que componen la colmena. Si bien el lote E, comenzó inicialmente siendo de bajo nivel poblacional, en el transcurso de la aplicación del quimioterápico (3 semanas), el número de individuos aumentó visiblemente, conforme avanzaba la estación y las condiciones climáticas se tornaban favorables. Esto explicaría, las diferencias estadísticas ($P=0,004$) observadas en la $C_{m\acute{a}x}$ entre grupos.

Un hallazgo de relevancia, lo constituyeron las diferencias altamente significativas ($P=0,004$) en los valores de semivida de eliminación ($T_{1/2\lambda}$) determinados en abejas. La velocidad de depuración del xenobiótico resultó 5 veces mayor, con una semivida de apenas $3,04 \pm 0,23$ días en primavera, respecto a los $15,71 \pm 2,44$ días calculados en otoño. Esto se manifiesta, a través de la pronunciada declinación de las concentraciones en tejidos de abejas del lote E, las cuales resultaron no mensurables, a partir del día 14 post-dosificación. Como fue mencionado antes, el incremento de la actividad de la colmena, basado en un lógico incremento de tasas metabólicas de las abejas, influye de manera fundamental para explicar el cambio farmacocinético mencionado.

Durante el otoño, observamos que el parámetro $T_{1/2\lambda}$ se comporta de forma independiente al número de individuos de una colmena. Sin embargo aquí, podemos evidenciar que el mismo, se haya fuertemente relacionado con la fase productiva. Es sabido, que en los períodos de otoño-invierno la reina disminuye su capacidad de postura, acompañado de un aumento en la sobrevivencia de las abejas obreras, que puede alcanzar los 60-90 días (313, 314). En este tiempo, la colonia disminuye su actividad, confinándola al interior de la colmena y reduciendo el número total de sus

habitantes (315). Creemos que estos cambios, también repercuten en la capacidad de metabolismo y eliminación del antibiótico por parte de las abejas, explicando las diferencias encontradas.

La menor capacidad de depuración, junto a las mayores concentraciones alcanzadas en otoño, indicaría que el fármaco se encuentra por largos períodos de tiempo en colmenas de bajo nivel poblacional tratadas durante este período. Esto se ve reflejado, a través de las diferencias significativas halladas en los parámetros $ABC_{0-\infty}$ ($P=0,004$), ABC_{0-t} ($P=0,004$), TMR_{0-t} ($P=0,004$) y $TMR_{0-\infty}$ ($P=0,004$).

En primavera y comienzos del verano, acompañado del crecimiento en el número de habitantes y las tareas en el exterior de la colmena, disminuye la sobrevida de las abejas a 30-45 días (314). El rango de tiempo transcurrido, entre el inicio de la dosificación hasta que las concentraciones en abejas resultaron no cuantificables, correspondió con uno o dos ciclos de la vida de las mismas (duración aproximada de 21 días). Por lo tanto, asumimos que la totalidad de los individuos evaluados tuvieron contacto con el antimicrobiano desde el inicio del tratamiento, resultando los parámetros farmacocinéticos calculados, susceptibles de comparación con aquellos determinados en otoño.

En miel, observamos que el perfil de tilosina en primavera exhibe un marcado descenso a lo largo del tiempo, a diferencia de lo que sucede en colmenas tratadas en otoño. Al día 84 de finalizada la administración, las concentraciones en los diferentes lotes, difieren aproximadamente en el doble de su valor; siendo $0,15 \pm 0,07 \mu\text{g/g}$ en el lote E (primavera) y $0,31 \pm 0,03 \mu\text{g/g}$ en el lote B (otoño). Lamentablemente no existe información concerniente a los niveles encontrados más allá de los 21-28 días post-tratamiento; ya que los trabajos referentes encontrados en la bibliografía, se limitan a un número escaso de puntos de muestreo y muy cercanos a la última dosis administrada (208, 218, 285). Consecuentemente consideramos que los datos aquí obtenidos, extendidos hasta 98 días post-tratamiento, resultan ampliamente representativos del perfil de eliminación del antimicrobiano a la miel durante esta época del año.

En el lote de primavera, probablemente se hayan alcanzado concentraciones máximas superiores a lo informado. El esquema de muestreo diseñado para este grupo de colmenas (originalmente destinado para la caracterización del perfil PK en larvas en diferentes estadios de desarrollo), no permitió evidenciar el $T_{\text{máx}}$ ni la magnitud de la $C_{\text{máx}}$ alcanzada. Sin embargo, en un trabajo previo dedicado a evaluar los niveles residuales de tilosina (285), los investigadores estimaron que las concentraciones en miel de la cámara de cría, declinaban rápidamente desde

una concentración promedio de 1,45 µg/g a 0,40 µg/g en tres semanas, a igualdad de dosis y forma farmacéutica. Considerando que nuestro valor inicial de concentración, a los 21 días, fue de $0,42 \pm 0,01$ µg/g, la precedente afirmación pudiera ser orientativa del comportamiento inicial del fármaco. Sin embargo, al no proseguir Feldalufer y col. con la recolección de muestras más allá de los 21 días, reconocemos que las diferencias metodológicas dificultan la comparación.

A diferencia de lo expuesto en el punto IV.2.3 para otoño, en primavera la tasa de eliminación del antimicrobiano a la miel no resulta constante, disminuyendo respecto del tiempo. Una explicación de esto lo constituiría el hecho que, como se mencionó anteriormente, las abejas logran deshacerse del antibiótico a una velocidad mayor a lo que sucede en otoño, siendo menor la fracción disponible a excretar (debido a un aumento de su metabolismo y disminución en la sobrevida). A su vez, la producción de miel se encuentra en su punto máximo, ejerciendo el volumen producido, un efecto de dilución sobre estas concentraciones excretadas (219, 316). Y por último, la disponibilidad del alimento fuera de la colmena, evitaría el consumo de la miel acumulada.

Por otra parte, al saber que la miel constituye la fuente primordial de alimentación de la colonia durante los periodos de escasez, en otoño-invierno estas reservas podrían constituir una fuente extra de administración de tilosina. Esto generaría, un ciclo de recirculación del antibiótico, aumentando la perdurabilidad de la molécula dentro de la colmena. Estudios futuros, serán necesarios para poder confirmar esta hipótesis.

A partir de los datos aquí presentados, podemos concluir que los parámetros PK en abejas y miel se ven sustancialmente influidos por la aplicación del tratamiento en diferentes épocas productivas, repercutiendo en los niveles residuales de tilosina en miel. Este hallazgo, probablemente constituya el factor de mayor relevancia al momento de decidir instaurar un tratamiento. Contrariamente, al supuesto de que un periodo de tiempo mayor desde la aplicación del fármaco al momento de cosecha, ampliaría el margen de seguridad; advertimos que un tratamiento aplicado en otoño podría generar un potencial nivel de residuos semejante a un tratamiento aplicado en primavera.

Estudios de niveles residuales, con un número amplio de colmenas deberán llevarse a cabo a fin de determinar el momento óptimo de aplicación, teniendo en cuenta el estado metabólico de la colmena.

IV.2.5. Efecto de la ubicación de las alzas melíferas en la colmena sobre los niveles residuales de tilosina en miel

En el lote E, durante el muestreo llevado a cabo en primavera, se obtuvieron simultáneamente muestras de miel en la cámara de cría y el alza melaria. A partir de las concentraciones calculadas, se puede apreciar que el depósito de miel en ambos compartimentos describe un perfil semejante a lo largo del tiempo.

Debido a la gran dispersión en los datos observada a partir de la segunda muestra, consideramos, que los valores equivalentes de tilosina en miel, sólo resultaron ligeramente inferiores en el alza melaria respecto a los cuantificados en la cámara de cría. Este resultado coincide con trabajos de otros investigadores (285, 287, 317), que demostraron la existencia de un patrón diferencial en el almacenamiento de miel y con ella del antibiótico administrado. Las abejas colocan las reservas primariamente, cercanas al núcleo de cría y luego en alzas superiores. Por lo tanto, al renovar nosotros los cuadros en cada punto de muestro, las abejas consecuentemente habrán colocado la miel primariamente en el cuadro de la cámara de cría y luego en el del alza melaria, explicando las diferencias encontradas.

A su vez, creemos que la dispersión en las concentraciones entre las diferentes colmenas, podría deberse al franco crecimiento de las colonias en relación a las condiciones edafológicas en esta etapa. Se considera a la primavera un momento de intenso estrés, en el cual las colmenas deben sobreponerse rápidamente. Por lo tanto, es lógico de suponer que las diferencias adaptativas individuales de cada comunidad, no resulten homogéneas y por consiguiente, la cantidad de miel producida por cada una de ellas resulte variable, reflejándose también en los niveles residuales de tilosina encontrados. Esta variabilidad entre las colmenas de un mismo lote, coincide con los hallazgos de otros autores (285, 317).

Los perfiles descritos en nuestro ensayo, difieren notoriamente con aquellos definidos por Feldlaufer y col, utilizando las mismas dosis, intervalos y forma de administración (285). Estos investigadores describen un descenso abrupto de las concentraciones, en apenas 3-4 semanas de finalizado el tratamiento, en ambas alzas. Por nuestra parte, recién a los 70 días los valores de transferencia se encuentran por debajo de los 0,16 $\mu\text{g/g}$. A partir de los datos publicados por Feldlaufer y con el fin de obtener la aprobación por parte de la FDA de tilosina para uso en apicultura, se estableció un período de retirada en 28 días (318). Creemos, que el mismo resulta desacertado, ya que no se tienen en cuenta los valores residuales totales por colmena al momento de la cosecha.

Debido a la marcada diferencia en el perfil de la colmena 4 para el alza superior (Tabla VI.41 y Figura VI.5 del Anexo), a los fines comparativos excluimos los parámetros PK calculados en esta colmena para el cálculo de la media del lote. Entre las alzas, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros calculados, a excepción del área bajo la curva concentración versus tiempo ($P=0,031$) (ABC_{0-t}), el cual creemos se encuentra influido por las diferencias en las concentraciones determinadas.

Resulta prioritario considerar, que los valores aquí determinados corresponden a períodos de excreción semanal o bisemanal, por parte de las abejas a la miel. Es decir, no es una valoración del nivel acumulativo de residuos en la colmena. Partiendo de esto, los datos sugieren que en los distintos cuadros de cada alza, las concentraciones de tilosina serán desiguales, dependiendo del orden escogido por las abejas para realizar el acopio (316). Incluso, podrán existir variaciones entre las determinaciones de ambas caras de un mismo cuadro, dependiendo de los recursos y condiciones climáticas en el momento de producción, ya que la producción de miel no es algo estable ni predecible a lo largo de la estación.

Por último, si bien se observa un patrón diferencial en el cual las abejas eligen en un primer momento el depósito de miel en el alza inferior sobre la superior (melaria); los valores de transferencia hallados, no permiten asegurar que la exclusión de cuadros de la cámara de cría en el momento de cosecha, constituya una medida realmente efectiva, en la disminución de los niveles residuales.

IV.2.6. Efecto del estado sanitario sobre los parámetros farmacocinéticos. Eficacia

No se encontraron diferencias significativas entre los parámetros farmacocinéticos determinados en colmenas con diferente estado sanitario, luego de la aplicación de 600 mg de tilosina en tres administraciones sucesivas. Esto demuestra que la infección y progreso de la enfermedad no repercute en el metabolismo del fármaco por parte de las abejas y su excreción a la miel.

El microorganismo causal ataca a las larvas y no a las abejas. Estas últimas se ven afectadas por el progreso de la enfermedad, una vez que el número de larvas muertas alcanza el umbral a través del cual se modifica el equilibrio poblacional de la colonia y con él, las funciones básicas de supervivencia. En consecuencia, pensamos que al evitar el fármaco la pérdida numérica significativa de larvas, se mantiene el equilibrio homeostático en la colonia, explicando la ausencia de diferencias en los parámetros farmacocinéticos.

Cómo es sabido, en el caso de una infección bacteriana, la cura se determina en forma bacteriológica, a través de aislamientos sucesivos negativos del microorganismo causal de enfermedad. Para el caso particular de este microorganismo, este objetivo, no es posible alcanzarse, ya que las esporas permanecen viables en las colmenas. Las esporas no son sensibles a los antimicrobianos; solamente pueden ser eliminadas por la acción de antisépticos poderosos, que también eliminarían a las abejas. Los trabajos de eficacia en este caso, se basan en la identificación de signos clínicos indicativos de recaída. Es decir que analizamos curación clínica y no curación bacteriológica. Este es un dilema importante en el terreno de la quimioterapia antibacteriana.

Si bien nuestro ensayo fue planteado de forma de evaluar las diferencias farmacocinéticas entre colmenas sanas y colmenas enfermas, se observó que las colmenas tratadas no manifestaron signos clínicos de enfermedad, superando satisfactoriamente el período de hibernación y aumentando rápidamente el número de individuos a la primavera siguiente. Incluso mantuvieron su condición sanitaria hasta un año de transcurrido el tratamiento farmacológico.

De esta forma, consideramos valederos los datos de colmenas sanas para realizar la modelización farmacocinética-farmacodinámica.

IV.2.7. Estudio farmacocinético-farmacodinámico

El esquema de muestreo planteado para el lote F, se planificó de forma tal que se pudiera analizar el comportamiento de tilosina en los integrantes de la colmena susceptibles a la enfermedad (larvas), en forma simultánea a lo que sucede en abejas y miel.

Los residuos de tilosina encontrados en miel muestran un alto pasaje del antimicrobiano administrado a esta matriz durante todo el ensayo siendo los valores medios encontrados de 0,45 µg/g.

Las concentraciones tisulares máximas ($C_{\text{máx}}$) de tilosina alcanzadas en los diferentes estadios evolutivos de las abejas fueron significativamente diferentes, siendo coincidentes las $T_{\text{máx}}$ al día 1 post-administración. En abejas, la $C_{\text{máx}}$ fue $3,44 \pm 0,31$ µg/g, en larvas adultas $1,93 \pm 0,23$ µg/g y $1,61 \pm 0,28$ µg/g en larvas jóvenes. El antimicrobiano, alcanza rápidamente el sitio de infección en la colmena, a través de la excreción en forma de jalea real y/o miel por las abejas. Las diferencias encontradas entre los diferentes estadios fácilmente pueden explicarse a través de la acumulación de tilosina en los días sucesivos, que experimentan las larvas de 5 días de vida respecto a las larvas de 2 días de vida.

La semivida de eliminación fue más corta en larvas jóvenes que en larvas adultas y abejas. Este parámetro ($T_{1/2\lambda}$) no mostró diferencias entre abejas y larvas adultas, pudiéndose considerar tasas metabólicas similares, siendo éstas, sin embargo, menores a la de las larvas jóvenes, que presentaron una velocidad de depuración del antibiótico mayor.

Con respecto al parámetro $ABC_{0-\infty}$ los valores oscilan entre 7 y 45 $\mu\text{g.d/g}$; con tiempos máximos de residencia ($TMR_{0-\infty}$) de 4 a 15 días, observándose diferencias altamente significativas entre los grupos analizados (Tabla VI.51 del Anexo).

Para tilosina el parámetro farmacocinético/farmacodinámico que mejor correlaciona la eficacia clínica, es el tiempo durante el cual las concentraciones del fármaco se mantienen por encima de la concentración inhibitoria mínima ($T > \text{CIM}$). Los parámetros calculados en este ensayo, fueron 17 días en larvas jóvenes y 40 días en larvas adultas, resultando el % $T > \text{CIM}$ entre la segunda y tercer dosis de 42,86% y 100% respectivamente. Estos datos demuestran, que el fármaco permanece el tiempo suficiente en el sitio de infección, lo que explica la eficacia terapéutica del agente antimicrobiano.

La tilosina es un antimicrobiano tiempo dependiente, es decir que su actividad antimicrobiana será óptima cuando las concentraciones del principio activo se mantengan por encima de la CIM durante, al menos, la mitad del período interdosis. El presente es un caso muy particular, en el cual las administraciones se realizan una vez por semana; las abejas van consumiendo el azúcar con la droga, y eso da lugar a concentraciones sostenidas del medicamento en las larvas y las abejas. Cuando el tratamiento se suspende, es decir luego de la tercera administración, las concentraciones se mantienen por encima de la CIM para la bacteria blanco por un tiempo prolongado. Los datos que se han obtenido a través del presente trabajo nos permiten aseverar que la eficacia de la tilosina frente a las cepas de *P. larvae* aisladas es muy elevada y que la droga debería mantener su eficacia también frente a microorganismos cuyas susceptibilidades han sido reportadas bibliográficamente (211, 213, 283),

Por otra parte, al aplicar un análisis profundo de los planes de administración antes de su implementación, seguramente tendremos más chance de éxito terapéutico, con menores posibilidades de emergencia y diseminación de cepas resistentes y una mayor seguridad del consumidor por mejor control de la presencia de residuos de antimicrobianos en miel. El plan de administración diseñado y aplicado en el presente trabajo, generó muy buenos resultados, lo que quedó corroborado a través de los parámetros PK/PD, especialmente el T/CIM . Los controles clínicos posteriores sobre las colmenas tratadas ratifican la eficacia de los planes.

IV.2.8 Modelo farmacocinético propuesto del comportamiento de tilosina dentro de la colmena

A partir de la comprensión del complejo proceso morfológico y evolutivo de las abejas a lo largo de su vida en la colonia (Figura IV.1), se modelizó el comportamiento de la molécula del antimicrobiano tras su administración en forma de espolvoreo en el interior de la colmena.

Figura IV.1: Historia de vida de la abeja obrera adaptado de "Honey bee life history" (319)

Figura IV.2: Esquema representativo del comportamiento de la molécula de tilosina en la colmena durante las diferentes épocas productivas

Referencias del esquema farmacocinético

Sitio de administración: La formulación se coloca sobre los cabezales de los marcos de cría de cada colmena de experimentación. En caso de contener doble cámara de cría, la administración se realiza en el alza inferior de las mismas (Figura II.7 de Materiales y Métodos). La formulación es consumida por la población de abejas jóvenes y/o adultas, como sustituto de polen (k_{abs1} y k_{abs2}). La distribución del consumo entre los dos grupos mencionados, estará condicionado por la fase productiva y la flora presente.

1-Abejas adultas de +21 días de vida (pecoreadoras): Período desde la primera salida de pecoreo hasta la muerte. Se ocupan de la recolección de néctar y polen que sirven de común alimento, propóleos y agua durante las estaciones favorables. Durante los períodos de otoño-invierno sus salidas de la colonia se van reduciendo hasta resultar nulas durante la hibernación.

2-Abejas jóvenes de 0-21 días de vida (nodrizas): Período desde el nacimiento del insecto perfecto hasta la primera salida de pecoreo. Estas jóvenes obreras permanecen en las colmenas ocupándose de los cuidados interiores: preparan y distribuyen el alimento de las larvas; mantienen la temperatura de la colonia, ventilan para renovar el aire y evaporar la miel recién puesta; cuidan de la reina y la alimentan; custodian la piquera, evitando la entrada de otros insectos; fabrican la cera y construyen o reparan el panal si fuese necesario, etc. (5).

El efecto de la edad, resulta de gran importancia en la ejecución de los diferentes trabajos por las obreras, denominándose polietismo de edad. Sin embargo, en la actualidad se cree que toda abeja es capaz de cumplir las diferentes tareas necesarias a la colonia, y existe una plasticidad comportamental muy grande. Por lo tanto, las necesidades del momento regulan verdaderamente la actividad de las abejas, no resultando en un esquema rígido el ejercicio de los diferentes oficios (314).

3-Miel: Como fue descripto en la introducción, las abejas pecoreadoras recolectan néctar de las flores o de secreciones de partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos succionadores de las mismas, que acarrean a la colmena donde se produce la miel. El néctar recién recogido se distribuye, entre un gran número de integrantes de la colmena; éstos lo regurgitan repetidamente en forma de gotitas diminutas, mezclándolo con secreciones glandulares y exponiéndolo al aire caliente de la colmena (con lo que sufre una concentración por pérdida de agua), para finalmente, ser depositado en una celda abierta, donde se concentra más aún.

El estómago de las abejas, es únicamente un saco de recolección, y lo introducido y contenido en él pertenece al conjunto de la colmena. Cuando la abeja tiene hambre, abre la válvula que enlaza el estómago social con el resto del conducto digestivo, pudiendo su contenido ser aprovechado para la nutrición del propio individuo. La mayor parte de lo recolectado lo entrega, al llegar a la colmena, para la alimentación de la comunidad.

A modo de ejemplo, una abeja debe visitar de 1000 a 1500 flores de trébol para llenar su estómago. A su vez, el mismo no es más grande que la cabeza de un alfiler, por lo que debe llenarlo en las flores y descargarlo en la colmena unas sesenta veces para reunir la miel que cabe en un dedal ($2,4 \text{ cm}^3$). Lo deslumbrante del trabajo de las obreras de una colonia queda demostrado en la capacidad de almacenar hasta un kilogramo de miel en un día, cuando el tiempo es favorable (320).

En esta descripción del proceso de formación de miel en primavera-verano, la molécula de tilosina alcanzaría la miel a través de las secreciones glandulares de las abejas jóvenes que han consumido la formulación como sustituto de polen. Otro aporte podría estar dado, por los restos presentes (de la formulación) en la superficie corporal de las abejas, que al circular de un punto a otro de la colmena, arrastrarían consigo la molécula del fármaco desde los cabezales de los marcos de cría hasta las celdas de depósito de miel (K_{23}).

Cuando las condiciones climáticas resultan adversas, la colonia se mantiene en el interior de la colmena, alimentándose todas las abejas obreras (jóvenes y adultas) de la miel y el polen almacenados en primavera-verano (K_{32}). En este caso las abejas adultas, no tienen la opción de cubrir sus demandas nutricionales con néctar y polen del exterior, libres del antimicrobiano (k_{31}), pudiendo reincorporar tilosina.

La tilosina, pierde muy lentamente su actividad antimicrobiana en la matriz de la miel. Por lo tanto, la cosecha constituye la principal vía de eliminación del antimicrobiano de la colonia (k_{30}).

4-Huevo (de 0-2 días de vida): Período de la fase evolutiva, en el cual la alimentación es únicamente a base de jalea real, producto de la secreción de las glándulas hipofaríngeas y mandibulares (314), de las abejas nodrizas (k_{24}).

5-Larva joven (de 2-5 días de vida): En este estadio, las larvas ya reciben una alimentación más grosera, constituida por una mezcla de saliva, polen y miel (k_{25}). Durante esta fase resultan sensibles a la infección por esporas de *P. larvae*.

6-Larva adulta (de 5-6 días de vida): Estas larvas continúan alimentándose a base de polen, miel y saliva (k_{26}) hasta el hilado del capullo y comienzo de la metamorfosis. Ya en este estadio, resultan resistentes a la infección por esporas de *P. larvae*. Sin embargo, en caso de haber contraído la enfermedad en los días anteriores, la bacteria en su forma vegetativa estaría comenzando su dispersión desde el tracto gastrointestinal a los diferentes tejidos; y originando la septicemia que finalmente conduce a la muerte de la larva en estado de pre-pupa o pupa.

Cada larva recibe durante su crianza entre 10 a 100 visitas por hora de sus nodrizas. Algunas de estas visitas son de simple inspección, otras van acompañadas de una distribución del alimento. Antes de la operculación, el peso de las larvas aumenta hasta alcanzar más de quinientas veces el peso inicial, teniendo lugar cuatro mudas con la celda abierta(314). A esta

altura del desarrollo, la larva no sólo ingeriría cantidades mayores de antimicrobiano a través del alimento, sino que también acumularía concentraciones consumidas en los días anteriores.

7-Pupas o Ninfas (de 12-13 a 21 días de vida): Estadío sin alimentación. Al final del desarrollo, la larva, aislada en su celda por una tapa de cera porosa (opérculo), teje un capullo de seda, descansa y muda por última vez. Después sufre metamorfosis, rasga el opérculo de su celda y sale (314). Al emerger de la celda y en su primer vuelo fuera de colonia, elimina sus excretas (K_{el3}).

IV.3. Estudio de estabilidad

IV.3.1. Estabilidad de tilosina en miel *in vitro*

El ajuste lineal de los datos, considerando un modelo de velocidad de reacción de orden cero, resultó altamente significativo ($P < 0,001$), independientemente de la temperatura de almacenamiento.

Estudios llevados a cabo en soluciones acuosas ácidas (291), así como en jarabe de sacarosa al 50% (133), demuestran que en las mismas la degradación de tilosina A, se rige por una cinética de pseudo-primer orden o primer orden (133). Consideramos que estos datos no resultan comparables, ya que en este estudio, se evalúa la pérdida de actividad antimicrobiana del complejo tilosina y no la degradación de cada uno de sus metabolitos en forma individual y/o conjunta. Así mismo, varios estudios demuestran que las semividas de eliminación de los antimicrobianos en jarabe son más cortas que las determinadas en miel (290, 321, 321).

Se pudo determinar la asociación entre la constante de velocidad de la reacción (K) y la temperatura aplicando la ecuación de Arrhenius. Lógicamente, el aumento de la temperatura de almacenamiento da lugar a una degradación más rápida del complejo tilosina en miel. Los resultados permitieron determinar semividas de eliminación para 1 $\mu\text{g/g}$ de 397, 599 y 974 días a 35°C, 20°C y 4°C respectivamente. Estos valores indican que el antimicrobiano es altamente estable incluso en condiciones de temperatura similares al interior de la colmena. La semivida de más de un año a 35°C y 20°C, se asemeja a la calculada por otros autores (290, 322) y resulta considerablemente más extensa que la documentada para eritromicina (323).

Si bien la degradación a temperatura de colmena resulta 1,5 veces mayor que a temperatura ambiente, la lenta tasa de eliminación impide fijar un tiempo aceptable de permanencia en la misma, de forma de evitar la presencia de residuos al momento de la cosecha.

A su vez, la pasteurización a 65°C, como alternativa tecnológica para disminuir los niveles de tilosina no resulta una práctica viable.

IV.3.2. Estabilidad de tilosina en miel *in vivo*

Desafortunadamente y por razones ajenas al experimento, obtuvimos muestras previas a la cosecha, únicamente en el lote de alto nivel poblacional tratado en otoño (lote A) y en el lote de bajo nivel poblacional medicado en primavera (lote E).

En el lote A, sólo en dos de las seis colmenas se hallaron vestigios de tilosina. A una dosis de 600 mg, encontramos un nivel residual promedio en las alzas melarias, estimado en $0,16 \pm 0,02$ µg/g a los 371 días de finalizado el tratamiento. Este resultado podría explicarse a través de la posible transferencia de miel entre la cámara de cría y el alza melaria por parte de las abejas (287), sumado a la alta estabilidad del antimicrobiano en la matriz (290).

Sin embargo, nosotros creemos que niveles residuales mayores podrían hallarse en colmenas de bajo nivel poblacional. En las mismas, el pasaje del antimicrobiano a la miel se produciría por periodos más prolongados de tiempo, producto de las elevadas concentraciones alcanzadas y la mayor permanencia observada en abejas.

En el lote E se obtuvieron muestras de miel del alza melaria, correspondientes a cuadros no utilizados con anterioridad, considerados testigos. Se hallaron concentraciones equivalentes de tilosina en 5 de 6 colmenas evaluadas, determinándose un valor promedio de $0,22 \pm 0,10$ µg/g a los 126 días del tratamiento.

No han sido fijados LMR para antimicrobianos en miel (225, 324). En el caso de considerar un nivel de consumo de 1,5 Kg per cápita por año en países como Alemania, Japón y Estados Unidos (considerados los mayores consumidores)(325); nuestro valor de 0,16-0,22 µg/g de residuos de tilosina, representaría una ingesta de aproximadamente 0,67-0,92 µg/día. Este consumo representa sólo el 0,18-0,23% de la IDA microbiológica establecida en 6 µg/Kg (177). Como una conclusión lógica, los niveles en el orden de los 0,67 a 0,92 µg/día, consecuencia del tratamiento aquí descripto, no constituirían un riesgo para la salud pública.

Sin embargo, Canadá ha impuesto un WRL (Límite máximo de trabajo) para tilosina de 0,06 µg/g (326), como el nivel por debajo del cual se considera que no existe riesgo indebido para la salud humana. Queda así demostrado, la existencia de discrepancias entre los entes regulatorios internacionales y la necesidad de estándares unificados para proteger al consumidor.

Por otra parte, nuestro país es netamente exportador, siendo nuestra producción sometida a constantes y rigurosos controles a cargo de los países importadores. La Comunidad Europea representa nuestro principal destino, y en ella rige una política de “residuos cero”. La estabilidad de los bajos niveles de tilosina (y probablemente otros antimicrobianos) en miel garantizará, que si una colmena es tratada incluso en otoño, contará con residuos de antibiótico al momento de la cosecha. La situación de los países exportadores debe ser cuidadosamente considerada, de otra forma la miel será rechazada independiente mente de la concentración de residuos que presente y el tiempo transcurrido desde la aplicación del zoterápico. Es responsabilidad de los países productores efectuar tratamientos medicamentosos en consideración de buenas prácticas de utilización, muy especialmente en el caso de los antimicrobianos. Los técnicos y productores con responsabilidades en el área deben estar bien entrenados en el uso racional y prudente de medicamentos. Los países importadores, por su parte, deberían colaborar con pautas y regulaciones claras que permitan intercambios comerciales fluidos de productos sanos y de excelente calidad.

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

Los datos generados en este estudio demostraron que:

Tilosina es rápidamente consumida y transferida a las larvas de abejas, alcanzando concentraciones por encima de la mínima efectiva, durante un periodo de tiempo adecuado, para lograr eficacia terapéutica.

El nivel poblacional y el estado metabólico de la colonia al momento de la aplicación del quimioterápico resultan variables importantes que modifican el comportamiento farmacocinético en abejas y el nivel de residuos resultantes en miel.

El estado de enfermedad no produce diferencias significativas en los parámetros farmacocinéticos determinados en abejas y miel, resultando representativos los estudios realizados en colmenas sanas.

El plan de administración aplicado en este estudio resultó eficaz, lo que fue corroborado a través del control de la condición sanitaria del lote enfermo-tratado hasta un año luego de la administración del quimioterápico.

A la dosis ensayadas se detectan residuos del antimicrobiano luego de transcurrido un año de la aplicación. Sin embargo, esos niveles residuales pueden considerarse seguros en función de la IDA microbiológica determinada para tilosina.

La estabilidad del complejo tilosina en miel requiere de medidas adecuadas de reglamentación respecto de los niveles máximos permitidos.

El presente estudio permitió diseñar un modelo de disposición de tilosina en el sistema colmena-larva-abeja-miel. Mediante el mismo, se pudo determinar el flujo de tilosina en función del tiempo a través de los diversos compartimentos considerando diferentes variables (estación del año, nivel poblacional, estado sanitario).

A partir de este estudio se podrá a futuro desarrollar diversos esquemas terapéuticos con otros agentes antibacterianos, aplicando pautas farmacocinéticas/farmacodinámicas para el uso prudente de los antimicrobianos.

VI. ANEXO

VI. ANEXO

VI.1. MICROBIOLOGÍA

VI.1.1. Preparación de soluciones y medios de cultivo

Agar MYPGP (75):

Es un medio de cultivo semiselectivo enriquecido para *P. larvae*

Fórmula en gramos por litro:

Extracto de levadura	15
Caldo Müller-Hinton	10
Glucosa	2
K ₂ HPO ₄	3
Piruvato de sodio	1
Agar	20

La glucosa se incorpora al medio de cultivo, una vez esterilizados el resto de los componentes, a partir de una solución stock al 50% (p/v) estéril. Se transfiere el medio fundido a placas de Petri y una vez solidificado, se siembra por estría e incuba a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Luego de 3-4 días se evalúa el desarrollo bacteriano.

Agar BHI con agregado de tiamina (69)

Se utiliza una base comercial de agar infusión-cerebro-corazón para preparar el medio de cultivo que se esteriliza en autoclave. Una vez retirado y aún fluido a 50°C se adiciona tiamina desde una solución stock conteniendo 1mg/mL del compuesto en su forma clorhidrato y esterilizada por filtración, con el fin de alcanzar una concentración final de tiamina en el medio de cultivo de 0,1 mg/L. Se debe ajustar el pH del cultivo a 6,6 con el agregado de ácido clorhídrico. Se agita para lograr homogeneización y se transfiere a placas de Petri.

Solución stock de ácido nalidíxico (70)

Se agrega 0,3 g de ácido nalidíxico en 2 mL NaOH 1 N y se diluye hasta 100 mL con buffer fosfato 0,01 M o agua (solución stock). Se esteriliza por filtración y conserva bajo refrigeración.

Estándar de Mc Farland (237)

Suspensión de sulfato de bario que se utiliza como patrón de turbidez. El estándar de Mc Farland de 0,5 tiene una turbidez comparable a una suspensión bacteriana que contiene $1-2 \times 10^8$ UFC/mL.

Fórmula en mililitros por centilitro:

BaCl ₂ 0,048 M (1,175% p/v BaCl ₂ .2H ₂ O)	0,5
H ₂ SO ₄ 0,18 M (0,36 N) (1% v/v)	99,5

La densidad correcta del estándar se deberá verificar usando un espectrofotómetro. La absorbancia a 625 nm debe ser entre 0,08 a 0,10.

La solución se distribuye en alícuotas de 4-6 mL dentro de tubos similares a los usados para la preparación de los inóculos y se mantienen almacenados a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Los tubos se deben sellar estrechamente al ser preparados, para evitar la evaporación de la suspensión. Se debe reemplazar o verificar la confiabilidad de los estándares mensualmente; descartando los que presenten alguna evidencia de evaporación.

VI.1.2. Técnicas microscópicas para observación de *P. larvae* a partir de restos larvales y colonias bacterianas aisladas

Técnica de la gota pendiente modificada (76)

La técnica se basa en detectar las esporas de *P. larvae* que se caracterizan por presentar movimiento Browniano, mientras que las esporas y células vegetativas de otras especies bacterianas asociadas con la Loque Europea u otras enfermedades permanecen fijas al cubreobjetos. Ocasionalmente, algunas esporas bacterianas pueden aparentar cierto movimiento, entonces es importante considerar el tamaño de las mismas. *P. larvae* es la especie patógena de abejas que posee esporas más pequeñas, aproximadamente 0,6-0,8 µm X 1,3-1,5 µm (71).

Colorante:

Solución A: fucsina básica 0,3 g + etanol (95%) 10 mL

Solución B: ácido fénico 5 g + agua destilada 95 mL

A partir de mezclar A + B en partes iguales se obtiene fucsina fenicada de Ziehl.

Técnica:

Se prepara un frotis sobre un cubreobjetos a partir de restos larvales con síntomas sospechosos homogeneizados con una gota de agua destilada. Se fija por calor sobre la llama de un mechero y se tiñe con fucsina fenicada de Ziehl por 20-30 s, el exceso se lava. Se coloca aceite de inmersión en un portaobjeto y mientras el preparado todavía se encuentra húmedo, se coloca sobre el portaobjetos boca abajo. Se observa al microscopio con objetivo de inmersión, colocando previamente una gota de aceite entre el cubre y el objetivo. Se debe observar en aquellas áreas donde el agua queda retenida entre los paquetes de aceite.

Tinción simple (76)

Se prepara un frotis de manera similar a la anteriormente descrita, pero sobre un portaobjetos y se fija a la llama. Se colorea con fucsina fenicada durante 30 s. El exceso de colorante se elimina por lavado y se examina al microscopio empleando objetivo de inmersión para diferenciar las esporas bacterianas por su morfología.

Tinción de Gram

Esta tinción es de preferencia sobre la tinción de nigrosina para identificar morfológicamente al *P. larvae* y diferenciarlo de otras especies de *Bacillus* (89).

Reactivos:

-Cristal violeta:

Solución A: cristal violeta 2 g + etanol 95% 20 mL.

Solución B: oxalato de amonio 0,8 g + agua destilada 100 mL.

Mezclar A + B. Dejar 24 h. Filtrar con papel de filtro.

-Lugol: I₂ 5 g + IK 10 g + agua destilada c.s.p. 300 mL.

-Decolorante: alcohol etílico 95% o acetona

-Safranina:

Solución stock: safranina (CI: 50240) 2,5 g + alcohol etílico 95% 100 mL.

Solución de trabajo: sol. stock 10 mL + agua destilada 90 mL.

Técnica:

Se prepara un frotis y se cubre completamente el portaobjeto con cristal violeta. Se deja actuar 60 s y transcurrido el tiempo se lava por 5 s con agua corriente. Posteriormente, se cubre el portaobjeto con lugol y se deja actuar 5 s. Se agrega el decolorante, hasta que el color azul-violeta desaparezca del preparado. Como en el paso anterior, se lava con agua por 5 s. Se cubre con safranina, se deja actuar 1 min y se lava con agua para remover el exceso de colorante. Se deja secar suavemente con papel o dejar secar al aire antes de examinar al microscopio (70, 76).

VI.1.3. Pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de la especie de *P. larvae*

Catalasa (69, 70)

Es útil para una rápida diferenciación de *P. larvae* de otras especies de *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Brevibacillus* (228). La mayoría de los bacilos esporulados, aerobios incluyendo *P. alvei* son catalasa positivos.

Con el ansa de siembra se recoge el centro de una colonia pura de 24-48 h y se coloca sobre un portaobjetos limpio de vidrio. Se agrega con gotero o pipeta Pasteur una gota de H₂O₂ al 3% sobre el microorganismo y se observa la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).

Si se invierte el orden del método (extender la colonia sobre el agua oxigenada) pueden producirse falsos positivos.

P. larvae es catalasa negativo o débilmente y tardío positivo (263).

Hidrólisis de caseína (78)

Evalúa la característica de alta concentración de enzimas proteolíticas que se producen durante el crecimiento vegetativo y la esporulación del microorganismo.

Se ensaya utilizando agar leche suplementado con tiamina (20 g agar, 10 g extracto de levadura, 1000 mL agua destilada, esterilizado a 121°C/15 min). A cada 70 mL de medio enfriado a

50°C se le agregan 30 mL de leche descremada y 1,5 mL de solución de tiamina al 0,1% esterilizada por filtración. Las placas se siembran por estría y se incuban por 5 días a $36\pm 1^\circ\text{C}$.

P. larvae produce hidrólisis de caseína, observándose zonas claras alrededor de las colonias.

Reducción de nitratos a nitritos (69)

Se usa el medio BHIT con el agregado de nitrato de potasio (1-2 mg/L de medio). Luego del desarrollo de colonias, la adición de reactivo de Griess produce coloración roja si el nitrato se redujo a nitrito.

Primariamente se consideraba que este microorganismo reducía los nitratos a nitritos (327), pero se confirmó la existencia de cepas negativas a esta prueba (229, 328). Actualmente se considera que dan reacción positiva el 50-84% de las cepas (71).

Hidrólisis de almidón (77)

Se modificó la técnica descripta por la OIE (329), utilizando en este caso el medio MYPGP en lugar del agar J descripto por Gordon (77).

Se suspende 1 g de almidón de papa en 10 mL de agua destilada fría; se mezcla con 100 mL de medio MYPGP sin glucosa, autoclavado y enfriado a 45°C. Se agita suavemente para lograr homogeneidad y se coloca en placas de Petri. Luego de permitir la evaporación del exceso de humedad, se siembran las placas por duplicado e incuban por el lapso de 5 a 10 días. Transcurrido este tiempo, se inundan las placas con solución iodada de Gram y luego de 15-30 min, el almidón no degradado se vuelve blanco y opaco.

P. larvae no hidroliza el almidón.

Crecimiento y supervivencia en caldo nutritivo (77)

Se realiza la inoculación de la bacteria en caldo nutritivo (3 g extracto de carne, 5 g peptona, 1000 mL agua destilada) y se incuba hasta que se produzca el crecimiento o por 14 días. Si el cultivo crece, se transfiere una ansada a otro tubo con caldo nutritivo. Este procedimiento se repite seriadamente hasta 10 transferencias o hasta que el crecimiento no se produzca. Sólo cultivos que sobreviven 10 transferencias sucesivas se consideran aptos a crecer en caldo nutritivo.

P. larvae no soporta transferencias sucesivas en caldo nutritivo, por lo contrario *P. pulvificiens* puede crecer de rutina en este medio, siendo este ensayo diferencial para las dos subespecies.

Crecimiento en agar citrato de Simmons (62, 90)

Se evalúa usando un medio semisólido selectivo sin glucosa pero suplementado con citrato de sodio (medio citrato de Simmons); que sirve para demostrar la capacidad de las bacterias de utilizar el citrato como única fuente de carbono. Contiene azul de bromotimol como indicador de pH, dando color azul (positivo) en presencia de pH alcalino.

El medio se esteriliza en tubos (5 mL/tubo en pico de flauta) y se inocula con un cultivo joven del microorganismo en estría y por punción. Después de 14-21 días de incubación se evalúa la utilización del sustrato.

P. larvae no utiliza el citrato de sodio, conservando el color verde original del medio de cultivo y ausencia de desarrollo bacteriano.

Producción de indol (71, 91)

Se siembra en medio SIM (3 mL/tubo) por punción y en superficie con un cultivo joven del microorganismo (3-4 días) y se incuba 24-48 h hasta desarrollo bacteriano visible. El indol es el metabolito resultante de la degradación bacteriana del triptófano, que ante el agregado de 0,5 mL de reactivo de Kovacs, se pone de manifiesto por combinación con el p-dimetilamino benzaldehído y la formación de un compuesto de color rojo/fucsia en la superficie del medio de cultivo. En un resultado negativo no hay modificación de color en la superficie.

P. larvae es indol negativo.

Producción de diacetilo (Voges- Proskauer)(62, 71, 88, 90)

Sirve para determinar la capacidad que poseen algunos microorganismos de producir un producto final neutro, el acetil metil carbinol (acetoína), a partir de la fermentación de la glucosa.

Se siembra el microorganismo en caldo RM/VP (2mL/tubo), se incuba 24-48 h hasta crecimiento visible y luego se revela con un reactivo compuesto por α -naftol (0,6 mL) + OHK (0,2 mL). En primer lugar se debe colocar el α -naftol y luego el OHK. Agitar cuidadosamente para exponer el medio al oxígeno, dejar reposar y luego leer. La lectura se realiza a los 15-30 min de

colocados los reactivos. La acetoina se convierte en diacetilo, el α naftol actúa como catalizador para revelar un complejo de color rojo, formado por diacetilo y creatina proveniente del catabolismo de las peptonas. Un resultado positivo se observa por un viraje de coloración en la superficie del medio de cultivo al rojo. Con un resultado negativo no hay formación de color.

P. larvae es Voges-Proskauer negativo

Licuefacción de gelatina (77)

Se inoculan los cultivos en tubos conteniendo gelatina (120 g gelatina, 1000 mL agua destilada, pH 7.0), que se incuban a 28°C y se controlan por licuefacción a intervalos de 3-4 días por 4 semanas. Antes de evaluar, los cultivos deben colocarse a 20°C por aproximadamente 4 h para permitir solidificar la gelatina no modificada.

P. larvae produce licuefacción de gelatina.

VI.1.4. Diferenciación de *P. larvae* de otros microorganismos presentes en el apiarioTabla VI.1: Diferenciación entre bacterias esporuladas comúnmente presentes en material de apiario adaptado de "*Bacterial diseases*" (71)

Característica	<i>P. larvae</i>	<i>P. larvae</i> (ex <i>pulvifaciens</i>)	<i>P. alvei</i>	<i>P. apiarius</i>	<i>B. laterosporus</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. licheniformis</i>
Posición de espора	C/ST	ST/C	C	C	CL	CL/T	C	C	C
Gram	+	+	v	+	V	+	+	+	+
Catalasa	-	+*	+	+	+	+	+	+	+
Caldo nutritivo	-	+	+	+	+	+	+	+	+
V-P	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Reducción de Nitratos	+&	v	-	+	+	-	+	-	+
Indol	-	-	+	-	+&	-	-	-	-
Hidrólisis de Almidón	-	-	+	+	-	+	+	-	-

C: central, ST: subterminal, CL: centrolateral, +*reacción débil retardada, &: entre 50-84% de las cepas son positivas, v: variable entre cepas

Tabla VI.2: Síntomas comparativos de las principales enfermedades de la cría de abejas adaptado de
"Diagnosis of honey bee diseases" (69)

Síntomas	Loque Americana	Loque Europea	Cría Sacciforme	Cría Yesificada
Aspecto del cuadro de cría	Cría salteada. Larvas muertas en celdas operculadas y celdas desoperculadas por las abejas. Opérculos hundidos, agujereados y oscurecidos.	Cría salteada. Larvas muertas en celdas abiertas y algunas larvas muertas en celdas operculadas. En estadios avanzados opérculos hundidos y agujereados.	Cría salteada. Larvas muertas en celdas operculadas. Opérculos perforados frecuentemente con 2 agujeros.	Larvas muertas en celdas abiertas y en celdas operculadas.
Edad de la cría muerta	Prepupas y pupas en posición vertical.	Larvas jóvenes (cría abierta), a veces prepupas y pupas.	Larvas selladas y prepupas en posición vertical. Ocasionalmente larvas sin opercular.	Normalmente, larvas selladas en posición vertical.
Color de la cría muerta	Castaño claro, castaño oscuro o negro.	Blanco amarillento a castaño o castaño oscuro.	Grisáceo o amarillento, con el tiempo castaño, gris oscuro o negro. Extremo de la cabeza más oscura.	Blanco tiza. Algunas veces moteado de negro.
Consistencia y olor de la cría muerta	Blanda, ligeramente viscosa, con el tiempo se torna pegajosa estirándose en forma de hilos. Olor a cola de carpintero.	Blanda y acuosa, luego pastosa y granular. Raramente viscosa y pegajosa. Olor ácido a pútrido.	Acuosa y granular, el epitelio forma un saco. Ningún olor a ligeramente ácido.	Acuosa a pastosa en estadios iniciales. Yesosa, momificada. Olor leve a ligeramente ácido.
Escamas	Tendidas uniformemente en la cara inferior de las celdas. Adheridas firmemente a la pared. Glosa pupal puede estar presente, la cabeza permanece tendida. Color Castaño oscuro a negras	Enroscadas en el fondo de las celdas, a menudo retorcidas en forma irregular. No se adhieren a las celdas. Blandas, gomosas. Castaño claro a castaño oscuro.	Cabeza curvada hacia el centro de la celda. Textura rugosa. No se adhieren a las celdas. Negras.	Quebradizas, pétreas. No se adhieren a las celdas. Tiza, moteadas de negro o gris.

VI.1.5. Prueba cualitativa de susceptibilidad por el método de difusión de discos

Tabla VI.3: Valores de diámetro de halo de inhibición expresados en mm, obtenidos a partir de las cepas de referencia sembradas en medio MYPGP frente a los 20 antimicrobianos ensayados

ANTIBIÓTICO		CEPAS DE REFERENCIA		
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. larvae</i> ATCC 9545
Penicilina G 10 µg	MEDIA DE	6,00 0,00	37,17 1,04	77,83 0,76
Ampicilina 10 µg	MEDIA DE	15,93 0,55	39,83 0,76	68,90 1,31
Amox/Clavulánico 20/10 µg	MEDIA DE	19,80 0,44	39,90 0,79	68,83 1,89
Ceftiofur 30 µg	MEDIA DE	26,63 1,46	29,67 1,53	74,47 1,50
Teicoplanina 30 µg	MEDIA DE	6,00 0,00	20,37 0,60	38,57 2,21
Vancomicina 30 µg	MEDIA DE	6,00 0,00	18,27 1,17	34,43 0,60
Gentamicina 10 µg	MEDIA DE	16,23 0,25	21,70 1,54	16,27 2,72
Eritromicina 15 µg	MEDIA DE	6,00 0,00	29,77 1,66	60,50 2,29
Azitromicina 15 µg	MEDIA DE	18,23 0,93	24,17 1,11	47,77 2,25
Tilmicosina 15 µg	MEDIA DE	9,07 0,12	26,27 1,10	56,50 1,80
Tilosina 5 µg	MEDIA DE	6,00 0,00	17,87 0,71	48,43 2,10
Tilosina 15 µg	MEDIA DE	6,00 0,00	22,60 0,87	59,30 1,57
Tilosina 30 µg	MEDIA DE	6,00 0,00	24,43 0,81	62,33 1,53
Tetraciclina 30 µg	MEDIA DE	23,77 0,21	32,23 0,75	64,63 0,64
Ciprofloxacina 5 µg	MEDIA DE	31,00 0,50	30,73 0,25	39,80 2,70
Enrofloxacin 5 µg	MEDIA DE	31,37 1,43	34,90 0,36	46,10 2,26
Trim./Sulfam. 1,25/23,75 µg	MEDIA DE	24,03 1,84	22,65 0,49	6,33 0,58
Florfenicol 30 µg	MEDIA DE	23,20 0,66	27,60 1,44	53,67 1,53
Cloranfenicol 30 µg	MEDIA DE	22,73 1,14	24,50 1,32	41,33 2,18
Nitrofurantoina 300 µg	MEDIA DE	20,63 0,65	20,17 0,86	41,90 0,66
Rifampicina 5 µg	MEDIA DE	9,57 0,51	32,00 1,00	60,83 2,47
Clindamicina g	MEDIA DE	6,00 0,00	28,33 2,08	50,33 1,53

Tabla VI.4: Valores de diámetro de halo de inhibición (mm) obtenidos de los aislamientos de colmenas enfermas frente a los diferentes antimicrobianos evaluados

ANTIBIÓTICO		CEPAS DE CAMPO*										
		BS1	BS2	BS3	BS4	BS4	C13	C14	C15	C16	C17	C18
Penicilina G 10 µg	MEDIA	75,83	75,17	77,17	76,33	73,73	76,67	73,33	74,13	73,33	77,33	66,50
	DE	1,04	1,26	0,76	0,58	1,10	1,53	2,52	0,76	1,15	1,15	1,32
Ampicilina 10 µg	MEDIA	64,77	64,20	70,67	67,83	69,47	68,77	68,30	67,67	63,67	60,50	67,47
	DE	0,68	0,35	0,58	0,76	0,50	1,37	0,75	1,53	1,53	1,32	1,36
Amox/Clavulánico 20/10 µg	MEDIA	63,83	62,33	64,17	65,17	66,83	62,23	65,20	65,43	68,07	68,83	68,00
	DE	1,04	1,53	1,61	0,91	1,26	1,37	1,59	2,21	1,90	1,89	2,65
Ceftiofur 30 µg	MEDIA	72,17	71,27	73,77	73,50	73,33	74,33	69,67	67,50	69,17	71,03	70,13
	DE	0,76	1,10	1,12	1,32	1,61	2,08	3,88	2,50	1,04	1,79	0,81
Teicoplanina 30 µg	MEDIA	36,77	34,97	39,33	41,17	38,33	40,53	39,33	37,83	40,50	39,17	39,27
	DE	0,40	1,05	0,58	2,02	1,53	3,93	2,75	2,75	3,04	1,04	2,05
Vancomicina 30 µg	MEDIA	35,23	29,70	34,67	39,13	36,37	32,13	35,00	33,67	35,60	35,00	36,83
	DE	1,55	2,38	1,53	1,10	1,52	4,05	2,00	2,52	1,64	1,20	1,89
Gentamicina 10 µg	MEDIA	15,77	16,50	14,40	18,43	16,47	17,67	16,27	16,27	16,00	15,90	16,17
	DE	1,08	1,32	0,53	1,91	0,50	2,08	1,42	1,62	1,18	0,56	0,76
Eritromicina 15 µg	MEDIA	56,50	58,27	56,70	58,23	58,57	60,17	59,10	59,57	61,67	59,83	59,67
	DE	1,50	1,17	2,04	1,57	1,36	1,04	1,15	1,36	3,06	2,02	1,61
Azitromicina 15 µg	MEDIA	46,50	46,00	47,33	48,83	45,00	45,73	48,83	48,50	45,77	49,77	48,77
	DE	1,32	1,73	1,53	1,26	1,00	3,72	0,76	1,80	1,37	1,97	2,25
Tilmicosina 15 µg	MEDIA	53,33	54,00	55,17	55,33	53,33	57,00	57,10	54,33	56,67	56,33	55,33
	DE	1,53	2,00	1,04	2,08	2,08	1,73	0,85	1,15	3,06	1,53	2,52
Tilosina 5 µg	MEDIA	47,17	46,43	45,93	47,23	43,43	46,90	46,60	43,83	44,67	46,67	43,90
	DE	1,61	0,51	1,01	1,25	1,91	0,85	1,51	2,02	2,08	2,31	1,01
Tilosina 15 µg	MEDIA	50,17	48,33	51,90	51,67	55,00	49,40	56,00	53,33	59,67	59,17	55,00
	DE	1,44	1,53	0,96	2,08	1,80	2,16	1,00	1,53	2,52	0,76	2,65
Tilosina 30 µg	MEDIA	56,97	54,60	58,17	57,33	57,50	57,00	60,33	55,67	63,17	62,00	58,67
	DE	1,00	1,22	2,02	2,08	1,32	2,65	2,52	1,53	1,89	1,80	1,53
Tetraciclina 30 µg	MEDIA	46,17	46,83	46,80	62,33	46,23	47,67	40,17	44,20	45,33	39,83	44,50
	DE	0,76	1,04	1,31	1,53	0,75	2,08	1,76	2,31	1,53	1,76	1,32
Ciprofloxacina 5 µg	MEDIA	42,17	41,17	40,67	44,33	42,67	41,33	43,17	40,50	40,73	40,50	41,87
	DE	0,76	1,61	2,52	1,15	1,53	2,08	0,76	1,50	2,61	3,12	2,80
Enrofloxacin 5 µg	MEDIA	45,27	44,83	44,83	49,20	46,83	45,33	43,67	46,67	42,67	44,93	46,33
	DE	0,93	1,04	1,61	1,31	1,61	2,31	1,53	1,53	2,08	1,68	2,08
Trim./Sulfam. 1,25/23,75 µg	MEDIA	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
	DE	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Florfenicol 30 µg	MEDIA	47,40	52,53	53,67	54,00	51,33	51,17	56,33	53,90	55,33	57,33	55,00
	DE	0,69	1,36	2,08	2,65	2,08	2,47	1,53	1,82	1,53	0,58	1,50
Cloranfenicol 30 µg	MEDIA	38,50	39,50	37,00	40,33	37,33	40,33	40,67	40,67	40,80	40,73	41,67
	DE	1,32	1,80	3,00	3,51	2,08	1,53	1,53	2,52	1,31	2,41	2,08
Nitrofurantoina 300 µg	MEDIA	33,67	33,03	35,67	36,17	37,17	35,23	36,83	37,33	39,83	36,50	35,93
	DE	1,53	0,45	2,52	2,36	1,04	1,08	0,76	2,08	1,26	2,18	1,10
Rifampicina 5 µg	MEDIA	60,83	62,83	62,60	61,30	59,50	62,13	61,40	61,97	60,40	60,73	60,67
	DE	1,76	1,26	1,22	1,48	1,32	2,01	1,64	1,55	2,16	1,97	2,52
Clindamicina 2 µg	MEDIA	44,67	45,00	43,33	47,67	47,33	46,00	46,00	47,00	43,33	48,33	43,17
	DE	2,08	2,65	1,53	1,15	3,79	2,00	2,65	2,00	1,15	1,15	1,61

* Aislamientos de diferentes apiarios de la provincia de Buenos Aires. BS1: Verónica; BS2: La Plata; BS3: Gonnet; BS4: Villa Maza; BS5: Pehuajó; C13-18: colmenas experimentales del lote C.

VI.1.6. Prueba cuantitativa de susceptibilidad por el método de dilución en agar

Figura VI.1: Porcentaje de cepas inhibidas frente a cada concentración de tilosina evaluada

VI.2. FARMACOCINÉTICA

VI.2.1. Preparación de soluciones

Buffer fosfato de sodio pH 8

-Solución A (250 mL): Se pesan 6 g de NaH_2PO_4 (PM 119,98) que se diluyen en agua destilada.

-Solución B (250 mL): Se pesan 8,9 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (PM 177,99) que se diluyen en agua destilada.

Se toman 5,3 mL de solución A y 94,7 mL de solución B que se llevan a un volumen final de 200 mL con agua destilada.

Buffer fosfato de sodio 0,007 M pH 8,5

Para 500 mL de buffer: 4,97 g de Na_2HPO_4 (PM 141,96)

4,76 g de KH_2PO_4 (PM 136,09)

A estas sales se le agrega 500 mL de agua destilada y se ajusta el pH a 8,5 con OHNa .

Solución de hidróxido de sodio pH 14

El hidróxido de potasio 3 M pH 14 se preparó diluyendo 16,8 g de hidróxido de potasio (PM 56) en 100 mL de agua tridestilada estéril. Una vez esterilizado mediante autoclave, se corroboró el pH de la solución con cintas indicadoras y se conservó a temperatura de refrigeración, dónde se mantuvo estable durante un semana.

VI.2.2. Preparación de diluciones patrones para la cuantificación de tilosina por método microbiológico

VI.2.2.1. Rango de concentraciones de tilosina entre 0,0078 y 4 µg/g de miel

Diluciones estándares en buffer fosfato de sodio pH 8.

Solución madre: 1000 µg/mL de tilosina en metanol.

- 1) 1 mL de sol. madre + 9 mL de buffer fosfato pH 8 = 100 µg/mL.
- 2) 1 mL de sol. 1 + 9 mL de buffer fosfato pH 8 = 10 µg/mL.
- 3) 0,4 mL de sol. 1 + 9,6 mL de buffer fosfato pH 8 = 4 µg/mL.
- 4) 5 mL de sol. 3 + 5 mL de buffer fosfato pH 8 = 2 µg/mL.
- 5) 1 mL de sol. 2 + 9 mL de buffer fosfato pH 8 = 1 µg/mL.
- 6) 5 mL de sol. 3 + 5 mL de buffer fosfato pH 8 = 0,5 µg/mL.
- 7) 5 mL de sol. 4 + 5 mL de buffer fosfato pH 8 = 0,25 µg/mL.
- 8) 5 mL de sol. 5 + 5 mL de buffer fosfato pH 8 = 0,125 µg/mL.
- 9) 5 mL de sol. 6 + 5 mL de buffer fosfato pH 8 = 0,0625 µg/mL.
- 10) 5 mL de sol. 7 + 5 mL de buffer fosfato pH 8 = 0,0312 µg/mL.
- 11) 5 mL de sol. 8 + 5 mL de buffer fosfato pH 8 = 0,0156 µg/mL.
- 12) 5 mL de sol. 9 + 5 mL de buffer fosfato pH 8 = 0,0078 µg/mL.
- 13) 5 mL de sol. 10 + 5 mL de buffer fosfato pH 8 = 0,0039 µg/mL.

Diluciones patrones en miel libre de antimicrobianos.

- A. 2 g de miel + 4 mL de std 4 (2 µg/mL) = 4 µg/g.
- B. 2 g de miel + 4 mL de std 5 (1 µg/mL) = 2 µg/g.
- C. 2 g de miel + 4 mL de std 6 (0,5 µg/mL) = 1 µg/g.
- D. 2 g de miel + 4 mL de std 7 (0,25 µg/mL) = 0,5 µg/g.
- E. 2 g de miel + 4 mL de std 8 (0,125 µg/mL) = 0,25 µg/g.
- F. 2 g de miel + 4 mL de std 9 (0,0625 µg/mL) = 0,125 µg/g.
- G. 2 g de miel + 4 mL de std 10 (0,0312 µg/mL) = 0,0625 µg/g.
- H. 2 g de miel + 4 mL de std 11 (0,0156 µg/mL) = 0,0312 µg/g.
- I. 2 g de miel + 4 mL de std 12 (0,0078 µg/mL) = 0,0156 µg/g.
- J. 2 g de miel + 4 mL de std 13 (0,0039 µg/mL) = 0,0078 µg/g.

VI.2.2.2. Rango de concentraciones de tilosina entre 0,125 y 2 µg/g de abejas

Diluciones estándares en buffer fosfato de sodio 0,007 M pH 8,5

Solución madre: 1000 µg/mL de tilosina en metanol.

A) 1 mL de sol. madre + 9 mL de buffer fosfato 0,07 M pH 8,5 = 100 µg/mL.

B) 1 mL de sol. madre + 1 mL de buffer fosfato 0,07 M pH 8,5 = 500 µg/mL.

C) 0,5 mL de sol. B + 4,5 mL de buffer fosfato 0,07 M pH 8,5 = 50 µg/mL.

D) 2 mL de sol. C + 2 mL de buffer fosfato 0,07 M pH 8,5 = 25 µg/mL.

E) 2 mL de sol. D + 2 mL de buffer fosfato 0,07 M pH 8,5 = 12,5 µg/mL.

F) 2 mL de sol. E + 2 mL de buffer fosfato 0,07 M pH 8,5 = 6,25 µg/mL.

1) 0,5 mL de sol. A + 4,5 mL de buffer fosfato 0,07 M pH 8,5 = 10 µg/mL.

2) 1 mL de sol. 1 + 4 mL de buffer fosfato 0,07 M pH 8,5 = 2 µg/mL.

3) 2 mL de sol. 2 + 2 mL de buffer fosfato 0,07 M pH 8,5 = 1 µg/mL.

4) 2 mL de sol. 3 + 2 mL de buffer fosfato 0,07 M pH 8,5 = 0,50 µg/mL.

5) 2 mL de sol. 4 + 2 mL de buffer fosfato 0,07 M pH 8,5 = 0,25 µg/mL.

6) 2 mL de sol. 5 + 2 mL de buffer fosfato 0,07 M pH 8,5 = 0,125 µg/mL.

Diluciones patrones en abejas libres de antimicrobianos.

A. 1 g de abejas + 20 µL de sol. A (100 µg/mL) = 2 µg/g.

B. 1 g de abejas + 10 µL de sol. A (100 µg/mL) = 1 µg/g.

C. 1 g de abejas + 10 µL de sol. C (50 µg/mL) = 0,5 µg/g.

D. 1 g de abejas + 10 µL de sol. D (25 µg/mL) = 0,25 µg/g.

E. 1 g de abejas + 10 µL de sol. E (12,5 µg/mL) = 0,125 µg/g.

VI.2.2.3. Rango de concentraciones de tilosina entre 0,125 y 2 µg/g de larvas

Diluciones estándares en buffer fosfato de sodio 0,007 M pH 8,5

Se utilizan las mismas diluciones descritas en el punto anterior (VI.2.2.2).

Diluciones patrones en larvas libres de antimicrobianos.

- A. 0,5 g. de larvas + 10 µL de sol. A (100 µg/mL) = 2 µg/g.
- B. 0,5 g. de larvas + 10 µL de sol. C (50 µg/mL) = 1 µg/g.
- C. 0,5 g. de larvas + 10 µL de sol. D (25 µg/mL) = 0,5 µg/g.
- D. 0,5 g. de larvas + 10 µL de sol. E (12,5 µg/mL) = 0,25 µg/g.
- E. 0,5 g. de larvas + 10 µL de sol. F (6,25 µg/mL) = 0,125 µg/g.

VI.2.3. Validaciones

VI.2.3.1. Validación en miel

Rango de concentraciones de tilosina entre 0,0078 y 0,125 µg/g de miel

Tabla VI.5: Curva estándar de calibración en miel para el día 1

µg/g	Halos extracto (cm)	Teórico extracto (cm)	Media	DE	CV	Halos matriz (cm)	Teórico matriz (cm)	Media	DE	CV
0		0,78					0,81			
0,0078	0,80	0,85				0,80	0,86			
0,0078	0,80	0,85				0,80	0,86			
0,0078	0,80	0,85				0,80	0,86			
0,0078	0,80	0,85	0,80	0,00	0,00	0,80	0,86	0,80	0,00	0
0,0156	0,90	0,92				0,95	0,92			
0,0156	0,90	0,92				0,95	0,92			
0,0156	0,85	0,92				0,90	0,92			
0,0156	0,90	0,92	0,89	0,03	2,82	0,90	0,92	0,93	0,03	3,12
0,0312	1,20	1,06				1,10	1,03			
0,0312	1,20	1,06				1,10	1,03			
0,0312	1,10	1,06				1,10	1,03			
0,0312	1,10	1,06	1,15	0,06	5,02	1,15	1,03	1,11	0,02	2,25
0,0625	1,50	1,34				1,25	1,25			
0,0625	1,50	1,34				1,25	1,25			
0,0625	1,50	1,34				1,30	1,25			
0,0625	1,40	1,34	1,48	0,05	3,39	1,30	1,25	1,28	0,03	2,26
0,125	1,70	1,91				1,60	1,70			
0,125	1,90	1,91				1,60	1,70			
0,125	1,70	1,91				1,70	1,70			
0,125	1,80	1,91	1,78	0,10	5,39	1,70	1,70	1,65	0,06	3,50

Tabla VI.6: Curva estándar de calibración en miel para el día 2

$\mu\text{g/g}$	Halos extracto (cm)	Teórico extracto (cm)	Media	DE	CV	Halos matriz (cm)	Teórico matriz (cm)	Media	DE	CV
0		0,78					0,84			
0,0078	0,80	0,86				0,80	0,90			
0,0078	0,80	0,86				0,80	0,90			
0,0078	0,80	0,86				0,80	0,90			
0,0078	0,80	0,86	0,80	0,00	0,00	0,80	0,90	0,80	0,00	0
0,0156	0,85	0,93				1,10	0,96			
0,0156	0,90	0,93				1,10	0,96			
0,0156	0,85	0,93				1,00	0,96			
0,0156	0,90	0,93	0,88	0,03	3,27	1,10	0,96	1,08	0,05	4,65
0,0312	1,15	1,07				1,20	1,08			
0,0312	1,20	1,07				1,20	1,08			
0,0312	1,20	1,07				1,10	1,08			
0,0312	1,10	1,07	1,16	0,05	4,12	1,00	1,08	1,13	0,10	8,51
0,0625	1,50	1,35				1,30	1,32			
0,0625	1,50	1,35				1,35	1,32			
0,0625	1,60	1,35				1,30	1,32			
0,0625	1,40	1,35	1,50	0,08	5,44	1,30	1,32	1,31	0,03	1,90
0,125	1,80	1,93				1,70	1,81			
0,125	1,90	1,93				1,70	1,81			
0,125	1,70	1,93				1,80	1,81			
0,125	1,70	1,93	1,78	0,10	5,39	1,80	1,81	1,75	0,06	3,30

Tabla VI.7: Curva estándar de calibración en miel para el día 3

$\mu\text{g/g}$	Halos extracto (cm)	Teórico extracto (cm)	Media	DE	CV	Halos matriz (cm)	Teórico matriz (cm)	Media	DE	CV
0		0,75					0,75			
0,0078	0,80	0,83				0,80	0,81			
0,0078	0,80	0,83				0,80	0,81			
0,0078	0,80	0,83				0,80	0,81			
0,0078	0,80	0,83	0,80	0,00	0,00	0,80	0,81	0,80	0,00	0
0,0156	0,88	0,91				0,90	0,87			
0,0156	0,85	0,91				0,90	0,87			
0,0156	0,90	0,91				0,90	0,87			
0,0156	0,90	0,91	0,88	0,02	2,68	0,95	0,87	0,91	0,03	2,74
0,0312	1,00	1,06				0,95	1,00			
0,0312	1,10	1,06				0,98	1,00			
0,0312	1,10	1,06				0,95	1,00			
0,0312	1,20	1,06	1,10	0,08	7,42	0,95	1,00	0,96	0,02	1,57
0,0625	1,50	1,38				1,20	1,25			
0,0625	1,50	1,38				1,35	1,25			
0,0625	1,70	1,38				1,35	1,25			
0,0625	1,70	1,38	1,60	0,12	7,22	1,35	1,25	1,31	0,08	5,71
0,125	1,70	2,01				1,60	1,75			
0,125	1,80	2,01				1,60	1,75			
0,125	1,80	2,01				1,80	1,75			
0,125	1,90	2,01	1,80	0,08	4,54	1,80	1,75	1,70	0,12	6,79

Tabla VI.8: Curva estándar de calibración en miel para el día 4

$\mu\text{g/g}$	Halos extracto (cm)	Teórico extracto (cm)	Media	DE	CV	Halos matriz (cm)	Teórico matriz (cm)	Media	DE	CV
0		0,77					0,76			
0,0078	0,80	0,84				0,80	0,81			
0,0078	0,80	0,84				0,80	0,81			
0,0078	0,80	0,84				0,80	0,81			
0,0078	0,80	0,84	0,8	0,00	0,00	0,80	0,81	0,80	0,00	0,00
0,0156	0,85	0,92				0,90	0,87			
0,0156	0,85	0,92				0,90	0,87			
0,0156	0,85	0,92				0,90	0,87			
0,0156	0,90	0,92	0,86	0,03	2,90	0,90	0,87	0,90	0,00	0,00
0,0312	1,20	1,07				1,00	0,98			
0,0312	1,20	1,07				1,00	0,98			
0,0312	1,20	1,07				0,95	0,98			
0,0312	1,10	1,07	1,18	0,05	4,26	0,95	0,98	0,98	0,03	2,96
0,0625	1,40	1,37				1,10	1,20			
0,0625	1,50	1,37				1,20	1,20			
0,0625	1,50	1,37				1,20	1,20			
0,0625	1,70	1,37	1,53	0,13	8,25	1,30	1,20	1,20	0,08	6,80
0,125	1,80	1,98				1,50	1,64			
0,125	1,80	1,98				1,60	1,64			
0,125	1,80	1,98				1,70	1,64			
0,125	1,90	1,98	1,83	0,05	2,74	1,70	1,64	1,63	0,10	5,89

Rango de concentraciones de tilosina entre 0,25 y 4 µg/g de miel

Tabla VI.9: Curva estándar de calibración en miel para el día 1

µg/g	Halos extracto (cm)	Teórico extracto (cm)	Media	DE	CV	Halos matriz (cm)	Teórico matriz (cm)	Media	DE	CV
0		1,96					1,79			
0,25	1,9	2,03				1,75	1,87			
0,25	1,9	2,03				1,75	1,87			
0,25	2	2,03				1,7	1,87			
0,25	2	2,03	1,95	0,06	2,96	1,73	1,87	1,73	0,02	1
0,50	2,1	2,09				2,08	1,94			
0,50	2,2	2,09				2	1,94			
0,50	2,1	2,09				2	1,94			
0,50	2,2	2,09	2,15	0,06	2,69	2	1,94	2,02	0,04	1,98
1	2,3	2,22				2,23	2,08			
1	2,2	2,22				2,2	2,08			
1	2,3	2,22				2,2	2,08			
1	2,4	2,22	2,30	0,08	3,55	2,2	2,08	2,21	0,01	0,68
2	2,4	2,48				2,47	2,37			
2	2,5	2,48				2,5	2,37			
2	2,5	2,48				2,35	2,37			
2	2,65	2,48	2,51	0,10	4,10	2,3	2,37	2,41	0,10	3,97
4	2,8	3,01				2,9	2,95			
4	2,9	3,01				2,9	2,95			
4	3	3,01				2,8	2,95			
4	3	3,01	2,93	0,10	3,27	2,8	2,95	2,85	0,06	2,03

Tabla VI.10: Curva estándar de calibración en miel para el día 2

µg/g	Halos Extracto (cm)	Teórico Extracto (cm)	Media	DE	CV	Halos Matriz (cm)	Teórico Matriz (cm)	Media	DE	CV
0		1,92					1,70			
0,25	1,8	1,99				1,75	1,78			
0,25	1,8	1,99				1,75	1,78			
0,25	1,9	1,99				1,7	1,78			
0,25	2	1,99	1,88	0,10	5,11	1,6	1,78	1,70	0,07	4
0,50	1,9	2,07				1,95	1,86			
0,50	2,2	2,07				1,95	1,86			
0,50	2,17	2,07				1,72	1,86			
0,50	2,2	2,07	2,12	0,15	6,88	1,85	1,86	1,87	0,11	5,84
1	2,4	2,22				2,25	2,02			
1	2,35	2,22				2,22	2,02			
1	2,3	2,22				2,08	2,02			
1	2,5	2,22	2,39	0,09	3,58	2,1	2,02	2,16	0,08	3,93
2	2,6	2,53				2,4	2,34			
2	2,6	2,53				2,4	2,34			
2	2,7	2,53				2,35	2,34			
2	2,6	2,53	2,63	0,05	1,90	2,35	2,34	2,38	0,03	1,22
4	3	3,13				2,8	2,98			
4	3	3,13				2,85	2,98			
4	2,8	3,13				3	2,98			
4	2,95	3,13	2,94	0,09	3,22	2,9	2,98	2,89	0,09	2,96

Tabla VI.11: Curva estándar de calibración en miel para el día 3

$\mu\text{g/g}$	Halos Extracto (cm)	Teórico Extracto (cm)	Media	DE	CV	Halos Matriz (cm)	Teórico Matriz (cm)	Media	DE	CV
0		1,95					1,74			
0,25	2	2,02				1,7	1,81			
0,25	1,9	2,02				1,75	1,81			
0,25	2	2,02				1,75	1,81			
0,25	1,9	2,02	1,95	0,06	2,96	1,75	1,81	1,74	0,03	1
0,50	2,1	2,08				2	1,88			
0,50	2,2	2,08				1,9	1,88			
0,50	2,1	2,08				1,8	1,88			
0,50	2	2,08	2,10	0,08	3,89	1,8	1,88	1,88	0,10	5,11
1	2,4	2,21				2,1	2,03			
1	2,2	2,21				2,15	2,03			
1	2,2	2,21				2,15	2,03			
1	2,45	2,21	2,31	0,13	5,69	2,15	2,03	2,14	0,02	1,17
2	2,4	2,46				2,38	2,31			
2	2,5	2,46				2,4	2,31			
2	2,5	2,46				2,35	2,31			
2	2,6	2,46	2,50	0,08	3,27	2,4	2,31	2,38	0,02	0,99
4	2,8	2,97				2,7	2,88			
4	2,9	2,97				2,8	2,88			
4	2,9	2,97				2,7	2,88			
4	2,9	2,97	2,88	0,05	1,74	2,9	2,88	2,78	0,10	3,45

Tabla VI.12: Curva estándar de calibración en miel para el día 4

$\mu\text{g/g}$	Halos Extracto (cm)	Teórico Extracto (cm)	Media	DE	CV	Halos Matriz (cm)	Teórico Matriz (cm)	Media	DE	CV
0		1,97					1,69			
0,25	1,9	2,03				1,72	1,77			
0,25	1,9	2,03				1,65	1,77			
0,25	1,85	2,03				1,7	1,77			
0,25	2	2,03	1,91	0,06	3,29	1,7	1,77	1,69	0,03	1,76
0,50	2,2	2,10				1,9	1,84			
0,50	2,2	2,10				1,85	1,84			
0,50	2,4	2,10				1,8	1,84			
0,50	2,15	2,10	2,24	0,11	4,95	1,85	1,84	1,85	0,04	2,21
1	2,25	2,23				2,1	2,00			
1	2,3	2,23				2	2,00			
1	2,2	2,23				2	2,00			
1	2,35	2,23	2,28	0,06	2,84	2,2	2,00	2,08	0,10	4,61
2	2,5	2,49				2,35	2,30			
2	2,5	2,49				2,35	2,30			
2	2,6	2,49				2,55	2,30			
2	2,7	2,49	2,58	0,10	3,72	2,35	2,30	2,40	0,10	4,17
4	2,9	3,02				2,8	2,92			
4	2,9	3,02				2,9	2,92			
4	2,9	3,02				2,75	2,92			
4	2,8	3,02	2,88	0,05	1,74	2,8	2,92	2,81	0,06	2,24

VI.2.3.2. Validación en abejas

Tabla VI.13: Curva estándar de calibración en abejas día 1

µg/g	Halos buffer (cm)	Teórico buffer (cm)	Media	DE	CV	Halos matriz (cm)	Teórico matriz (cm)	Media	DE	CV
0		1,33					0,75			
0,125	1,30	1,41				0,80	0,82			
0,125	1,30	1,41				0,80	0,82			
0,125	1,35	1,41				0,80	0,82			
0,125	1,40	1,41	1,34	0,05	3,58	0,80	0,82	0,80	0,00	0
0,25	1,45	1,48				0,83	0,90			
0,25	1,45	1,48				0,82	0,90			
0,25	1,45	1,48				0,85	0,90			
0,25	1,45	1,48	1,45	0,00	0,00	0,85	0,90	0,84	0,02	1,79
0,50	1,65	1,64				1,12	1,04			
0,50	1,75	1,64				1,12	1,04			
0,50	1,80	1,64				1,15	1,04			
0,50	1,75	1,64	1,74	0,06	3,62	1,15	1,04	1,14	0,02	1,53
1,00	2,12	1,94				1,30	1,34			
1,00	2,12	1,94				1,40	1,34			
1,00	2,15	1,94				1,40	1,34			
1,00	2,10	1,94	2,12	0,02	0,97	1,40	1,34	1,38	0,05	3,64
2,00	2,35	2,55				1,80	1,93			
2,00	2,40	2,55				1,90	1,93			
2,00	2,35	2,55				1,90	1,93			
2,00	2,35	2,55	2,36	0,02	1,06	1,90	1,93	1,88	0,05	2,67

Tabla VI.14: Curva estándar de calibración en abejas día 2

µg/g	Halos buffer (cm)	Teórico buffer (cm)	Media	DE	CV	Halos matriz (cm)	Teórico matriz (cm)	Media	DE	CV
0		1,53					0,73			
0,125	1,40	1,61				0,80	0,80			
0,125	1,53	1,61				0,80	0,80			
0,125	1,40	1,61				0,80	0,80			
0,125	1,50	1,61	1,46	0,07	4,63	0,80	0,80	0,80	0,00	0
0,25	1,70	1,69				0,85	0,86			
0,25	1,70	1,69				0,85	0,86			
0,25	1,80	1,69				0,90	0,86			
0,25	1,80	1,69	1,75	0,06	3,30	0,85	0,86	0,86	0,03	2,90
0,50	2,00	1,85				1,00	1,00			
0,50	2,00	1,85				1,00	1,00			
0,50	2,10	1,85				0,90	1,00			
0,50	2,00	1,85	2,03	0,05	2,47	1,00	1,00	0,98	0,05	5,13
1,00	2,30	2,17				1,26	1,27			
1,00	2,30	2,17				1,30	1,27			
1,00	2,40	2,17				1,30	1,27			
1,00	2,40	2,17	2,35	0,06	2,46	1,40	1,27	1,32	0,06	4,54
2,00	2,50	2,82				1,75	1,80			
2,00	2,50	2,82				1,75	1,80			
2,00	2,60	2,82				1,80	1,80			
2,00	2,60	2,82	2,55	0,06	2,26	1,80	1,80	1,78	0,03	1,63

Tabla VI.15: Curva estándar de calibración en abejas día 3

µg/g	Halos buffer (cm)	Teórico buffer (cm)	Media	DE	CV	Halos matriz (cm)	Teórico matriz (cm)	Media	DE	CV
0		1,35					0,74			
0,125	1,30	1,42				0,80	0,81			
0,125	1,30	1,42				0,80	0,81			
0,125	1,35	1,42				0,80	0,81			
0,125	1,38	1,42	1,33	0,04	2,96	0,80	0,81	0,80	0,00	0
0,25	1,50	1,49				0,82	0,88			
0,25	1,53	1,49				0,85	0,88			
0,25	1,53	1,49				0,82	0,88			
0,25	1,50	1,49	1,52	0,02	1,14	0,80	0,88	0,82	0,02	2,51
0,50	1,65	1,63				1,10	1,02			
0,50	1,70	1,63				1,10	1,02			
0,50	1,65	1,63				1,10	1,02			
0,50	1,70	1,63	1,68	0,03	1,72	1,20	1,02	1,13	0,05	4,44
1,00	2,00	1,91				1,35	1,30			
1,00	2,00	1,91				1,30	1,30			
1,00	2,08	1,91				1,40	1,30			
1,00	2,08	1,91	2,04	0,05	2,26	1,30	1,30	1,34	0,05	3,58
2,00	2,30	2,47				1,70	1,86			
2,00	2,30	2,47				1,70	1,86			
2,00	2,40	2,47				1,90	1,86			
2,00	2,40	2,47	2,35	0,06	2,46	1,90	1,86	1,80	0,12	6,42

Tabla VI.16: Curva estándar de calibración en abejas día 4

µg/g	Halos buffer (cm)	Teórico buffer (cm)	Media	DE	CV	Halos matriz (cm)	Teórico matriz (cm)	Media	DE	CV
0		1,50					0,76			
0,125	1,40	1,58				0,80	0,83			
0,125	1,40	1,58				0,80	0,83			
0,125	1,50	1,58				0,80	0,83			
0,125	1,50	1,58	1,45	0,06	3,98	0,80	0,83	0,80	0,00	0
0,25	1,66	1,66				0,85	0,90			
0,25	1,65	1,66				0,85	0,90			
0,25	1,68	1,66				0,90	0,90			
0,25	1,68	1,66	1,67	0,02	0,90	0,93	0,90	0,88	0,04	4,47
0,50	2,00	1,81				1,10	1,05			
0,50	2,00	1,81				1,10	1,05			
0,50	2,00	1,81				1,05	1,05			
0,50	2,00	1,81	2,00	0,00	0,00	1,05	1,05	1,08	0,03	2,69
1,00	2,23	2,12				1,40	1,34			
1,00	2,25	2,12				1,40	1,34			
1,00	2,30	2,12				1,40	1,34			
1,00	2,30	2,12	2,27	0,04	1,57	1,45	1,34	1,41	0,03	1,77
2,00	2,50	2,74				1,90	1,93			
2,00	2,50	2,74				1,80	1,93			
2,00	2,55	2,74				1,90	1,93			
2,00	2,55	2,74	2,53	0,03	1,14	1,90	1,93	1,88	0,05	2,67

VI.2.3.3. Validación en larvas

Tabla VI.17: Curva estándar de calibración en larvas día 1

µg/g	Halos buffer (cm)	Teórico buffer (cm)	Media	DE	CV	Halos matriz (cm)	Teórico matriz (cm)	Media	DE	CV
0		1,31					0,83			
0,125	1,35	1,40				0,80	0,93			
0,125	1,25	1,40				0,80	0,93			
0,125	1,25	1,40				0,80	0,93			
0,125	1,30	1,40	1,29	0,05	3,72	0,80	0,93	0,80	0,00	0
0,25	1,50	1,49				1,00	1,04			
0,25	1,40	1,49				0,90	1,04			
0,25	1,50	1,49				1,20	1,04			
0,25	1,50	1,49	1,48	0,05	3,39	1,20	1,04	1,08	0,15	13,95
0,50	1,70	1,67				1,35	1,25			
0,50	1,90	1,67				1,40	1,25			
0,50	1,85	1,67				1,35	1,25			
0,50	1,85	1,67	1,83	0,09	4,75	1,45	1,25	1,39	0,05	3,45
1,00	2,20	2,02				1,80	1,67			
1,00	2,15	2,02				1,90	1,67			
1,00	2,25	2,02				1,70	1,67			
1,00	2,25	2,02	2,21	0,05	2,16	1,80	1,67	1,80	0,08	4,54
2,00	2,60	2,74				2,40	2,50			
2,00	2,60	2,74				2,50	2,50			
2,00	2,40	2,74				2,20	2,50			
2,00	2,45	2,74	2,51	0,10	4,10	2,20	2,50	2,33	0,15	6,45

Tabla VI.18: Curva estándar de calibración en larvas día 2

µg/g	Halos buffer (cm)	Teórico buffer (cm)	Media	DE	CV	Halos matriz (cm)	Teórico matriz (cm)	Media	DE	CV
0		1,34					0,80			
0,125	1,40	1,42				0,80	0,89			
0,125	1,35	1,42				0,80	0,89			
0,125	1,45	1,42				0,80	0,89			
0,125	1,35	1,42	1,39	0,05	3,45	0,80	0,89	0,80	0,00	0
0,25	1,35	1,49				1,00	0,98			
0,25	1,40	1,49				1,00	0,98			
0,25	1,55	1,49				0,90	0,98			
0,25	1,55	1,49	1,46	0,10	7,05	0,85	0,98	0,94	0,08	8,00
0,50	1,70	1,63				1,30	1,17			
0,50	1,70	1,63				1,30	1,17			
0,50	1,65	1,63				1,40	1,17			
0,50	1,60	1,63	1,66	0,05	2,88	1,40	1,17	1,35	0,06	4,28
1,00	2,00	1,92				1,60	1,53			
1,00	2,00	1,92				1,60	1,53			
1,00	2,05	1,92				1,65	1,53			
1,00	2,05	1,92	2,03	0,03	1,43	1,70	1,53	1,64	0,05	2,92
2,00	2,40	2,49				2,20	2,27			
2,00	2,40	2,49				2,20	2,27			
2,00	2,40	2,49				2,03	2,27			
2,00	2,40	2,49	2,40	0,00	0,00	2,05	2,27	2,12	0,09	4,37

Tabla VI.19: Curva estándar de calibración en larvas día 3

µg/g	Halos buffer (cm)	Teórico buffer (cm)	Media	DE	CV	Halos matriz (cm)	Teórico matriz (cm)	Media	DE	CV
0		1,29					0,83			
0,125	1,25	1,38				0,80	0,93			
0,125	1,35	1,38				0,80	0,93			
0,125	1,30	1,38				0,80	0,93			
0,125	1,30	1,38	1,30	0,04	3,14	0,80	0,93	0,80	0,00	0
0,25	1,45	1,46				1,10	1,03			
0,25	1,45	1,46				1,10	1,03			
0,25	1,60	1,46				1,00	1,03			
0,25	1,55	1,46	1,51	0,08	4,96	1,00	1,03	1,05	0,06	5,50
0,50	1,70	1,63				1,35	1,24			
0,50	1,65	1,63				1,40	1,24			
0,50	1,65	1,63				1,40	1,24			
0,50	1,50	1,63	1,63	0,09	5,33	1,30	1,24	1,36	0,05	3,51
1,00	2,20	1,97				1,70	1,65			
1,00	2,20	1,97				1,70	1,65			
1,00	2,20	1,97				1,80	1,65			
1,00	2,20	1,97	2,20	0,00	0,00	1,80	1,65	1,75	0,06	3,30
2,00	2,45	2,64				2,45	2,47			
2,00	2,40	2,64				2,35	2,47			
2,00	2,45	2,64				2,30	2,47			
2,00	2,45	2,64	2,44	0,03	1,03	2,30	2,47	2,35	0,07	3,01

Tabla VI.20: Curva estándar de calibración en larvas día 4

µg/g	Halos buffer (cm)	Teórico buffer (cm)	Media	DE	CV	Halos matriz (cm)	Teórico matriz (cm)	Media	DE	CV
0		1,27					0,85			
0,125	1,20	1,34				0,80	0,95			
0,125	1,20	1,34				0,85	0,95			
0,125	1,25	1,34				0,80	0,95			
0,125	1,25	1,34	1,23	0,03	2,36	0,80	0,95	0,81	0,03	3,08
0,25	1,40	1,41				1,15	1,05			
0,25	1,40	1,41				1,15	1,05			
0,25	1,50	1,41				1,00	1,05			
0,25	1,45	1,41	1,44	0,05	3,33	1,00	1,05	1,08	0,09	8,06
0,50	1,70	1,55				1,35	1,25			
0,50	1,70	1,55				1,35	1,25			
0,50	1,65	1,55				1,40	1,25			
0,50	1,60	1,55	1,66	0,05	2,88	1,40	1,25	1,38	0,03	2,10
1,00	1,90	1,83				1,90	1,66			
1,00	1,90	1,83				1,90	1,66			
1,00	1,90	1,83				1,80	1,66			
1,00	2,00	1,83	1,93	0,05	2,60	1,70	1,66	1,83	0,10	5,25
2,00	2,20	2,39				2,25	2,47			
2,00	2,25	2,39				2,35	2,47			
2,00	2,30	2,39				2,35	2,47			
2,00	2,30	2,39	2,26	0,05	2,12	2,20	2,47	2,29	0,08	3,28

VI.2.4. Ensayos

VI.2.4.1. Tablas de concentraciones experimentales de tilosina determinadas por método microbiológico

Tabla VI.21: Concentraciones en miel de colmenas sanas con alto nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en otoño

Tpo(ds)	Colmena 1	Colmena 2	Colmena 3	Colmena 4	Colmena 5	Colmena 6	MEDIA	DE
1	0,03	0,13	0,14	0,06	0,40	0,31	0,18	0,15
14	0,31	0,42	0,42	0,44	0,43	0,44	0,41	0,05
21	0,38	0,39	0,42	0,44	0,42	0,38	0,40	0,02
28	0,36	0,38	0,41	0,42	0,39	0,38	0,39	0,02
43	0,36	0,36	ND	0,37	0,37	0,38	0,37	0,01
Test* 371	ND	0,17	ND	ND	0,15	ND	0,16	0,02

*Concentración en cuadros testigos a los 371 días post tratamiento.

ND: concentración no detectada

Tabla VI.22: Concentraciones en miel de colmenas sanas con bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en otoño

Tpo(ds)	colmena 1	colmena 2	colmena 3	colmena 4	colmena 5	colmena 6	MEDIA	DE
1	0,50	0,46	0,41	0,36	0,41	0,32	0,41	0,07
7	0,50	0,53	0,41	0,39	0,39	0,45	0,44	0,06
14	0,43	0,48	0,38	0,36	0,39	0,41	0,41	0,04
21	0,42	0,48	0,36	0,33	0,37	0,39	0,39	0,05
28	0,42	0,47	0,33	0,34	0,36	0,37	0,38	0,05
43	0,42	0,43	0,33	0,32	0,36	0,37	0,37	0,04
56	0,42	0,41	0,33	0,29	0,35	0,36	0,36	0,05
70	0,37	0,36	0,33	0,29	0,35	0,34	0,34	0,03
84	0,30	0,36	0,31	0,28	ND	ND	0,31	0,03

ND: concentración no detectada

Tabla VI.23: Concentraciones en abejas de colmenas sanas con alto nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en otoño

Tpo(ds)	colmena 1	colmena 2	colmena 3	colmena 4	colmena 5	colmena 6	MEDIA	DE
1	3,52	3,40	3,00	3,13	3,62	3,72	3,40	0,28
7	2,69	2,93	2,38	2,74	2,55	2,90	2,70	0,21
14	1,57	2,18	2,04	2,38	2,30	2,33	2,14	0,30
21	1,43	2,35	0,85	1,81	1,69	1,82	1,66	0,50
28	0,45	1,79	0,82	1,20	0,98	1,56	1,13	0,49
43	0,33	0,67	0,36	0,78	0,79	0,95	0,65	0,25

Tabla VI.24: Concentraciones en abejas de colmenas sanas con bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en otoño

Tpo(ds)	colmena 1	colmena 2	colmena 3	colmena 4	colmena 5	colmena 6	MEDIA	DE
1	5,44	5,20	4,75	5,97	5,29	5,24	5,32	0,39
7	5,44	4,92	4,08	5,49	3,38	4,21	4,59	0,84
14	3,14	1,94	2,55	3,44	2,32	3,14	2,75	0,58
21	2,23	1,56	2,27	2,36	2,32	2,57	2,22	0,34
28	1,80	1,56	1,98	1,88	2,11	2,16	1,91	0,22
43	0,94	0,60	1,02	0,92	1,04	0,93	0,91	0,16
56	0,73	0,46	0,64	0,68	0,83	0,93	0,71	0,16
70	0,08	0,41	0,54	0,68	0,73	0,52	0,49	0,23
84	ND	0,02	0,06	0,20	0,09	0,10	0,10	0,07

ND: concentración no detectada

Tabla VI.25: Concentraciones en miel de colmenas enfermas con bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en otoño

Tpo(ds)	colmena 1	colmena 2	colmena 3	colmena 4	colmena 5	colmena 6	MEDIA	DE
1	0,16	0,36	0,30	0,49	0,42	0,39	0,35	0,11
7	0,36	0,38	0,43	0,41	0,41	0,40	0,40	0,02
14	0,31	0,38	0,37	0,42	0,43	0,39	0,38	0,04
21	0,31	0,38	0,39	0,39	0,41	0,38	0,37	0,03
28	0,31	0,35	0,39	0,39	0,39	0,37	0,36	0,03
43	0,28	0,33	0,39	0,39	0,39	0,35	0,36	0,04
56	0,26	0,28	0,33	0,37	0,32	0,24	0,30	0,05
70	0,26	0,24	0,33	0,37	0,31	0,24	0,29	0,05
84	0,22	0,21	0,32	ND	0,23	ND	0,25	0,05

ND: concentración no detectada

Tabla VI.26: Concentraciones en abejas de colmenas enfermas con bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en otoño

Tpo(ds)	colmena 1	colmena 2	colmena 3	colmena 4	colmena 5	colmena 6	MEDIA	DE
1	4,85	4,48	5,04	5,22	4,81	5,00	4,90	0,25
7	4,23	4,04	4,94	4,60	3,95	4,13	4,32	0,38
14	3,49	3,52	4,74	2,89	3,18	3,55	3,56	0,63
21	2,31	2,05	3,19	1,78	1,87	2,10	2,22	0,51
28	1,77	1,40	1,96	1,77	1,46	1,18	1,59	0,29
43	1,61	1,01	0,75	1,60	1,12	0,46	1,09	0,46
56	0,95	0,88	0,71	0,58	0,60	0,27	0,67	0,25
70	0,04	0,57	0,03	0,04	ND	0,07	0,15	0,24
84	0,04	0,05	ND	0,04	ND	0,07	0,05	0,02

ND: concentración no detectada

Tabla VI.27: Concentraciones en miel del alza inferior de colmenas sanas con bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en primavera

Tpo(ds)	colmena 1	colmena 2	colmena 3	colmena 4	colmena 5	colmena 6	MEDIA	DE
21	0,42	0,41	0,45	0,41	0,43	0,42	0,42	0,01
28	0,35	0,39	0,52	0,35	0,40	0,41	0,41	0,06
43	0,28	0,34	0,41	0,32	0,33	0,21	0,31	0,06
56	0,14	0,17	0,39	0,20	0,21	0,18	0,22	0,09
70	0,12	0,16	0,33	0,17	0,17	0,09	0,17	0,08
84	0,09	0,13	0,25	0,21	0,11	0,09	0,15	0,07
98	0,08	0,13	0,19	0,16	0,03	0,02	0,10	0,07

Tabla VI.28: Concentraciones en miel del alza superior de colmenas sanas con bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en primavera

Tpo(ds)	colmena 1	colmena 2	colmena 3	colmena 4	colmena 5	colmena 6	MEDIA	DE
21	0,39	0,42	ND	0,35	ND	0,39	0,39	0,03
28	0,35	0,31	ND	0,33	ND	0,21	0,30	0,06
43	0,20	0,27	ND	0,31	0,21	0,14	0,23	0,07
56	0,19	0,20	0,36	0,29	0,11	0,10	0,21	0,10
70	0,16	0,05	0,21	0,24	0,08	0,03	0,13	0,09
84	0,14	0,07	0,15	0,24	0,03	0,03	0,11	0,08
98	0,14	0,04	0,06	0,24	0,02	0,03	0,09	0,09
Test*126	ND	0,27	0,16	0,37	0,11	0,19	0,22	0,10

*Concentración en cuadros testigos a los 126 días post tratamiento.

ND: concentración no detectada o ausencia de muestra.

Tabla VI.29: Concentraciones en abejas de colmenas sanas con bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en primavera

Tpo(ds)	colmena 1	colmena 2	colmena 3	colmena 4	colmena 5	colmena 6	MEDIA	DE
1	3,28	3,16	3,30	2,93	3,41	2,71	3,13	0,26
3	1,82	1,33	1,53	0,94	2,18	1,23	1,50	0,44
7	0,03	0,03	0,03	0,04	1,23	0,12	0,25	0,48
14	0,03	0,03	0,03	0,04	1,14	0,03	0,22	0,45
21	0,03	0,03	0,03	0,04	0,01	0,03	0,03	0,01
28	0,03	0,03	0,03	0,04	0,01	0,03	0,03	0,01
43	0,03	0,03	0,03	0,04	0,01	0,03	0,03	0,01
56	0,03	0,03	0,03	0,04	0,01	0,03	0,03	0,01
70	0,03	0,03	0,03	0,04	0,01	0,03	0,03	0,01
84	0,03	0,03	0,03	0,04	0,01	0,03	0,03	0,01
98	0,03	0,03	0,03	0,04	0,01	0,03	0,03	0,01

Tabla VI.30: Concentraciones en miel de colmenas sanas con bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en verano

Tpo(ds)	colmena 1	colmena 2	colmena 3	colmena 4	colmena 5	colmena 6	MEDIA	DE
-9	ND	0,44	0,45	0,37	0,42	0,42	0,42	0,03
-2	0,48	0,51	0,46	0,47	0,38	0,50	0,47	0,05
1	0,47	0,51	0,48	0,45	0,45	0,49	0,47	0,03
3	0,51	0,50	0,49	0,44	0,45	0,49	0,48	0,03
7	0,51	0,50	0,47	0,44	0,44	0,49	0,47	0,03
14	0,50	0,50	0,43	0,44	0,43	0,46	0,46	0,03
21	0,48	0,46	0,40	0,41	0,43	0,44	0,44	0,03
31	0,45	0,39	0,36	0,38	0,43	0,43	0,41	0,03

ND: concentración no detectada o ausencia de muestra.

Tabla VI.31: Concentraciones en abejas de colmenas sanas con bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en verano

Tpo(ds)	colmena 1	colmena 2	colmena 3	colmena 4	colmena 5	colmena 6	MEDIA	DE
-9	0,97	1,03	0,48	1,79	1,53	1,00	1,13	0,46
-2	1,93	1,85	1,55	2,46	1,80	1,73	1,89	0,31
1	2,97	3,65	3,14	3,55	3,75	3,56	3,44	0,31
3	2,67	2,71	2,35	2,83	2,57	1,99	2,52	0,31
7	1,71	1,72	1,61	2,02	1,85	1,44	1,72	0,20
14	1,57	1,16	1,09	1,50	1,42	0,81	1,26	0,29
21	1,16	0,60	0,27	0,63	0,97	0,67	0,72	0,31
31	0,39	0,34	0,13	0,12	0,71	0,33	0,34	0,22

Tabla VI.32: Concentraciones en larvas de 2 días de colmenas sanas con bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en verano

Tpo(ds)	colmena 1	colmena 2	colmena 3	colmena 4	colmena 5	colmena 6	MEDIA	DE
-9	0,01	0,00	0,03	0,01	0,02	0,04	0,02	0,01
-2	0,01	0,35	0,05	0,36	0,07	0,08	0,15	0,16
1	1,61	2,06	1,49	1,78	1,39	1,30	1,60	0,28
3	1,11	1,14	0,95	0,94	0,53	0,38	0,84	0,31
7	0,26	0,26	0,27	0,46	0,13	0,13	0,25	0,12
14	0,13	ND	0,13	0,13	ND	ND	0,13	0,00
21	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
31	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: concentración no detectada.

Tabla VI.33: Concentraciones en larvas de 5 días de colmenas sanas con bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en verano

Tpo(ds)	colmena 1	colmena 2	colmena 3	colmena 4	colmena 5	colmena 6	MEDIA	DE
-9	0,23	0,30	0,13	0,32	0,41	0,34	0,29	0,10
-2	0,70	0,48	0,44	1,00	0,82	0,71	0,69	0,21
1	1,75	2,19	1,81	2,23	1,69	1,89	1,93	0,23
3	1,63	1,27	0,98	0,94	0,88	0,73	1,07	0,33
7	0,97	0,90	0,51	0,73	0,56	0,13	0,63	0,31
14	0,45	0,36	0,17	0,34	0,33	ND	0,33	0,10
21	0,43	0,18	0,13	0,13	0,13	ND	0,20	0,13
31	0,20	0,13	ND	ND	ND	ND	0,16	0,05

ND: concentración no detectada.

VI.2.4.2. Tablas de parámetros farmacológicos obtenidos por análisis no compartimental

Tabla VI.34: Parámetros farmacocinéticos en miel de colmenas sanas con alto nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en otoño

PARAMETRO	UNIDAD	Colmena 1	Colmena 2	Colmena 3	Colmena 4	Colmena 5	Colmena 6
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/g}$	0,38	0,42	0,42	0,44	0,43	0,44
$T_{m\acute{a}x}$	ds	21,00	14,00	14,00	14,00	14,00	14,00
λ	d^{-1}	0,0021	0,005	0,0017	0,0064	0,0054	0,004
$T_{1/2}\lambda$	días	335,09	139,78	402,70	109,10	127,99	174,37
ABC_{0-t}	$\mu\text{g.d/g}$	12,63	14,72	9,56	15,30	17,11	16,26
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.d/g}$	186,67	87,32	247,75	73,53	85,42	111,85
TMR_{0-t}	ds	25,85	23,79	16,92	24,54	21,29	22,09
$TMR_{0-\infty}$	ds	492,56	207,43	586,14	163,83	186,32	254,95

$C_{m\acute{a}x}$: máxima concentración observada; $T_{m\acute{a}x}$: tiempo al que se produce la máxima concentración; λ : constante híbrida de eliminación; $T_{1/2}\lambda$: semivida de eliminación; ABC_{0-t} : área bajo la curva del tiempo 0 al tiempo t; $ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva extrapolada al infinito; TMR_{0-t} : tiempo medio de residencia del tiempo 0 al tiempo t; $TMR_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia extrapolado al infinito.

Tabla VI.35: Parámetros farmacocinéticos en miel de colmenas sanas con bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en otoño

PARAMETRO	UNIDAD	Colmena 1	Colmena 2	Colmena 3	Colmena 4	Colmena 5	Colmena 6
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/g}$	0,5	0,53	0,41	0,39	0,41	0,45
$T_{m\acute{a}x}$	ds	1,00	7,00	1,00	7,00	1,00	7,00
λ	d^{-1}	0,0048	0,0054	0,0032	0,0052	0,0046	0,0037
$T_{1/2}\lambda$	días	145,55	128,04	219,57	133,10	151,12	189,22
ABC_{0-t}	$\mu\text{g.d/g}$	34,40	36,06	28,78	26,78	25,47	26,14
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.d/g}$	97,39	102,56	126,98	80,54	101,77	118,95
TMR_{0-t}	ds	39,74	39,42	40,51	39,89	34,38	34,23
$TMR_{0-\infty}$	ds	204,18	188,10	319,14	197,51	224,56	275,14

$C_{m\acute{a}x}$: máxima concentración observada; $T_{m\acute{a}x}$: tiempo al que se produce la máxima concentración; λ : constante híbrida de eliminación; $T_{1/2}\lambda$: semivida de eliminación; ABC_{0-t} : área bajo la curva del tiempo 0 al tiempo t; $ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva extrapolada al infinito; TMR_{0-t} : tiempo medio de residencia del tiempo 0 al tiempo t; $TMR_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia extrapolado al infinito.

Tabla VI.36: Parámetros farmacocinéticos en abejas de colmenas sanas con alto nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en otoño

PARAMETRO	UNIDAD	Colmena 1	Colmena 2	Colmena 3	Colmena 4	Colmena 5	Colmena 6
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/g}$	3,52	3,4	3	3,13	3,62	3,72
$T_{m\acute{a}x}$	ds	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
λ	d^{-1}	0,0605	0,0584	0,0523	0,0348	0,0376	0,0318
$T_{1/2}\lambda$	días	11,45	11,87	13,25	19,94	18,45	21,80
ABC_{0-t}	$\mu\text{g.d/g}$	58,23	87,37	57,92	77,15	73,88	85,21
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.d/g}$	63,68	98,85	64,80	99,59	94,91	115,09
TMR_{0-t}	ds	12,77	16,84	14,02	16,28	15,69	16,76
$TMR_{0-\infty}$	ds	16,78	21,87	19,13	28,79	27,64	31,74

$C_{m\acute{a}x}$: máxima concentración observada; $T_{m\acute{a}x}$: tiempo al que se produce la máxima concentración; λ : constante híbrida de eliminación; $T_{1/2}\lambda$: semivida de eliminación; ABC_{0-t} : área bajo la curva del tiempo 0 al tiempo t; $ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva extrapolada al infinito; TMR_{0-t} : tiempo medio de residencia del tiempo 0 al tiempo t; $TMR_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia extrapolado al infinito.

Tabla VI.37: Parámetros farmacocinéticos en abejas de colmenas sanas con bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en otoño

PARAMETRO	UNIDAD	Colmena 1	Colmena 2	Colmena 3	Colmena 4	Colmena 5	Colmena 6
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/g}$	5,44	5,2	4,75	5,97	5,29	5,24
$T_{m\acute{a}x}$	ds	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
λ	d^{-1}	0,0541	0,0542	0,0442	0,0379	0,0386	0,0415
$T_{1/2}\lambda$	días	12,82	12,78	15,67	18,29	17,96	16,71
ABC_{0-t}	$\mu\text{g.d/g}$	135,37	112,33	129,57	150,84	132,79	142,99
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.d/g}$	136,84	112,70	130,92	156,12	135,12	145,40
TMR_{0-t}	ds	19,31	20,16	23,60	22,45	25,70	23,72
$TMR_{0-\infty}$	ds	20,05	20,43	24,46	25,42	27,15	25,12

$C_{m\acute{a}x}$: máxima concentración observada; $T_{m\acute{a}x}$: tiempo al que se produce la máxima concentración; λ : constante híbrida de eliminación; $T_{1/2}\lambda$: semivida de eliminación; ABC_{0-t} : área bajo la curva del tiempo 0 al tiempo t; $ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva extrapolada al infinito; TMR_{0-t} : tiempo medio de residencia del tiempo 0 al tiempo t; $TMR_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia extrapolado al infinito.

Tabla VI.38: Parámetros farmacocinéticos en miel de colmenas enfermas con bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en otoño

PARAMETRO	UNIDAD	Colmena 1	Colmena 2	Colmena 3	Colmena 4	Colmena 5	Colmena 6
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/g}$	0,36	0,38	0,43	0,49	0,43	0,40
$T_{m\acute{a}x}$	ds	7,00	7,00	7,00	1,00	14,00	7,00
λ	d^{-1}	0,0052	0,0094	0,0043	0,003	0,008	0,0091
$T_{1/2}\lambda$	días	132,09	73,77	161,81	231,76	87,05	76,36
ABC_{0-t}	$\mu\text{g.d/g}$	23,26	26,13	30,23	27,39	30,04	23,25
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.d/g}$	65,19	48,48	104,93	151,10	58,92	49,68
TMR_{0-t}	ds	40,31	37,83	40,69	34,13	38,57	31,72
$TMR_{0-\infty}$	ds	190,98	108,18	237,71	337,25	122,41	110,71

$C_{m\acute{a}x}$: máxima concentración observada; $T_{m\acute{a}x}$: tiempo al que se produce la máxima concentración; λ : constante híbrida de eliminación; $T_{1/2}\lambda$: semivida de eliminación; ABC_{0-t} : área bajo la curva del tiempo 0 al tiempo t; $ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva extrapolada al infinito; TMR_{0-t} : tiempo medio de residencia del tiempo 0 al tiempo t; $TMR_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia extrapolado al infinito.

Tabla VI.39: Parámetros farmacocinéticos en abejas de colmenas enfermas con bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en otoño

PARAMETRO	UNIDAD	Colmena 1	Colmena 2	Colmena 3	Colmena 4	Colmena 5	Colmena 6
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/g}$	4,85	4,48	5,04	5,22	4,81	5,00
$T_{m\acute{a}x}$	ds	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
λ	d^{-1}	0,0557	0,0444	0,0657	0,0585	0,0374	0,0619
$T_{1/2}\lambda$	días	12,44	15,62	10,54	11,85	18,55	11,21
ABC_{0-t}	$\mu\text{g.d/g}$	140,75	130,68	147,12	131,40	113,50	108,43
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.d/g}$	141,46	131,81	147,57	132,08	129,56	109,56
TMR_{0-t}	ds	22,64	24,02	18,91	21,17	18,73	16,75
$TMR_{0-\infty}$	ds	23,04	24,72	19,12	21,59	26,66	17,61

$C_{m\acute{a}x}$: máxima concentración observada; $T_{m\acute{a}x}$: tiempo al que se produce la máxima concentración; λ : constante híbrida de eliminación; $T_{1/2}\lambda$: semivida de eliminación; ABC_{0-t} : área bajo la curva del tiempo 0 al tiempo t; $ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva extrapolada al infinito; TMR_{0-t} : tiempo medio de residencia del tiempo 0 al tiempo t; $TMR_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia extrapolado al infinito.

Tabla VI.40: Parámetros farmacocinéticos en miel de colmenas sanas con bajo nivel poblacional en el alza inferior luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en primavera

PARAMETRO	UNIDAD	Colmena 1	Colmena 2	Colmena 3	Colmena 4	Colmena 5	Colmena 6
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/g}$	0,42	0,41	0,52	0,41	0,43	0,42
$T_{m\acute{a}x}$	ds	21,00	21,00	28,00	21,00	21,00	21,00
λ	d^{-1}	0,0230	0,0173	0,0118	0,0120	0,0395	0,0280
$T_{1/2}\lambda$	días	30,16	40,17	58,98	57,92	17,54	24,77
ABC_{0-t}	$\mu\text{g.d/g}$	19,04	22,06	32,48	23,21	22,01	18,42
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.d/g}$	22,52	29,59	48,64	36,58	22,76	19,13
TMR_{0-t}	ds	41,18	44,10	48,71	47,20	41,97	39,08
$TMR_{0-\infty}$	ds	56,68	72,59	93,38	96,30	44,68	42,62

$C_{m\acute{a}x}$: máxima concentración observada; $T_{m\acute{a}x}$: tiempo al que se produce la máxima concentración; λ : constante híbrida de eliminación; $T_{1/2}\lambda$: semivida de eliminación; ABC_{0-t} : área bajo la curva del tiempo 0 al tiempo t; $ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva extrapolada al infinito; TMR_{0-t} : tiempo medio de residencia del tiempo 0 al tiempo t; $TMR_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia extrapolado al infinito.

Tabla VI.41: Parámetros farmacocinéticos en miel de colmenas sanas con bajo nivel poblacional en el alza superior luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en primavera

PARAMETRO	UNIDAD	Colmena 1	Colmena 2	Colmena 3	Colmena 4	Colmena 5	Colmena 6
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/g}$	0,39	0,42	0,36	0,35	0,21	0,39
$T_{m\acute{a}x}$	ds	21,00	21,00	56,00	21,00	43,00	21,00
λ	d^{-1}	0,0164	0,0317	0,0408	0,0070	0,0435	0,0463
$T_{1/2}\lambda$	días	42,14	21,88	16,99	98,45	15,94	14,97
ABC_{0-t}	$\mu\text{g.d/g}$	19,86	17,73	18,06	25,19	9,05	12,13
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.d/g}$	28,37	18,99	19,53	59,27	9,50	12,78
TMR_{0-t}	ds	45,53	39,00	62,51	51,32	51,23	34,99
$TMR_{0-\infty}$	ds	79,52	45,02	67,03	159,85	54,61	39,29

$C_{m\acute{a}x}$: máxima concentración observada; $T_{m\acute{a}x}$: tiempo al que se produce la máxima concentración; λ : constante híbrida de eliminación; $T_{1/2}\lambda$: semivida de eliminación; ABC_{0-t} : área bajo la curva del tiempo 0 al tiempo t; $ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva extrapolada al infinito; TMR_{0-t} : tiempo medio de residencia del tiempo 0 al tiempo t; $TMR_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia extrapolado al infinito.

Tabla VI.42: Parámetros farmacocinéticos en abejas de colmenas sanas con bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en primavera

PARAMETRO	UNIDAD	Colmena 1	Colmena 2	Colmena 3	Colmena 4	Colmena 5	Colmena 6
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/g}$	3,28	3,16	3,30	2,93	3,41	2,71
$T_{m\acute{a}x}$	ds	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
λ	d^{-1}	0,2344	0,2262	0,2306	0,2008	0,2531	0,2309
$T_{1/2}\lambda$	días	2,96	3,06	3,01	3,45	2,74	3,00
ABC_{0-t}	$\mu\text{g.d/g}$	13,06	11,65	12,44	10,44	28,57	10,74
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.d/g}$	13,19	11,78	12,57	10,64	28,61	10,87
TMR_{0-t}	ds	2,11	1,98	2,01	2,04	6,46	2,32
$TMR_{0-\infty}$	ds	2,34	2,24	2,25	2,48	6,49	2,59

$C_{m\acute{a}x}$: máxima concentración observada; $T_{m\acute{a}x}$: tiempo al que se produce la máxima concentración; λ : constante híbrida de eliminación; $T_{1/2}\lambda$: semivida de eliminación; ABC_{0-t} : área bajo la curva del tiempo 0 al tiempo t ; $ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva extrapolada al infinito; TMR_{0-t} : tiempo medio de residencia del tiempo 0 al tiempo t ; $TMR_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia extrapolado al infinito.

Tabla VI.43: Parámetros farmacocinéticos en miel de colmenas sanas con bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en verano

PARAMETRO	UNIDAD	Colmena 1	Colmena 2	Colmena 3	Colmena 4	Colmena 5	Colmena 6
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/g}$	0,51	0,51	0,49	0,45	0,45	0,49
$T_{m\acute{a}x}$	ds	3,00	1,00	3,00	1,00	1,00	1,00
λ	d^{-1}	0,0053	0,0081	0,0111	0,0052	0,0040	0,0054
$T_{1/2}\lambda$	días	129,99	85,39	62,55	132,23	171,69	128,87
ABC_{0-t}	$\mu\text{g.d/g}$	14,87	14,38	12,99	12,88	13,26	14,01
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.d/g}$	99,26	62,42	45,47	85,37	119,77	93,96
TMR_{0-t}	ds	15,42	15,03	14,83	15,28	15,63	15,29
$TMR_{0-\infty}$	ds	188,10	122,15	90,85	190,62	249,58	186,86

$C_{m\acute{a}x}$: máxima concentración observada; $T_{m\acute{a}x}$: tiempo al que se produce la máxima concentración; λ : constante híbrida de eliminación; $T_{1/2}\lambda$: semivida de eliminación; ABC_{0-t} : área bajo la curva del tiempo 0 al tiempo t ; $ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva extrapolada al infinito; TMR_{0-t} : tiempo medio de residencia del tiempo 0 al tiempo t ; $TMR_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia extrapolado al infinito.

Tabla VI.44: Parámetros farmacocinéticos en abejas de colmenas sanas con bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en verano

PARAMETRO	UNIDAD	Colmena 1	Colmena 2	Colmena 3	Colmena 4	Colmena 5	Colmena 6
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/g}$	2,97	3,65	3,14	3,55	3,75	3,56
$T_{m\acute{a}x}$	ds	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
λ	d^{-1}	0,061	0,074	0,108	0,150	0,041	0,062
$T_{1/2}\lambda$	días	11,30	9,43	6,41	4,63	16,96	11,21
ABC_{0-t}	$\mu\text{g.d/g}$	44,67	37,99	31,19	41,38	45,25	32,25
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.d/g}$	51,03	42,61	32,39	42,18	62,62	37,58
TMR_{0-t}	ds	11,54	9,73	8,43	9,34	11,54	10,20
$TMR_{0-\infty}$	ds	16,00	13,52	9,61	9,88	23,73	15,45

$C_{m\acute{a}x}$: máxima concentración observada; $T_{m\acute{a}x}$: tiempo al que se produce la máxima concentración; λ : constante híbrida de eliminación; $T_{1/2}\lambda$: semivida de eliminación; ABC_{0-t} : área bajo la curva del tiempo 0 al tiempo t; $ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva extrapolada al infinito; TMR_{0-t} : tiempo medio de residencia del tiempo 0 al tiempo t; $TMR_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia extrapolado al infinito.

Tabla VI.45: Parámetros farmacocinéticos en larvas de 2 días de colmenas sanas con bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en verano

PARAMETRO	UNIDAD	Colmena 1	Colmena 2	Colmena 3	Colmena 4	Colmena 5	Colmena 6
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/g}$	1,61	2,06	1,49	1,78	1,39	1,3
$T_{m\acute{a}x}$	ds	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
λ	d^{-1}	0,1991	0,3485	0,1896	0,1946	0,3887	0,3672
$T_{1/2}\lambda$	días	3,48	1,99	3,66	3,56	1,78	1,89
ABC_{0-t}	$\mu\text{g.d/g}$	7,63	7,03	7,03	8,48	3,94	3,35
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.d/g}$	8,28	7,78	7,71	9,14	4,27	3,70
TMR_{0-t}	ds	3,77	2,42	3,92	4,15	2,20	2,15
$TMR_{0-\infty}$	ds	4,97	3,13	5,29	5,25	2,78	2,87

$C_{m\acute{a}x}$: máxima concentración observada; $T_{m\acute{a}x}$: tiempo al que se produce la máxima concentración; λ : constante híbrida de eliminación; $T_{1/2}\lambda$: semivida de eliminación; ABC_{0-t} : área bajo la curva del tiempo 0 al tiempo t; $ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva extrapolada al infinito; TMR_{0-t} : tiempo medio de residencia del tiempo 0 al tiempo t; $TMR_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia extrapolado al infinito.

Tabla VI.46: Parámetros farmacocinéticos en larvas de 5 días de colmenas sanas con bajo nivel poblacional luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría en verano

PARAMETRO	UNIDAD	Colmena 1	Colmena 2	Colmena 3	Colmena 4	Colmena 5	Colmena 6
$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/g}$	1,75	2,19	1,81	2,23	1,69	1,89
$T_{m\acute{a}x}$	ds	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
λ	d^{-1}	0,072	0,095	0,131	0,111	0,103	0,444
$T_{1/2}\lambda$	días	9,60	7,33	5,28	6,23	6,74	1,56
ABC_{0-t}	$\mu\text{g.d/g}$	20,66	16,75	10,11	13,02	11,02	5,29
$ABC_{0-\infty}$	$\mu\text{g.d/g}$	23,42	18,12	11,09	14,18	12,28	5,58
TMR_{0-t}	ds	10,00	8,18	5,68	6,36	6,71	2,12
$TMR_{0-\infty}$	ds	14,12	10,71	7,72	8,31	9,18	2,50

$C_{m\acute{a}x}$: máxima concentración observada; $T_{m\acute{a}x}$: tiempo al que se produce la máxima concentración; λ : constante híbrida de eliminación; $T_{1/2}\lambda$: semivida de eliminación; ABC_{0-t} : área bajo la curva del tiempo 0 al tiempo t; $ABC_{0-\infty}$: área bajo la curva extrapolada al infinito; TMR_{0-t} : tiempo medio de residencia del tiempo 0 al tiempo t; $TMR_{0-\infty}$: tiempo medio de residencia extrapolado al infinito.

VI.2.4.3. Tablas de resultados estadísticos

Tabla VI.47: Valores de probabilidad determinados aplicando el Test de Kruskal-Wallis para la comparación estadística de los parámetros farmacocinéticos en colmenas con distinto nivel poblacional en otoño

PARÁMETRO	Miel	Abejas
$C_{\text{máx}}$	0,677	0,004
$T_{\text{máx}}$	0,002	no
$T_{1/2\lambda}$	1,000	0,749
ABC_{0-t}	0,004	0,004
$ABC_{0-\infty}$	1,000	0,006
TMR_{0-t}	0,004	0,004
$TMR_{0-\infty}$	1,000	0,749

Nivel de significación establecido en 0,05

Tabla VI.48: Valores de probabilidad determinados aplicando el Test de ANOVA para la comparación estadística de los parámetros farmacocinéticos en colmenas con distinto nivel sanitario en otoño

PARÁMETRO	Miel	Abejas
$C_{\text{máx}}$	0,382	0,089
$T_{\text{máx}}$	0,104	
$T_{1/2\lambda}$	0,544	0,357
ABC_{0-t}	0,121	0,864
$ABC_{0-\infty}$	0,408	0,960
TMR_{0-t}	0,295	0,400
$TMR_{0-\infty}$	0,533	0,627

Nivel de significación establecido en 0,05

Tabla VI.49: Valores de probabilidad determinados aplicando el Test de Kruskal-Wallis para la comparación estadística de los parámetros farmacocinéticos en miel de la cámara de cría y abejas de colmenas en diferente estadio productivo

PARÁMETRO	Miel	Abejas
$C_{\text{máx}}$	1,000	0,004
$T_{\text{máx}}$	0,002	no
$T_{1/2\lambda}$	0,004	0,004
ABC_{0-t}	0,025	0,004
$ABC_{0-\infty}$	0,004	0,004
TMR_{0-t}	0,025	0,004
$TMR_{0-\infty}$	0,004	0,004

Nivel de significación establecido en 0,05

Tabla VI.50: Valores de probabilidad determinados aplicando el Test de ANOVA para la comparación estadística de los parámetros farmacocinéticos en miel de la cámara de cría y del alza melaria en colmenas de bajo nivel poblacional en primavera

PARÁMETRO	Miel de diferentes alzas
$C_{m\acute{a}x}$	0,066
$T_{m\acute{a}x}$	0,161
$T_{1/2}\lambda$	0,114
ABC_{0-t}	0,031
$ABC_{0-\infty}$	0,068
TMR_{0-t}	0,544
$TMR_{0-\infty}$	0,419

Nivel de significación establecido en 0,05

Tabla VI.51: Valores de probabilidad determinados aplicando el Test de ANOVA a los parámetros farmacocinéticos logotransformados y el Test de contraste múltiples de rango para la comparación estadística entre los diferentes habitantes de la colmena

PARÁMETRO	ANOVA	CONTRASTE DE MÚLTIPLE RANGO		
		Abejas y L2 días	Abejas y L5 días	L2 y L5 días
$C_{m\acute{a}x}$	0,0000	0,334	0,252	-0,082
$T_{m\acute{a}x}$	no	no	no	no
λ	0,0019	-0,550	-0,233	0,317
$T_{1/2}\lambda$	0,0019	0,549	0,233	-0,317
ABC_{0-t}	0,0000	0,813	0,514	-0,300
$ABC_{0-\infty}$	0,0000	0,832	0,531	-0,301
TMR_{0-t}	0,0376	-0,296	-0,296	0,000
$TMR_{0-\infty}$	0,0005	0,557	0,255	-0,302

VI.2.4.4. Figuras

Figura VI.2: Curvas de disposición individual en miel (A) y abejas (B) de colmenas sanas con alto nivel poblacional en otoño luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría

Figura VI.3: Curvas de disposición individual en miel (C) y abejas (D) de colmenas sanas con bajo nivel poblacional en otoño luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría

Figura VI.4: Curvas de disposición individual en miel (E) y abejas (F) de colmenas enfermas de bajo nivel poblacional en otoño luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría

Figura VI.5: Curvas de disposición individual en miel (G, H y J) y abejas (I) de colmenas sanas de bajo nivel poblacional en primavera luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría

Figura VI.6: Curvas de disposición individual en miel (K), abejas (L) y larvas (5 y 2 días) (M y N) de colmenas sanas de bajo nivel poblacional en verano luego de la administración de 600 mg de tilosina por espolvoreo en la cámara de cría

VI.3. ESTABILIDAD

Tabla VI.52: Valoración de tilosina en miel almacenada a 4°C, 20°C y 35°C durante 357 días iniciando el estudio con una concentración de 1 µg/g

Tpo(ds)	35°C		20°C		4°C	
	muestra A	muestra B	muestra A	muestra B	muestra A	muestra B
0	1,15	1,20	1,15	1,32	1,26	1,48
21	0,84	1,45	1,29	1,31	1,40	1,44
42	1,10	1,15	1,41	1,35	1,17	1,32
63	1,17	1,02	1,47	1,25	1,45	1,28
84	0,66	1,00	1,32	1,34	1,53	1,52
105	0,97	0,86	1,35	1,35	1,35	1,45
126	1,11	1,08	1,18	1,21	1,27	1,33
147	0,85	0,92	1,16	1,16	1,21	1,21
168	0,96	1,11	1,01	1,18	1,36	1,36
189	0,83	0,90	1,34	0,98	1,34	1,48
210	0,69	0,69	0,88	1,03	1,19	1,23
231	0,66	0,83	1,06	1,00	1,21	1,34
252	0,72	0,83	1,16	0,88	1,44	1,33
273	0,99	0,93	1,10	1,04	1,26	1,15
294	0,77	0,87	1,03	1,13	1,43	1,23
315	0,65	0,65	1,08	1,14	1,21	1,39
336	0,96	0,55	0,92	1,02	1,12	1,19
357	0,89	0,65	1,00	1,12	1,29	1,23

Tabla VI.53: Valoración de tilosina en miel almacenada a 4°C, 20°C y 35°C durante 357 días iniciando el estudio con una concentración de 2 µg/g

Tpo(ds)	35°C		20°C		4°C	
	muestra A	muestra B	muestra A	muestra B	muestra A	muestra B
0	1,82	2,15	1,82	2,15	2,15	2,21
21	1,97	1,93	1,93	1,80	1,97	1,86
42	2,18	2,10	2,10	2,04	2,18	2,28
63	1,97	1,79	1,91	2,23	2,24	2,28
84	1,86	1,74	1,97	2,03	2,08	2,03
105	1,93	1,40	1,87	1,96	2,11	2,22
126	1,82	1,86	1,96	2,04	2,13	2,14
147	1,85	1,80	1,89	1,97	2,06	2,00
168	1,62	1,99	1,93	1,93	2,24	2,18
189	1,80	1,80	1,94	2,07	2,10	2,17
210	1,44	1,75	1,81	1,69	1,87	1,87
231	1,52	1,74	1,86	1,86	1,86	2,03
252	1,72	1,61	1,72	1,72	2,05	1,97
273	1,77	1,66	1,59	1,67	1,92	1,86
294	1,74	1,43	1,66	1,84	1,99	1,91
315	1,67	1,70	1,78	1,95	2,04	2,24
336	1,69	1,38	1,74	1,79	2,00	1,94
357	1,52	1,63	1,79	1,84	1,95	1,93

Tabla VI.54: Semivida de eliminación de 0,5 µg/g de tilosina en miel a diferentes temperaturas

Temperatura	Días	Meses	Años
4°C	486,89	16,23	1,33
20°C	299,30	9,98	0,82
35°C	198,57	6,62	0,54
65°C	97,49	3,25	0,27

VII. REFERENCIAS

VII. REFERENCIAS

1. CAA. Anexo MERCOSUR. Res.GMC 15/94. Identidad y calidad de la miel. Código Alimentario Argentino; 1994.
2. Codex Alimentarius FAO/WHO. Codex Norma para la miel-Codex stan 12-1981. 2001.
3. SAGPyA. La miel: dulce alimento natural-Primera y segunda parte. 2004. Dirección de Industria Alimentaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. 28-10-2008.
4. Triccó HR. Producción de mieles especiales con valor agregado. 2002.
5. Dadant, Langstroth. La abeja y la colmena.Tercera Edición. Barcelona: Gu; 1935.
6. Piana G, Ricciardelli D´Albore G, Isola A. La miel. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa; 1989.
7. Jean Prost P, Médori P, Le Conte Y. Miel. Apicultura. Conocimiento del la abeja. Manejo de la colmena. 4.^a edición ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa; 2007. p. 437-86.
8. Ricciardelli D´Albore G, Persano Oddo L. Flora apistica italiana. Roma: Federazione Apicoltori Italiana; 1981.
9. Mateu A, Burgaz Moreno ME, Rosello Caselles J. La apicultura Valenciana. Tradición y aprovechamiento Generalitat Valenciana. Conselleria D´Agricultura, Pesca. España. Generalitat Valenciana. Conselleria D´Agricultura, Pesca. España; 1993.
10. Piccirillo GA, Rodríguez B, Ojeda de Rodríguez G. Estudio de algunos parámetros fisicoquímicos en mieles cosechadas durante la época seca de ocho zonas apícolas del Estado Zulia, Venezuela. Rev Fac Agron (LUZ) 1998;15:486-97.
11. Ramírez Cervantes. Efecto del tratamiento térmico temporal de la miel sobre la variación de su calidad durante el almacenamiento. Apiacta 2000;35(4):162-70.
12. Bogdanov S, Lüllmann C, Martín P, Russmann H, Vorwohl G, Persano Oddo L, et al. Calidad de la miel de abeja y estándares de control: Revisión realizada por la Comisión Internacional de la Miel. Galeria Apícola Virtual 2000;1-13.
13. Gonnet M, Vache G. El sabor de la miel. Análisis sensorial y diferentes aplicaciones de un método para evaluar la calidad de los tipos de miel. 1992.
14. White JWJr. Composición Promedio de Miel y Variación de Valores. Departamento de Agricultura[Material Mimeografiado]. 1962. Estados Unidos de América.
15. Terrab H, Vega JM, Diez MJ, Heredia FJ. Characterisation of northwest Moroccan honeys by gas chromatographic-mass spectrometric analysis of their sugar components. J Sci Food Agric 2002;82(2):179-85.
16. Subovsky MJ, Sosa López A, Castillo AE, Verdun CE, Oggero RE. La determinación de los parámetros físico-químicos en miel de abejas de la provincia de Corrientes Argentina, y

su relación con la cosecha y procesamiento. Revista Científica Agropecuaria 2003;7(2):61-4.

17. Bianchi EM. Control de calidad de la miel y la cera. Ed. U.N. Santiago del Estero; 1990.
18. Ciappini MC. El análisis sensorial de la miel. La alimentación latinoamericana 2005;160:39-41.
19. Tabera AE, Libonatti CC, Díaz MD. Relevamiento de muestras de mieles procedentes de la zona de Tandil. 2003.
20. Assil HI, Sterling R, Sporns P. Crystal Control In Processed Liquid Honey. Journal of Food Science 1991;56(4):1034-7.
21. Manikis I, Thrassivoulou A. The relation of physicochemical characteristics of honey and the crystallization sensitive parameters. Apiacta 2001;36(2):106-12.
22. CAA. Anexo MERCOSUR. Res.GMC 56/99. Identidad y calidad de la miel. Código Alimentario Argentino; 1999.
23. Iurlina MO, Fritz R. Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. Int J Food Microbiol 2005;105:297-304.
24. Molan PC. The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. Bee World 1992;73:5-28.
25. Rodríguez Montoya MC. Composición, calidad y consumo de miel en España. 2003. 23-6-2009.
26. Molan PC, Russell KM. Non-peroxide antibacterial activity in some New Zealand honeys. Journal of Apicultural Research 1988;27:62-7.
27. Weston RJ, Mitchell KR, Allen KL. Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. Food Chemistry 1999;64:295-301.
28. Molan PC. Potential of honey in the treatment of wounds and burns. American Journal of Clinical Dermatology 2001;2(1):13-9.
29. Subrahmanyam M, Archan H, Pawar S. Antibacterial activity of honey on bacteria isolated from wounds. Annals of Burns and Fire Disasters 2001;14:23-9.
30. Nevas M, Hielm S, Lindstrom A, Horn H, Koivulehto K, Korkeala H. High prevalence of Clostridium botulinum types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction. Int J Food Microbiol 2002;72:45-52.
31. Salamanca Grosso G, Henao Rojas C, Moreno I, Luna A. Características microbiológicas de las mieles tropicales de Apis mellifera. Galeria Apícola virtual.Apiservices. 2001.
32. Piana ML, Poda G, Cesaroni D, Cuetti L, Bucci MA, Gotti P. Research on microbial characteristics of honey samples of Udine province. Riv Soc Ital Sci Aliment 1991;20:293-301.

33. Snowdon JA, Cliver DO. Microorganisms in honey. *Int J Food Microbiol* 1996;31:1-26.
34. de Centorbi PO, Satorres EE, Alcaraz LE, Centorbi HJ, Fernandez R. Detection of *Clostridium botulinum* spores in honey. *Rev Argent Microbiol* 1997;29.
35. SAGPyA. Guía de aplicación de buenas prácticas apícolas y de manufactura. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación; 2003.
36. Finola MS, Lasagno MC, Marioli JM. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chemistry* 2007;100(4):1649-53.
37. Arrabal MV, Ciappini MC. Aceptabilidad de miel y su correlación con análisis fisicoquímicos. *Galeria Apícola Virtual* 1999.
38. Bogdanov S. Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 1997;30(7):748-56.
39. Waikato Honey Reserach Unit. Honey as an antimicrobial agent. The University of Waikato . 1997. 26-3-2007.
40. Zumla A, Lulat A. Honey-a remedy rediscovered. *J Royal Soc Med* 1989;82:384-5.
41. Armon PJ. The use of honey in the treatment in the treatment of infected wounds. *Trop Doct* 1980;10:91.
42. Forrest RD. Early history of wound treatment. *J R Soc Med* 1982;75:198-205.
43. Effem SEE. Clinical observations on the wound healing properties of honey. *Br J Surg* 1988;75:679-81.
44. Kahn FR, Abadin ZUI, Rauf N. Honey: nutritional and medicinal value. *Int J Clin Pract* 2007;61(10):1705-7.
45. Al Somai N, Coley KE, Molan PC, Hancock BM. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of Manuka honey. *J Royal Soc Med* 1994;87:9-12.
46. Haffejee IE, Moosa A. Honey in the treatment of infantile gastroenteritis. *Br Med J* 1985;290:1866-7.
47. Allen KL, Molan PC. The sensitivity of mastitis-causing bacteria to the antibacterial activity of honey. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 1997;40:537-40.
48. Brady NF, Molan PC, Harfoot CG. The sensitivity of dermatophytes to the antimicrobial activity of manuka honey and other honey. *Pharm Sci* 1997;1997(2):1-3.
49. Vázquez F. Apicultura.Perfiles productivos. Sector Apícola.Dirección Nacional de Alimentos.Dirección de industria Alimentaria.Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. 2007. 22-2-2009.

50. Nimo M. Cadena de la miel. Análisis del sector. Dirección Nacional de Alimentos.Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación.Ministerio de la producción. 2003. 15-6-2006.
51. SAGPyA. Sector apícola argentino. Dirección Nacional de Agroindustrias.Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. 2009. 22-10-2010.
52. Nimo M. Miel. Análisis de cadena alimentaria. Sector Apícola.Dirección Nacional de Alimentos.Dirección de industria Alimentaria.Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. 2005. 15-6-2006.
53. SAGPyA. Estadísticas anuales de exportación de miel en Argentina. Dirección Nacional de Agroindustrias. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación; 2009.
54. Carlevari IJF, Carlevari RD. La Argentina: estructura humana y económica. Buenos Aires: Ediciones Macchi; 1994.
55. Rodríguez G. Sanidad mas calidad. Revista Idia XXI 2003;5:23-7.
56. Figini E, Bedascarrasbure E. Hacia una apicultura competitiva. Revista Idia XXI 2003;5:14-7.
57. Genersch E, Forsgren E, Pentikainen J, Ashiralieva A, Rauch S, Kilwinski J, et al. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. Int J Syst Evol Microbiol 2006 Mar;56(Pt 3):501-11.
58. Borracci SE, Chacana PA, Palacio A, Terzolo HR. Loque Americana de las abejas: Características y diagnóstico de la enfermedad. 2-4-2004. INTA Balcarce. 27-4-2009.
59. Hansen H, Brodsgaard C. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and bee control. Bee World 1999;80:5-23.
60. Antunez K, D'Alessandro B, Piccini C, Corbella E, Zunino P. *Paenibacillus larvae larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey. J Invertebr Pathol 2004 May;86(1-2):56-8.
61. Ashiralieva A, Genersch E. Reclassification, genotypes and virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood in honeybees: a review. Apidologie 2006;37:411-20.
62. Alippi AM. Characterization of *Bacillus larvae* White, the causative agent of American foulbrood of honey-bees. First record of its occurrence in Argentina. Rev Argent Microbiol 1992;24:67-72.
63. Alippi AM, Reynaldi FJ, Lopez AC, De Giusti MR, Aguilar OM. Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae larvae* and incidence of American Foulbrood in Argentinean honeys from Buenos Aires Province. Journal of Apicultural Research 2004;43:135-43.
64. Ellis J, Munn PA. The worldwide health status of honey bees. Bee World 2005;86:88-101.

65. SENASA. Manual de procedimientos. Enfermedades de las abejas. 2005. Secretaria de Sanidad Animal.
66. Katznelson H. *Bacillus pulvifaciens* (n.sp.), an organism associated with powdery scale of honey-bee larvae. J Bacteriol 1950;59:153-5.
67. Ash C, Priest FG, Collins MD. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. Antonie Van Leeuwenhoek 1993;64(3-4):253-60.
68. Heyndrickx M, Vandemeulebroecke K, Hoste B, Janssen P, Kersters K, De VP, et al. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 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 1996 Jan;46(1):270-9.
69. Shimanuki H, Knox D. Diagnosis of honey bee diseases. Agricultural Handbook No.H-690.Washington DC: Agriculture Research Service, US Department of Agriculture; 2000. p. 61.
70. OIE. American foulbrood of honey bees. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 6th edition.Paris, France: Office International des Epizooties; 2008. p. 395-404.
71. Alippi AM. Bacterial disease. In: Colin ME, Ball BV, Kilani M, editors. Bee Disease Diagnosis.Zaragoza, España: Options Méditerranées; 1999. p. 31-59.
72. Haseman L. How long can spores of American foulbrood live? American Bee Journal 1961;101:298-9.
73. Matheson A, Reid M. Strategies for the prevention and control of American Foulbrood.Part I. American Bee Journal 1992;132:399-402.
74. Bruno SB. Enfermedades de las abejas. Nociones prácticas. Editorial Ciencia y Abejas; 2003.
75. Dingman D, Stahly D. Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. Applied Environmental Microbiology 1983;46:860-9.
76. Shimanuki H, Knox D. Diagnosis of honey bee diseases. Agricultural Handbook No.H-670.Washington DC: Agriculture Research Service, US Department of Agriculture; 1991. p. 4-12.
77. Gordon R, Haynes W, Pang C. The genus *Bacillus*. Agriculture Handbook No 427.Washington: Agricultural Research Service, USDA; 1973. p. 283.
78. Schuch DMT, Madden RH, Sattler A. An improved method for the detection and presumptive identification of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in honey. Journal of Apicultural Research 2001;40(2):59-64.

79. Hornitzky M, Karlovskis S. A culture technique for the detection of *Bacillus larvae* in honeybees. *Journal of Apicultural Research* 1989;28(2):118-20.
80. Bailey L, Ball BV. Honey bee pathology. 2nd. Edition. London: Academic Press; 1991.
81. Shimanuki H. Bacteria. In: Morse R, Flottum K, editors. *Honey Bee Pests, Predators, and Disease, third.ed.* Medina, Ohio: A.I. Root Co; 1997. p. 33-54.
82. Alippi AM. Biología, daños y riesgos en el tratamiento químico de la loque americana y loque europea. 1-17. 2003.
83. Ratnieks FLW. American foulbrood: the spread and control of an important disease of the honey bee. *Bee World* 1992;73(4):177-91.
84. Brodsgaard C, Hansen H, Ritter W. Response of in vitro reared honeybee larvae to various doses of *Paenibacillus larvae larvae* spores. *Apidologie* 1998;29:569-78.
85. Genersch E, Ashiralieva A, Fries I. Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees. *Appl Environ Microbiol* 2005 Nov;71(11):7551-5.
86. MAF. Import risk analysis: Honey bee products. Wellington, New Zealand: Ministry of Agriculture and Forestry; 2004 Dec 15.
87. Fries I, Lindstrom A, Korpela S. Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honey bees (*Apis mellifera*). *Vet Microbiol* 2006 May 31;114(3-4):269-74.
88. Alippi AM. A comparision of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera* in Argentina. *J Apic Res* 1991;30:75-80.
89. Lloyd JM. Simplified laboratory diagnosis of American foulbrood disease. *Journal of Apicultural Research* 1986;25(1):55-7.
90. Alippi AM. Detection de *Bacillus larvae* en poblaciones mixtas de esporas bacterianas a partir de restos larvales. *Microbiología SEM* 1992;8:115-8.
91. Alippi AM. Characterization of isolates of *Paenibacillus larvae* with biochemical type and oxytetracycline resistance. *Rev Argent Microbiol* 1996 Oct;28(4):197-203.
92. Reynaldi FJ, Alippi AM. Optimization of the growth of *Paenibacillus larvae* in semi-selective media. *Rev Argent Microbiol* 2006 Apr;38(2):69-72.
93. Alippi AM, Aguilar OM. Characterization of isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* from diverse geographical origin by the polymerase chain reaction and BOX primers. *J Invertebr Pathol* 1998;72:21-7.
94. Alippi AM, Aguilar OM. Unique fingerprints of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* strains. *Journal of Apicultural Research* 1998;37:273-80.

95. Alippi AM, Lopez AC, Aguilar OM. A PCR-based method that permits specific detection of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American foulbrood of honey bees, at the subspecies level. *Lett Appl Microbiol* 2004;39:25-33.
96. Govan VA, Allsop MH, Davison S. A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:2243-5.
97. Piccini C, D'Alessandro B, Antunez K, Zunino P. Detection of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae* spores in naturally infected bee larvae and artificially contaminated honey by PCR. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2002;18:761-5.
98. Antunez K, Piccini C, Castro-Sowinski S, Rosado AS, Seldin L, Zunino P. Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus larvae* isolates. *Vet Microbiol* 2007 Sep 20;124(1-2):178-83.
99. Alippi AM, Lopez AC, Aguilar OM. Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American foulbrood of honey bees, by using PCR and restriction fragment analysis of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:3655-60.
100. Lauro FM, Favaretto M, Covolo L, Rassu M, Bertoloni G. Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *Int J Food Microbiol* 2003;81:195-201.
101. Otte E. Contribution to the laboratory diagnosis of American foulbrood of the honey bee with particular reference to the fluorescent antibody technique. *Apidologie* 1973;4:331-9.
102. Spivak M, Reuter G. Performance of hygienic honey bee colonies in a commercial apiary. *Apidologie* 1998;29:291-302.
103. Spivak M, Reuter G. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies, *Apis mellifera*, bred for hygienic behavior. *Apidologie* 2001;32:555-65.
104. Matheson A, Reid M. Strategies for the prevention and control of American Foulbrood. Part II. *American Bee Journal* 1992;133:471-5.
105. Del Hoyo M, Basualdo M, Torres J, Bedascarrasbure E. Use of DHT-equipment for disinfection of AFB-contaminated beehive materials in Argentina. *American Bee Journal* 1998;138:738-40.
106. Hornitzky M, Wills PA. Gamma radiation inactivation of *Bacillus larvae* to control American foulbrood. *Journal of Apicultural Research* 1983;22(3):196-9.
107. Hornitzky M. Commercial use of gamma radiation in the beekeeping industry. *Bee World* 1994;75:135-42.
108. Okayama A, Sakogawa T, Nakajima C, Hayama T. Sporocidal activities of disinfectants on *Paenibacillus larvae*. *Journal of Veterinary Medicine Science* 1997;59(10):953-4.
109. Chacana PA, Borracci SE, Audisio MC, Gallardo GL, Palacio A, Terzolo HR. Loque Americana de las abejas: Tratamiento y prevención. 4-2-2004. 10-3-2006.

110. Antunez K, Harriet J, Gende L, Maggi M, Eguaras M, Zunino P. Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood. *Vet Microbiol* 2008 Oct 15;131(3-4):324-31.
111. Bastos EM, Simone M, Jorge DM, Soares AE, Spivak M. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol* 2008 Mar;97(3):273-81.
112. Albo GN, Henning C, Ringuelet JA, Reynaldi FJ, De Giusti MR, Alippi AM. Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American Foulbrood disease in honey bees. *Apidologie* 2003;34:417-37.
113. Fuselli SR, Gende LB, Garcia De La Rosa SB, Eguaras MJ, Fritz R. Short communication. Inhibition of *Paenibacillus larvae* subsp *larvae* by the essential oils of two wild plants and their emulsifying agents. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2005;3(2):220-4.
114. Fuselli SR, Garcia De La Rosa SB, Gende LB, Eguaras MJ, Fritz R. Inhibition of *Paenibacillus larvae* employing a mixture of essential oils and thymol. *Rev Argent Microbiol* 2006 Apr;38(2):89-92.
115. González MJ, Marioli JM. Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood. *J Invertebr Pathol* 2010 Jul;104(3):209-13.
116. Flesar J, Havlik J, Kloucek P, Rada V, Titera D, Bednar M, et al. In vitro growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus larvae* and their acute oral toxicity to adult honey bees. *Vet Microbiol* 2010 Sep 28;145(1-2):129-33.
117. Alippi AM, Reynaldi FJ. Inhibition of the growth of *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood of honeybees, by selected strains of aerobic spore-forming bacteria isolated from apiarian sources. *J Invertebr Pathol* 2006 Mar;91(3):141-6.
118. Evans J, Armstrong TN. Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. *BMC Ecology* 2006;6(1):4.
119. Yoshiyama M, Kimura K. Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. *J Invertebr Pathol* 2009 Oct;102(2):91-6.
120. Prescott JF. Lincosamidas, macrólidos y pleuromutilinas. In: Prescott JF, Baggot JD, Walker RD, editors. *Terapéutica antimicrobiana*. Tercera Edición ed. Buenos Aires: Editorial Intermédica; 2002. p. 204-32.
121. Wright GD, Chu DTW. Tetracycline, aminoglycoside, macrolide, and miscellaneous antibiotics. In: Abraham DJ, editor. *Burger's medicinal chemistry and drug discovery*. Six edition ed. John Wiley and Sons, Inc.; 2003. p. 737-807.
122. Katzung BG. Chloramphenicol, Tetracyclines, Macrolides, Clindamycin, & Streptogramins. *Basic & Clinical Pharmacology*. 9 th ed. McGraw-Hill; 2007. p. 1055-70.

123. Lucas MF, Mestorino N, Errecalde JO. Macrólidos: novedades de un clásico grupo de antimicrobianos. *Analecta Vet* 2007;27(1):36-45.
124. Mulazimoglu L, Tulkens PM, Van Bambeke F. Macrolides. In: Yu VL, Edwards G, McKinnon PS, Peloquin C, Morse GD, editors. *Antimicrobial Therapy and Vaccines, Volumen II: Antimicrobial Agents*. 2nd Edition ed. Pittsburg: Esun Technologies; 2005. p. 199-236.
125. Soo JW, Riviere JE. Cloramfenicolo, macrolidi, lincosamidi. In: Adams RH, editor. *Farmacología e Terapeutica Veterinaria*. 2 Edizione italiana sulla 7 edizione americana ed. Roma: Edizioni Mediche Scientifiche Internazionali; 1999. p. 917-27.
126. Sábada B, Azanza JR. Antibióticos macrólidos y otros antibióticos. In: Leza Cerro JC, Lizasoain Hernández I, Lorenzo Fernández P, Moreno González A, Moro Sánchez MA, editors. *Velásquez Farmacología básica y clínica*. 20^a Ed ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 2005. p. 825-39.
127. Mestorino N, Errecalde JO. Tilmicosina: Un Nuevo antibiótico macrólido de uso veterinario. *Analecta Veterinaria* 2004;24:21-8.
128. McGuire JM, Boniece WS, Higgins CE, Hoehn MM, Stark WM, Westhead J, et al. Tylosin, a new antibiotic: I. Microbiological studies. *Antibiot Chemother* 1961 May;11:320-7.
129. Lewicki J. Tylosin. A review of pharmacokinetics, residues in food animals and analytical methods. 2006. 24-2-2009.
130. Teeter JS, Meyerhoff RD. Aerobic degradation of tylosin in cattle, chicken, and swine excreta. *Environ Res* 2003;93:45-51.
131. Kirst HA, Wild GM, Baltz RH, Hamill RL, Ott JL, Counter FT, et al. Structure-activity studies among 16-membered macrolide antibiotics related to tylosin. *J Antibiot (Tokyo)* 1982;35(12):1675-82.
132. Hamill RL, Haney ME, Jr., Stamper MC, Wiley PF. Tylosin, a new antibiotic: II. Isolation, properties, and preparation of desmycosin, a microbiologically active degradation product. *Antibiot Chemother* 1961 May;11:328-34.
133. Kochansky J, Knox D, Shimanuki H. Comparative stability of oxytetracycline and tylosin in sugar syrup. *Apidologie* 1999;30:312-26.
134. Katznelson H. Stability of antibiotics in honey. *American Bee Journal* 1956;96:137.
135. Amsden GW, Ballow CH, Bertino JS Jr. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 253-61.
136. Craig W. Choosing an antibiotic on the basis of pharmacodynamics. *Ear Nose Throat J* 1998;77:7-11.
137. CVMP-EMEA. Tylosin summary report 3. EMEA/MRL/205/97-FINAL. 1997.

138. Chamberland S. Intracellular accumulation of tylosin in primary swine and bovine alveolar macrophages. Québec, Canadá; 1993. Report No.: Unpublished study from Département de Microbiologie, Centre de Recherche du CHUL, Université Laval, Ste-Foy.
139. Zweers-Zeilmaker WM, Van Miert ASJAM, Horbach GJ, Witkamp RF. In vitro complex formation and inhibition of hepatic cytochrome P450 activity by different macrolides and tiamulin in goats and cattle. *Res Vet Sci* 1999;66(1):51-5.
140. CVMP-EMEA. Tylosin summary report. Comisión Regulation N 3093/92. 1992.
141. Papich MG, Riviere JE. Cloranfenicol y derivados, macrólidos, lincosamidas y otros antibióticos. In: Adams RH, editor. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. 2 Edición española (8 ed. inglesa) ed. Zaragoza: Editorial Acribia S.A.; 2003. p. 929-59.
142. Prescott JF. Resistencia a fármacos antimicrobianos y su epidemiología. In: Prescott JF, Baggot JD, Walker RD, editors. *Terapéutica antimicrobiana*. Tercera Edición ed. Buenos Aires: Editorial Intermédica; 2002.
143. VEVPA. Vademecum específicos veterinarios argentinos. 2009. 10-12-2010.
144. Anderson RC, Worth HM, Small RM, Harris PN. Toxicological studies on tylosin: its safety as a food additive. *Food Cosmet Toxicol* 1966;4:1-15.
145. Errecalde JO. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. FAO; 2004.
146. Anadón AD. Antibióticos de uso veterinario y su relación con la seguridad alimentaria y salud pública Real Academia de Ciencias Veterinarias; 2007.
147. Codex Alimentarius FAO/WHO. Codex Alimentarius-Alimentos producidos orgánicamente. Tercera edición. Roma: 2007.
148. JECFA FAO/WHO. Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. FAO; 1999.
149. Prescott JF. Acciones e interacciones de los fármacos antimicrobianos: introducción. In: Prescott JF, Baggot JD, Walker RD, editors. *Terapéutica antimicrobiana*. Tercera Edición ed. Buenos Aires: Editorial Intermédica; 2002. p. 1-8.
150. Cerniglia CE, Kotarski S. Approaches in the safety evaluation of veterinary antimicrobial agents in food to determine the effects on the human intestinal microflora. *J Vet Pharmacol Ther* 2005;28:3-20.
151. Waltner-Toews D, McEwen SA. Residues of hormonal substances in foods of animal origin: a risk assesment. *Prev Vet Med* 1994;20:235-47.

152. Anadón AD. Residuos de medicamentos y aditivos en los alimentos de origen animal. Guía Veterinaria de Cataluña , 100-108. 1995. Consejo de Colegios Veterinarios de Cataluña.
153. Otero JL. Determinación del comportamiento farmacocinético y de la disposición de residuos de enrofloxacin en ovinos. La Plata, Argentina: Universidad Nacional de La Plata; 2006.
154. Sundlof SF. Drug and chemical residues in livestock. Vet Clin North Am Food Anim Pract 1989;5:411-47.
155. Sundlof SF. Human health risks associated with drug residues in animal-derived foods. Journal of Agromedicine 1994;1(2):5-22.
156. Gomes ER, Demoly P. Epidemiology of hypersensitivity drug reactions. Curr Opin Allerg Clin Immunol 2005;5:309-16.
157. Dayan AD. Allergy to antimicrobial residues in food: assessment of the risk to man. Vet Microbiol 1993;35:213-26.
158. Raison-Peyron N, Messaad D, Bousquet J, Demoly P. Anaphylaxis to beef in penicillin-allergic patient. Allergy 2001;56:796-7.
159. Paturkar AM, Waskar VS, Mokal KV, Zende RJ. Antimicrobial drug residues in meat and their public health significance-a review. Ind J Anim Sci 2005;75:1103-11.
160. FAO/WHO. Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. Geneva: International Programme on Chemical Safety; 1994.
161. FAO/WHO. Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. 42th meeting of the JECFA ed. Geneva: International Programme on Chemical Safety; 1995.
162. Mestorino N, Errecalde JO. Cloranfenicol-Tianfenicol: Aspectos farmacológicos. Revista de Medicina Veterinaria 1990;71(4):178-81.
163. Mestorino N, Errecalde JO. Chloramphenicol pharmacokinetics after intravenous and intramuscular administration in sheep. J Vet Med A 1998;45:175-80.
164. Corpet DE, Brugere HB. Résidues antibiotiques dans les aliments d'origine animale: conséquences microbiologiques, évaluation de la dose sans effet chez l'homme. Rev Méd Vét 1995;146(2):73-82.
165. Boisseau J. Basis for the evaluation of the microbiological risks due to drug residues in food. Vet Microbiol 1993;35:187-92.
166. Tancrede C. Ecological impact of low doses of oxytetracycline on human intestinal microflora. Journal of Veterinary Medicine 1989;42:35-9.
167. Gorbach SL. Perturbation of intestinal microflora. Vet Hum Toxicol 1993;35:31-6.

168. Holmberg SD, Osterholm MT, Senger KA, Cohen ML. Drug-resistant *Salmonella* from animals fed antimicrobials. N Engl J Med 1984;311(10):617-22.
169. Angulo FJ, Tauxe RV, Cohen ML. Use of quinolones in food animals and potential impact on human health. Geneve, Switzerland: WHO Emerging and other Communicable Diseases, Surveillance and Control; 1998.
170. Doyle ME. Veterinary drug residues in processed meats. Potencial health risk. Food Research Institute Briefings; 2006.
171. Dechet AM, Scallan E, Gensheimer K, Hoekstra R, Gundersman-King J, Lockett J, et al. Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* Definitive Type 104 infection linked to commercial ground beef, northeastern United States, 2003-2004. Clin Infect Dis 2006;42:747-52.
172. GAO/RCED. Food Safety: The agricultural use of antibiotics and its implications for human health. 1999. Report No.: 99-74.
173. Turnidge J. Antibiotic use in animals: prejudices, perceptions and realities. J Antimicrob Chemother 2004;53:26-7.
174. JECFA FAO/WHO. Evaluación de ciertos residuos de fármacos de uso veterinario en los alimentos (36o informe). Geneve: FAO/WHO; 1990. Report No.: No 799.
175. FAO/WHO. Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Toxical evaluation of certain veterinary drug residues in food. 70th meeting of the JECFA ed. Geneve: International Programme on Chemical Safety; 2009.
176. Anderson RC, Harris PN, Lee CC, Maze N, Small RM, Worth HM. The toxicology and pharmacology of tylosin, an antibiotic and some salts of tylosin. Indianapolis, IN, USA: Elanco Animal Health, Division of Eli Lilly and Company; 1966. Report No.: VAR.100/c/9.
177. CVMP-EMA. Tylosin summary report 5. Extension to all food producing species. EMA/MRL/829/02-FINAL. 2002.
178. CVMP-EMA. Tylosin summary report 4. Extension to eggs. EMA/MRL/732/00-FINAL. 2000.
179. OIE. Resolution XXXIII. List of antimicrobials of veterinary importance. 2006. Report No.: Adopted by the international committee of the oie on may 2006.
180. Codex Alimentarius Commission FAO/OMS. Límites máximos de residuos para medicamentos veterinarios en los alimentos. Actualizado en 32ª Sesión de la Comisión del Codex Alimentarius (Julio 2009). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. FAO; 2009.
181. Walker RD. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana e interpretación de los resultados. In: Prescott JF, Baggot JD, Walker RD, editors. Terapéutica antimicrobiana. Tercera Edición ed. Buenos Aires: Editorial Intermédica; 2002. p. 9-21.

182. Jacobs MR. Optimisation of antimicrobial therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Clinical Microbiology and Infection* 2001;7(11):589-96.
183. Lees P, Aliabadi FS. Rational dosing antimicrobial drugs: animals versus humans. *Int J Antimicrob Agents* 2002;19:269-84.
184. Andes D, Craig W. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of outpatient intravenous antimicrobial therapy. *Infect Dis Clin North Am* 1998;112:849-60.
185. Liu P, Müller M, Derendorf H. Rational dosing of antibiotics: the use of plasma concentrations versus tissue concentrations. *Int J Antimicrob Agents* 2002;19:285-90.
186. Van Bambeke F, Tulkens PM. Macrolides: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Int J Antimicrob Agents* 2001;18:S17-S23.
187. Craig W. Does the dose matter? *Clin Infect Dis* 2001;33(Supplement 3):233-7.
188. Craig W. Pharmacokinetic-pharmacodynamic parameters: rationale for antibiotic use in mice and men. *Clin Infect Dis* 1998;26:1-12.
189. Craig W. Antimicrobial resistance issues of the future. *Microbiol Infect Dis* 1996;25:213-7.
190. Turrel MJ. A history of the use of drugs in the prevention and cure of American foulbrood. *American Bee Journal* 1974;114(1):13-5.
191. Haseman L, Childers L. A history of the use of drugs in the prevention and cure of American Foulbrood citado por Turrel 1974. *American Bee Journal* 1944;114(1):13-7.
192. Haseman L. An overview of foulbrood in the United States: the past 45 years citado por Wilson 2000. *Bee Culture* 1946;128(10):24-8.
193. Reinhardt J. The sulfathiazole cure of American Foulbrood: an explanatory theory. *J Econ Entomol* 1947;40:45-8.
194. Wilson W. An overview of foulbrood in the United States: the past 45 years. *Bee Culture* 2000;128(10):24-8.
195. Shimanuki H, Knox D. Susceptibility of *Bacillus larvae* to Terramycin. *American Bee Journal* 1964;134:124-6.
196. Glinski Z, Rzedzicki J. A comparison of the activity of certain new sulphonamide preparations against *Bacillus larvae* and other bacilli isolated from honey bees. *Pol Arch Weter* 1977;20:9-16.
197. Plagemann O. Empfindlichkeitsprüfung von *Bacillus larvae* gegen Antibiotika und Sulfonamide. *Tierarztl Umsch* 1991;46:24-7.
198. Alippi AM. Sensibilidad in vitro de *Bacillus larvae* frente a diferentes agentes antimicrobianos. *Vida Apícola* 1994;66:20-4.
199. Alippi AM. Is Terramycin losing its effectiveness against AFB? *Bee Biz* 2000;27-9.

200. Miyagi T, Peng CY, Chuang RY, Mussen EC, Spivak MS, Doi RH. Verification of oxytetracycline-resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. *J Invertebr Pathol* 2000 Jan;75(1):95-6.
201. Feldlaufer M, Pettis JS, Kochansky J, Stiles G. Lincomycin hydrochloride for the control of American foulbrood disease of honey bees. *Apidologie* 2001;32:547-54.
202. Evans JD. Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol* 2003 May;83(1):46-50.
203. Colter D. Antibiotic resistant American foulbrood. *Alberta Bee News* 2000;4.
204. Oldroyd BP, Goodman RD, Hornitzky M, Chandler D. The effect on AFB of standard oxytetracycline hydrochloride treatments for the control of EFB of honeybees (*Apis mellifera*). *Aust J Biol Sci* 1989;40:691-7.
205. Peng CY, Mussen E, Fong A, Montague MA, Tyler T. Effects of chlortetracycline on honey bee worker larvae reared in vitro. *J Invertebr Pathol* 1992;60:127-33.
206. Alippi AM, Albo GN, Leniz D, Rivera I, Zanelli M, Roca A. Comparative study of tylosin, erythromycin and oxytetracycline to control American foulbrood of honey bees. *J Apic Res* 1999;3:149-58.
207. Matsuka M, Nakamura J. Oxytetracycline residues in honey and royal jelly. *Journal of Apicultural Research* 1990;29(2):112-7.
208. Nakajima C, Okayama A, Sakogawa T, Nakamura A, Hayama T. Disposition of ampicillin in honeybees and hives. *J Vet Med Sci* 1997 Sep;59(9):765-7.
209. Okayama A, Sakogawa T, Nakajima C, Hayama T. Biological properties and antibiotic susceptibility of *Bacillus larvae* originated from American foulbrood of honeybee in Japan. *J Vet Med Sci* 1996;58:439-41.
210. Kochansky J, Knox D, Feldlaufer M, Pettis J. Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and resistant *Paenibacillus larvae*. *Apidologie* 2001;32:215-22.
211. Kochansky J, Pettis J. Screening additional antibiotics for efficacy against American foulbrood. *J Apic Res* 2005;44:24-8.
212. Peng CY, Mussen E, Fong A, Cheng P, Wong G, Montague MA. Laboratory and field studies on the effects of the antibiotic tylosin on honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: *Apidae*) development and prevention of American foulbrood disease. *J Invertebr Pathol* 1996 Jan;67(1):65-71.
213. Alippi AM, Albo GN, Reynaldi FJ, De Giusti MR. In vitro and in vivo susceptibility of the honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* to the antibiotic tylosin. *Vet Microbiol* 2005 Aug 10;109(1-2):47-55.
214. Hitchcock J, Moffet J, Lockett J, Elliott J. Tylosin for control of American Foulbrood disease in honey bees. *J Econ Entomol* 1970;63:204-7.

215. Katznelzon H, Jamieson C, Austin G. Further studies on the chemotherapy of diseases of the honeybee. *Canadian Journal of Agricultural Science* 1955;35:189-92.
216. Moffet J, Wilson W, Parker R. The effect of Penicel, tetracycline and erythromycin on adult bees, brood-rearing, and honey production. *American Bee Journal* 1958;98:22-4.
217. Machova M. Variations de la sensibilité aux antibiotiques souches de *Bacillus larvae*. *Bull Apic* 1970;13:5-11.
218. Nakajima C, Sakogawa T, Okayama A, Nakamura A, Hayama T. Disposition of mirosamicin in honeybee hives. *J Vet Pharmacol Ther* 1998 Aug;21(4):269-73.
219. Thompson TS, Pernal SF, Noot DK, Melathopoulos AP, van den Heever JP. Degradation of incurred tylosin to desmycosin--implications for residue analysis of honey. *Anal Chim Acta* 2007 Mar 14;586(1-2):304-11.
220. Alippi AM, Lopez AC, Reynaldi FJ, Grasso DH, Aguilar OM. Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood (AFB) disease in honeybees. *Vet Microbiol* 2007 Dec 15;125(3-4):290-303.
221. FDA-CVM. Food and Drug Administration-Center for Veterinary Medicine. FDA Approved Animal Drug List "The Green Book". Blacksburg, VA: Drug Information Laboratory, College of Veterinary Medicine, Virginia Tech. University.; 2006.
222. FDA-CVM. Tylan (tylosin tartrate) soluble. In: NADA 013-076. Freedom of Information Summary, Supplemental New Animal Drug Application. Blacksburg, VA: Drug Information Laboratory, College of Veterinary Medicine, Virginia Tech. University.; 2005.
223. SENASA. Listado de productos aprobados para su utilización en apicultura. Coordinación General de Productos Farmacológicos, Veterinarios y Alimentos para Animales. Dirección de Agroquímicos, Productos Farmacológicos y Veterinarios; 2005 Mar.
224. McKee B. Prevention of residues in honey: a future perspective. *Apiacta* 2003;38:15-30.
225. Piro R, Multinelli F. The EU legislation for honey residue control. *Apiacta* 2003;38.
226. SENASA. Nitrofuranos en miel. Informe de la Comisión de Emergencia Sanitaria Apícola. 2004.
227. Hornitzky M, Clark S. Culture of *Bacillus larvae* from bulk honey samples for the detection of American foulbrood. *Journal of Apicultural Research* 1991;30:13-6.
228. Haynes W. The catalase test. An aid in the identification of *Bacillus larvae*. *American Bee Journal* 1972;112:130-1.
229. Jelinski M. Some biochemical properties of *Bacillus larvae* White. *Apidologie* 1985;16:69-76.

230. Shimanuki H, Knox D. American Foulbrood. Diagnosis of honey bee diseases. Agricultural Handbook No. H-690. Washington DC: Agriculture Research Service, US Department of Agriculture; 1991. p. 4-12.
231. García Rodríguez JA, Cantón R, García Sanchez JE, Gómez-Lus ML, Martínez Martínez L, Rodríguez-Aval C, et al. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. In: Picazo J.J., editor. Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Primera Edición. 2000.
232. OIE. Laboratory methodology for bacterial antimicrobial susceptibility testing. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 6th edition. Paris, France: Office International des Epizooties; 2008.
233. Galas M, Ceriana P. Determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos por método de difusión. Manual de procedimientos y control calidad. 2001.
234. Bauer A, Kirby M, Sherris J, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1996;45:493-6.
235. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard-third edition. CLSI document M31-A3. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
236. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard-ninth edition. CLSI document M2-A9. Wayne, Pennsylvania, USA: 2006.
237. NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard-second edition. NCCLS document M31-A2. Wayne, Pennsylvania, USA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2002.
238. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement. CLSI document M100-S19. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical Laboratory Standard Institute; 2009.
239. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-seventh edition. CLSI document M7-A/. Wayne, Pennsylvania, USA: 2006.
240. Elzen PJ, Westervelt D, Causey D, Ellis J, Hepburn HR, Neumann P. Method of application of tylosin, an antibiotic for American foulbrood control, with effects on small hive beetle (Coleoptera: *Nitidulidae*) populations. J Econ Entomol 2002 Dec;95(6):1119-22.
241. Elzen PJ, Westervelt D, Causey D, Rivera R, Baxter J, Feldlaufer M. Control of oxytetracycline-resistant American foulbrood with tylosin and its toxicity to honey bees (*Apis mellifera*). J Apic Res 2002;41:97-100.
242. Pettis JS, Feldlaufer MF. Efficacy of tylosin and lincomycin in controlling American Foulbrood in honeybee colonies. J Apic Res 2005;44:106-8.

243. Prats C, Francesch R, Arboix M, Pérez B. Determination of tylosin residues in different animal tissues by high performance liquid chromatography. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 2002;766(1):57-65.
244. Grove DC, Randall WA. *Assay method of antibiotics. A laboratory manual.* New York, USA: Medical Encyclopedia, Inc.; 1955.
245. Mestorino N. Estudio Farmacocinético del Tianfenicol en vacas lecheras Holando Argentino. Facultad de Ciencias Veterinarias: Universidad Nacional de La Plata; 1993.
246. Farmacopea Argentina. *Farmacopea Argentina.* VII ed. 2003.
247. Baggot JD. *Principios de farmacología clínica veterinaria.* 1 ed. ed. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S.A.; 1986.
248. Baggot JD. Principios de la biodisponibilidad y disposición de los fármacos antimicrobiano. In: Prescott JF, Baggot JD, Walter RD, editors. *Terapéutica antimicrobiana.* Tercera Edición ed. Buenos Aires: Editorial Intermédica; 2002. p. 43-76.
249. Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. Statistical moments in pharmacokinetics. *J Pharmacokinet Biopharm* 1978;6:165-75.
250. Formentini EA. *Farmacocinética de ricobendazole en rumiantes* Universidad Nacional de La Plata; 2003.
251. Gibaldi P, Perrier D. *Pharmacokinetics.* 2 nd Edition ed. New York: Marcel Decker Inc.; 1982.
252. Chang R, Álvarez Manzo R, Ponce López S, Zugazagoitia Herranz R. *Química.* Décima Edición ed. McGraw-Hill; 2010.
253. Petrucci RH, Harwood WS, Herring FG. *Química General.* Madrid: Prentice Hall; 2003.
254. Kilwinski J, Peters M, Ashiralieva A, Genersch E. Proposal to reclassify *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* DSM 3615 (ATCC 49843) as *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Results of a comparative biochemical and genetic study. *Vet Microbiol* 2004 Nov 30;104(1-2):31-42.
255. Gregorc A, Bowen ID. Histopathological and histochemical changes in honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) after infection with *Bacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood disease. *Cell Biol Int* 1998;22:137-44.
256. Shimanuki H, Knox D. Improved method for the detection of *Bacillus larvae* spores in honey. *American Bee Journal* 1988;128:353-4.
257. Gochnauer T, Corner J. Detection and identification of *Bacillus larvae* in a commercial pollen sample. *Journal of Apicultural Research* 1987;13:264-7.
258. Lindstrom A, Fries I. Sampling of adult bees for detection of American foulbrood (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) spores in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Journal of Apicultural Research* 2005;44(2):82-6.

259. Titera D, Haklova M. Detection method of *Paenibacillus larvae larvae* from beehive winter debris. *Apiacta* 2003;38:131-3.
260. Dobbelaere W, de Graaf DC, Peeters JE, Jacobs FJ. Development of a fast and reliable method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR. *Apidologie* 2001;32:363-70.
261. Dobbelaere W, de Graaf DC, Peeters JE, Jacobs FJ. Comparison of two commercial kits for biochemical characterization of *Paenibacillus larvae larvae* in the diagnosis of AFB. *Journal of Apicultural Research* 2001.
262. Carpana E, Marocchi L, Gelmini L. Evaluation of the API 50CHB system for the identification and biochemical characterization of *Bacillus larvae*. *Apidologie* 1995;26:6-11.
263. de Graaf DC, Alippi AM, Brown M, Evans JD, Feldlaufer M, Gregorc A, et al. Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. *Lett Appl Microbiol* 2006 Dec;43(6):583-90.
264. Mestorino N, Marchetti ML, Lambertini A, Turic E, Huber B, Lucas MF, et al. Penetración de tilmicosina en humor acuoso tras su administración subcutánea en bovinos sanos y portadores de queratoconjuntivitis infecciosa y traumática. *Veterinaria Argentina* 2007;XXIV(239):651-5.
265. Fiese EF, Steffen SH. Comparison of the acid stability of azithromycin and erythromycin. *J Antimicrob Chemother* 1990;25:39-47.
266. Lucas MF, Mestorino N, Errecalde JO. Pharmacokinetics and pk/pd integration of azithromycin in lactating dairy cows with subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *J Vet Pharmacol Ther* 2009;33:132-40.
267. Turic E, Mestorino N, Pessoa J, Errecalde JO. Azithromycin serum and tissues concentrations after intramuscular administration in calves. 2008 p. 927-30.
268. Reynaldi FJ, Albo GN, Alippi AM. Effectiveness of tilmicosin against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood disease of honeybees. *Vet Microbiol* 2008 Nov 25;132(1-2):119-28.
269. Prescott JF. Antibióticos misceláneos: ionóforos, nitrofuranos, nitroimidazoles, rifamicinas y otros. In: Prescott JF, Baggot JD, Walker RD, editors. *Terapéutica antimicrobiana*. Tercera Edición ed. Buenos Aires: Editorial Intermédica; 2002. p. 299-323.
270. Otero JL, Mestorino N, Errecalde JO. Enrofloxacin: una fluoroquinolona de uso exclusivo en veterinaria. Parte I: Química, mecanismo de acción, actividad antimicrobiana y resistencia bacteriana. *Analecta Vet* 2001;21(1):31-41.
271. Mestorino N, Pessoa J, Turic E, Errecalde JO. Florfenicol: aspectos farmacológicos. *Veterinaria Argentina* 1999;XVI(152):127-41.
272. Mestorino N, Errecalde JO. Comportamiento cinético del tianfenicol luego de su administración intravenosa en vacas Holando Argentino. *Therios* 1992;19(93):298-304.

273. Mestorino N, Errecalde JO. Discriminación del modelo farmacocinético seguido por el tianfenicol luego de su administración intravenosa a vacas lecheras. *Medicina Veterina (España)* 1992;9(2):120-4.
274. Mestorino N, Errecalde JO. Pharmacokinetics of thiamphenicol in lactating cows. *Vet Res Comm* 1993;17(4):295-303.
275. Mestorino N, Errecalde JO, Mariño Hernández EL, Landoni MF, Soraci AL. Concentraciones de tianfenicol en leche tras su administración intracisternal en vacas. *Medicina Veterina (España)* 1992;9(3):181-4.
276. Mestorino N, Alt M, Speroni J, Errecalde JO. Serum and tissue pharmacokinetics and residual activity of chloramphenicol after parenteral administration in sheep. 1994 p. 218.
277. Piccini C, Zunino P. American foulbrood in Uruguay: isolation of *Paenibacillus larvae larvae* from larvae with clinical symptoms and adult honeybees and susceptibility to oxytetracycline. *J Invertebr Pathol* 2001 Oct;78(3):176-7.
278. Lorian V. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Baltimore, USA: Williams and Wilkins; 1980.
279. Sáraközy G. Quinolones: a class of antimicrobial agents. *Vet Med-Czech* 2001;46:257-74.
280. Shea KM, Committee on Infectious Diseases. Nontherapeutic Use of Antimicrobial Agents in Animal Agriculture: Implications for Pediatrics. *Pediatrics* 2004;114(862):868.
281. Smith D, Harris A, Johnson J, Silbergeld E, Morris Jr. J. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergences of antibiotic resistance in human commensal bacteria. 2002 p. 6434-9.
282. Katznelson H. The influence of antibiotics and sulfa drugs on *Bacillus larvae*, the cause of American Foulbrood of the honey bee, in vitro in vivo. *J Bacteriol* 1950;59:71-9.
283. Reynaldi FJ, Rule R, Arauz S, Alippi AM. Sensibilidad in vitro de *Paenibacillus larvae* frente a los antibióticos oxitetraciclina, tilosina, tilmicosina y lincomicina. *Analecta Vet* 2010;30(1):25-9.
284. Pettis JS, Kochansky J, Feldlaufer MF. Larval *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) mortality after topical application of antibiotics and dusts. *J Econ Entomol* 2004 Apr;97(2):171-6.
285. Feldlaufer MF, Pettis JS, Kochansky J, Kramer M. Residue levels in honey after colony treatment with the antibiotic tylosin. *Am Bee J* 2004;144:143-5.
286. 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;29(2):24-30.
287. Gilliam M, Argauer RJ. Oxytetracycline residues in surplus honey, brood nest honey, and larvae after medication colonies of honey bees, *Apis mellifera*, with antibiotic extender patties, sugar dust, and syrup sprays. *Environ Entomol* 1981;10:479-82.

288. Grove D, Randall W. Assay Methods of Antibiotics. New York, USA: Medical Encyclopedia Inc.; 1955.
289. FAO. Procedures for recommending maximum residue limits- residues of veterinary drugs in food (1987-1999). 2000.
290. Kochansky J. Degradation of tylosin residues in honey. *J Apic Res* 2004;43:65-8.
291. Paesen J, Cypers W, Pauwels K, Roets E, Hoogmartens J. Study of the stability of tylosin A in aqueous solutions. *J Pharm Biomed Anal* 1995 Aug;13(9):1153-9.
292. Lewicki J, Reeves PT, Swan GE. Tylosin. Addendum to the monograph prepared by the 38th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. In: JECFA-FAO, editor. FAO Food and Nutrition Paper 41/4. 2009. p. 1-37.
293. Nalda MJN, Yagüe JLB, Gómez MTM, Sevilla JJJ, del Nozal JB, Pascual MH. Trace analysis of antibacterial tylosin A, B, C and D in honey by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *J Sep Science* 2006;29(3):405-13.
294. Thompson TS, Noot DK, Calvert J, Pernal SF. Determination of lincomycin and tylosin residues in honey using solid-phase extraction and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2003 Dec 12;1020(2):241-50.
295. Thompson TS, Noot DK, Calvert J, Pernal SF. Determination of lincomycin and tylosin residues in honey by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005;19(3):309-16.
296. Benetti C, Dainese N, Biancotto G, Piro R, Multinelli F. Unauthorised antibiotic treatments in beekeeping. Development and validation of a method to quantify and confirm tylosin residues in honey using liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. *Anal Chim Acta* 2004;520:87-92.
297. Wang J. Determination of Five Macrolide Antibiotic Residues in Honey by LC-ESI-MS and LC-ESI-MS/MS. *J Agric Food Chem* 2004 Dec 12;52(2):171-81.
298. Caldow M, Stead SL, Day J, Sharman M, Situ C, Elliott C. Development and validation of an optical SPR biosensor assay for tylosin residues in honey. *J Agric Food Chem* 2005 Aug 19;53(19):7367-70.
299. Hammel Y-A, Mohammed R, Gremaud E, LeBreton M-H, Guy PA. Multiscreening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2008;1177:58-76.
300. Lakritz J, Wilson WD, Mihalyi JE, . Comparison of microbiologic and high-performance liquid chromatography assays to determine plasma concentrations, pharmacokinetics, and bioavailability of erythromycin base in plasma of foals after intravenous or intragastric administration. *Am J Vet Res* 1999;60(4):414-9.

301. Hassan SAA, Shaddad SAI, El Tayeb IB, Omer MA, Al-Nazawi MH, Homeida AM. Detection of tylosin residue levels following intramuscular injection in desert sheep. *Research Journal of Pharmacology* 2008;2(1):1-3.
302. AL-Wabel NA. The pharmacokinetics and milk residual behavior of tylosin in lacting Najdi ewes. *Iranian Journal of Veterinary Research* 2008;9(2):138-43.
303. Tsai CE, Kondo F. Improved agar diffusion method for detecting residual antimicrobial agents. *J Food Prot* 2001;64:361-6.
304. Okerman L, De Wasch K, van Hoof J. Detection of antibiotics in muscle tissue with microbiological inhibition tests: effects of the matrix. *Analyst* 1998;123:2361-5.
305. Mestorino N, Moncada Cárdenas LA, Daniele MR, Valle CM, Errecalde JO. Perfil de eliminación de tilosina en leche tras su administración intramuscular. Cálculo del tiempo de retirada. *Revista del Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires* 2010;45:74-80.
306. Carter KK, Hietala S, Brooks DL, Baggot JD. Tylosin concentrations in rat serum and lung tissue after administration in drinking water. *Lab Anim Sci* 1987;37:468-70.
307. Weisel MK, Powers JD, Powers TE, Baggot JD. A pharmacokinetic analysis of tylosin in the normal dog. *Am J Vet Res* 1977;38:273-5.
308. Baggot JD, Gingerich DA. Pharmacokinetic interpretation of erythromycin and tylosin activity in serum after intravenous administration of a single dose to cows. *Res Vet Sci* 1976;21:318-23.
309. Burrows GE, Barto PB, Martin B. Antibiotic disposition in experimental pneumonic pasteurellosis: gentamicin and tylosin. *Can J Vet Res* 1986;50:193-9.
310. El-Sayed MGA, El-Attar HM, Atef M, Yousif M. Pharmacokinetic profile of tylosin in mastitic cows. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1986;93:326-8.
311. Kietzmann M. Comparative study of the distribution and excretion of tylosin of various origins. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1985;92:147-9.
312. Ziv G, Sulman FG. Serum and milk concentrations of spectinomycin and tylosin in cows and ewes. *Am J Vet Res* 1973;34:329-33.
313. Jean Prost P, Médori P, Le Conte Y. Reina. Apicultura. Conocimiento del la abeja. Manejo de la colmena. 4.^a edición ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa; 2007. p. 73-100.
314. Jean Prost P, Médori P, Le Conte Y. Obreras, polinización. Apicultura. Conocimiento del la abeja. Manejo de la colmena. 4.^a edición ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa; 2007. p. 101-58.
315. Jean Prost P, Médori P, Le Conte Y. Machos, razas, colonia. Apicultura. Conocimiento del la abeja. Manejo de la colmena. 4.^a edición ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa; 2007. p. 159-99.

316. Adams SJ, Fussell RJ, Dickinson M, Wilkins S, Sharman M. Study of the depletion of lincomycin residues in honey extracted from treated honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies and the effect of the shook swarm procedure. *Anal Chim Acta* 2009 Apr 1;637(1-2):315-20.
317. Martel AC, Zeggane S, Drajnudel P, Faucon JP, Aubert M. Tetracycline residues in honey after hive treatment. *Food Addit Contam* 2006;23:265-73.
318. FDA-CVM. Tylan (tylosin tartrate) soluble. In: NADA 013-076. Freedom of Information Summary, Supplemental New Animal Drug Application. 2011. 3-1-2011.
319. Waller GD. Honey bee life history. *Agriculture Handbook* 335, 24-80. 1980. 10-3-2011.
320. von Frisch K. La vida de las abejas. Tercera Edición de bolsillo ed. Editorial Labor S.A.; 1982.
321. Argauer RJ, Moats WA. Degradation of oxytetracycline in honey as measured by fluorescence and liquid chromatographic assays. *Apidologie* 1991;22:109-15.
322. Machova M, Drabnikova V, Titera D, Vejdovska A, Kristanova O. Preventive use of tylosin in the colonies endangered by the foulbrood and residues of tylosin in honey and syrup stored by honey-bees. *Vet Med (Praha)* 1992;37:119-25.
323. Landerkin GB, Katznelson H. Stability of antibiotics in honey and sugar syrup as affected by temperature. *Appl Environ Microbiol* 1956;5:152-4.
324. Multinelli F. Practical application of antibacterial drugs for the control of honey bee disease. *Apiacta* 2003;38:149-55.
325. Bogdanov S. Honey control, bee product science. 2009. 10-2-2010.
326. Health Canada. Veterinary Drugs Directorate. The current lowest AMRLs/MRLs in meats and recommended working residues limits (WRLs) in honey. 2005.
327. Lochhead AG. The nitrate reduction test and its significance in the detection of *Bacillus larvae*. *Can J Res* 1937;C15:79-86.
328. Hitchcock J, Wilson W. Pathogenicity to honey bees of a strain of *Bacillus larvae* that does not reduce nitrate. *J Econ Entomol* 1973;66:901-2.
329. OIE. American foulbrood. In: Office International des epizooties, editor. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, fourth. ed. Paris: 2004. p. 970-8.