

## **SENSIBILIDAD IN VITRO DE *Paenibacillus larvae* FRENTE A LOS ANTIBIÓTICOS OXITETRACICLINA, TILOSINA, TILMICOSINA Y LINCOMICINA**

**Reynaldi FJ<sup>\*,1,2</sup>, Rule R<sup>3,4</sup>, Arauz S<sup>5</sup>, Alippi AM<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI), Universidad Nacional de La Plata.

<sup>2</sup>CONICET, Argentina.

<sup>3</sup>Cátedra de Farmacología Aplicada, Fac. Cs. Médicas. Universidad Nacional de La Plata.

<sup>4</sup>CICPBA, Argentina.

<sup>5</sup>Laboratorio Central. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

**RESUMEN:** La Loque Americana es una enfermedad causada por la bacteria Gram positiva *Paenibacillus larvae* que ataca a las larvas y pupas de las abejas melíferas. El objetivo del presente trabajo fue determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), la Concentración Bactericida Mínima (CBM), la relación CBM/CIM y calcular las curvas de muerte para los antibióticos tilosina, tilmicosina, lincomicina y clorhidrato de oxitetraciclina frente a 6 cepas de *P. larvae*. Los resultados obtenidos de la relación CBM/CIM demostraron que las cepas presentaron un comportamiento variable según el antibiótico probado, con excepción de la cepa ATCC 9535 que resultó susceptible por CIM, con efecto bacteriostático por CBM y tolerante por CBM/CIM frente a todos los antibióticos. En términos generales oxitetraciclina y tilosina presentaron un mayor efecto bactericida y tilmicosina y lincomicina un mayor efecto bacteriostático. No obstante, la tilosina presentó la mejor actividad in vitro para el control de *Paenibacillus larvae*, dado por los menores valores de CIM, CBM, relación CBM/CIM y el mejor efecto bactericida observado en las curvas de muerte.

**PALABRAS CLAVES:** Antibióticos, Concentración Bactericida Mínima, Curvas de Muertes, *Paenibacillus larvae*

## **IN VITRO SUSCEPTIBILITY OF *Paenibacillus larvae* AGAINST OXYTETRACYCLINE, TYLOSIN, TILMICOSIN AND LINCOMYCIN**

**ABSTRACT:** American foulbrood caused by the Gram positive spore-forming bacterium *Paenibacillus larvae* is one of the most virulent diseases affecting the larval and pupal stages of honey bees. The aim of this study was to determine the Minimal inhibitory concentration (MIC), the minimal bactericidal concentration (MBC), the relationships between MBC / MIC and killing curves of the antibiotics tylosin, tilmicosin, lincomycin and oxytetracycline to 6 *P. larvae* strains. Results obtained from MBC/MIC showed variable results according to the strain tested with the exception to ATCC 9535 that was susceptible by MIC, bacteriostatic by MBC and presented tolerant effect by MBC/MIC to all the antibiotics. In general terms, OTC and tylosin showed a bactericidal effect while tilmicosin and lincomycin resulted in a bacteriostatic effect. Nevertheless, tylosin showed the best in vitro activity for the inhibition of *P. larvae* according to their MIC, MBC and MBC/MIC values.

**KEY WORDS:** Antibiotics, Minimal Bactericide Concentration, Killing Curves, *Paenibacillus larvae*

Fecha de recepción: 10/12/09

Fecha de aprobación: 20/06/10

**Dirección para correspondencia:** F. Reynaldi. Fac. Cs. Agr. y Ftiles, UNLP. Calle 60 y 119 s/n. La Plata (1900), Prov. Buenos Aires, Argentina.

**E-mail:** freynaldi@yahoo.com

## INTRODUCCIÓN

La Loque Americana (LA) es una enfermedad que ataca a las larvas y pupas de las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) ocasionando la muerte larval por una septicemia irreversible (1, 2). Su agente etiológico es *Paenibacillus larvae* (3), una bacteria Gram positiva con capacidad de formar esporas que permanecen infectivas y viables por largos períodos (más de 35 años) y sobreviven frente a condiciones adversas (4). La LA ocasiona importantes pérdidas económicas en la industria apícola de todo el mundo y, desde su introducción en Argentina en el año 1989, se ha diseminado en todas las áreas productoras del país (6).

Durante décadas, el antibiótico de elección para el control de esta enfermedad ha sido el clorhidrato de oxitetraciclina lo que generó la aparición de cepas resistentes en Argentina, EUA y Canadá (6, 7, 9), por lo cual resulta necesario el estudio de fármacos alternativos para el control de esta enfermedad. Numerosos antimicrobianos han sido estudiados por pruebas clásicas *in vitro* (8) y algunos de ellos como la tilosina, tilmicosina y lincomicina (10, 11, 12) también han demostrado su efectividad para el control de la enfermedad a campo. Sin embargo, poco se conoce sobre su comportamiento frente a las diversas pruebas *in vitro* que se emplean para determinar pautas terapéuticas contra la enfermedad, habida cuenta que la correcta estimación de la potencia bactericida es un parámetro fundamental para la seguridad y el correcto uso de los antimicrobianos (13).

Por esta razón, los objetivos del presente trabajo fueron determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), la Concentración Bactericida Mínima (CBM), la relación CBM/CIM y las Curvas de Muerte bacteriana, para los antibióticos tilosina, tilmicosina, lincomicina y clorhidrato de oxitetraciclina frente a 6 cepas de *P. larvae* con diferentes perfiles de sensibilidad a tetraciclina de acuerdo con lo determinado por estudios previos mediante CIM y difusión en disco (7).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos usados fueron: tilosina (SIGMA®), lincomicina (SIGMA®), clorhidrato de oxitetraciclina (SIGMA®) y tilmicosina (Micotil®, ELANCO).

### CEPAS BACTERIANAS

Se seleccionaron 6 cepas de *P. larvae* que presentaron diferentes patrones de sensibilidad frente a tetraciclina de acuerdo con los resultados obtenidos en estudios previos (7). Las cepas elegidas y sus correspondientes valores de CIM (en µg/ml) fueron PL15 = 0,25; ATCC 9545 = 0,125 (susceptibles); PL3= 8 (intermedia) y PL42= 16, PL295 = 64 y PL373= 128 (resistentes). Las

cepas PL 3 y PL 15 fueron aisladas de larvas con signos clínicos de LA provenientes de Argentina, la PL 42 de larvas infectadas provenientes de Italia, las PL 295 y PL 373 de mieles comerciales provenientes de E.U.A. (7) y, la ATCC 9545 de la American Type Culture Collection.

### CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)

Se definió la CIM como la menor concentración de antibiótico que previno el desarrollo visible de *P. larvae* en un test de susceptibilidad en agar (14). Los valores de CIM de los antibióticos tilosina, tilmicosina, clorhidrato de oxitetraciclina y lincomicina se obtuvieron de acuerdo con las metodologías previamente propuestas por Alippi y col (7, 10) pero empleando MYPGP caldo como medio base.

### CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

La CBM, reconocida como la prueba estándar cuantitativa para indicar la potencia bactericida (14, 15) permite estimar la actividad antimicrobiana del compuesto y su interacción en el tiempo (16). La CBM se definió como la concentración mínima de antibiótico que elimina el 99,9 % de las bacterias viables. Se efectuó después de realizar la CIM, donde se subcultivaron en MYPGP caldo 100 µl de todos los pocillos que no presentaron turbidez así como el último con crecimiento, se dejó reposar 15 minutos para evitar el efecto de "carry over" y luego se rastrilló con espátula de Drigalsky estéril sobre una placa con MYPGP agar. En todos los ensayos se realizaron controles de esterilidad y controles de inóculo (18). La última placa que presentó crecimiento menor o igual al 0,01 % con respecto al inóculo inicial se consideró como CBM.

### CÁLCULO DE LA RELACIÓN CBM/MIC

Con el objeto de determinar el efecto antibacteriano de los antibióticos se calculó el valor de la relación CBM/CIM y se comparó con valores standard (16). Se consideró efecto bactericida cuando el valor de CBM/CIM fue  $\leq 2$ , efecto bacteriostático cuando el valor de CBM/CIM resultó  $\geq 4$  y  $< 32$  y efecto tolerancia cuando el valor CBM/CIM fue  $\geq 32$ .

### CURVAS DE MUERTE

Las curvas de muerte proveen una figura dinámica de la acción antimicrobiana en función del tiempo. Se determinan a través de la exposición de cultivos de microorganismos a diferentes concentraciones de antibióticos, tomando muestras a diferentes tiempos durante un período de 24 horas y determinando la cantidad de bacterias viables en cada muestra (16).

Se realizaron suspensiones bacterianas de

cultivos de 48 h de cada una de las cepas de *P. larvae* incorporándose a una concentración final del orden de  $10^7$  UFC/ml (14) a tubos con 4 ml de MYPGP con una concentración predeterminada de antibiótico. La concentración de antibiótico de cada tubo fue el valor del punto de corte que separa cepas susceptibles de resistentes (CIM) X 4 (16) Los valores de puntos de corte para cada antibiótico se obtuvieron de estudios previos (7, 8, 10, 11, 12). Por ejemplo si el valor del punto de corte para tilosina fue de 8 µg/ml, la concentración para tilosina será de  $8 \times 4 = 32$  µg/ml de tilmicosina final por tubo. Entonces las concentraciones finales de antibiótico evaluadas fueron de: tubo a: 32 µg/ml de tilosina, tubo b): 32 µg/ml de tilmicosina, tubo c: 32 µg/ml de lincomicina, tubo d: 16µg/ml de clorhidrato de oxitetraciclina y tubo e: control sin antibiótico, respectivamente.

A las 0, 4, 8 y 24 horas de iniciado el ensayo, se extrajo de cada tubo un volumen de 100 µl y se diluyó en PBS. Finalmente, 100 µl de las diluciones (10-2, 10-3 y 10-4) se depositaron en un costado de las placas con MYPGP, dejando en reposo durante 15 minutos y para luego se la rastrillar con espátula de Drigalsky estéril para disminuir el efecto de "carry over". Después de una incubación de 24 horas en aerobiosis se procedió al recuento de microorganismos viables. Para el estudio de las curvas de muerte se realizó un ANOVA, entre las diferentes cepas para cada uno de los cuatro antibióticos estudiados, con un valor significativo de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Los valores de CIM y CBM y la relación CBM/CIM para todos los antibióticos estudiados se detallan en la Tabla 1.

Para el caso de clorhidrato de oxitetraciclina, la relación CBM/CIM mostró un efecto bactericida sobre las cepas PL15, PL42, PL295 y PL373, efecto bacteriostático sobre la cepa PL3 y efecto tolerante para la cepa ATCC 9545. En el caso de lincomicina se observó efecto bacteriostático para las cepas PL3, PL15, PL42 y PL295 y

efecto tolerante en las cepas ATCC 9545 y PL373. Tilosina presentó efecto bactericida para las cepas PL15, PL42, PL295, efecto bacteriostático para la cepa PL3 y PL373, y efecto tolerante para la cepa ATCC 9545, mientras que con tilmicosina hubo un efecto bactericida para las cepas PL3 y PL15, efecto bacteriostático para las cepas PL42 y PL295 y efecto tolerante en las cepas PL373 y ATCC 9545.

Los resultados de las curvas de muerte bacteriana se graficaron en la Figura 1. El ANOVA mostró que cuatro de las seis cepas en estudio (PL3, ATCC 9545, PL295 y PL373) presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los antibióticos y el posterior test de medias separó a la tilosina del resto de los tratamientos.

## DISCUSIÓN

Las cepas de *P. larvae* estudiadas en nuestro ensayo fueron sensibles para tilosina, tilmicosina y lincomicina, observándose valores de CIM más bajos para tilosina. Estos resultados coinciden con datos previos obtenidos por otros autores (6, 7, 8, 10, 11) donde se observaron valores de CIM muy bajos para tilosina, tilmicosina y lincomicina en las poblaciones de *P. larvae* analizadas (19).

Para antimicrobianos bactericidas la CBM coincide con la CIM o difiere en 1 o 2 diluciones por encima de la CIM, mientras que para los bacteriostáticos la CBM está muy alejada del valor de la CIM. La relación CBM/CIM es un parámetro que permite conocer si un antibiótico tiene efecto bactericida, bacteriostático o de tolerancia frente a un microorganismo dado. El efecto tolerante ocurre cuando un microorganismo evade la acción bactericida del antibiótico, sin presentar cambios en el valor de la CIM. Existen dos tipos de tolerancia, fenotípica y genotípica (16).

Los resultados obtenidos de la relación CBM/CIM demostraron que las cepas presentaron diferente comportamiento según el antibiótico probado. Con excepción de la cepa ATCC que resultó susceptible por CIM, con efecto bacterios-

Tabla 1: Valores de CIM ,CBM y CBM/CIM de clorhidrato de oxitetraciclina, tilosina, tilmicosina y lincomicina a cepas de *P. larvae* (n=6).

Table 1: MIC, MBC, and CBM/MIC values for chlortetracycline, tylosin, tilmicosin and lincomycin against *P. larvae* (n=6).

Cepas	Clorhidrato de oxitetraciclina (µg/ml)			Tilosina (µg/ml)			Tilmicosina (µg/ml)			Lincomicina (µg/ml)		
	CIM	CBM	CBM/CIM	CIM	CBM	CBM/CIM	CIM	CBM	CBM/CIM	CIM	CBM	CBM/CIM
PL 3	4	64	16	0,0625	0,25	4	0,5	1	2	0,5	4	8
PL 15	0,25	0,5	2	0,0625	0,0625	1	0,25	0,5	2	0,5	4	8
PL 42	16	32	2	0,125	0,125	1	0,0625	0,25	4	0,25	4	16
ATCC 9545	0,125	128	1024	0,125	4	32	0,125	4	32	0,125	16	128
PL 295	64	128	2	0,125	0,125	1	0,0625	0,5	8	1	8	8
PL 373	128	256	2	0,125	2	16	0,0625	2	32	0,5	16	32

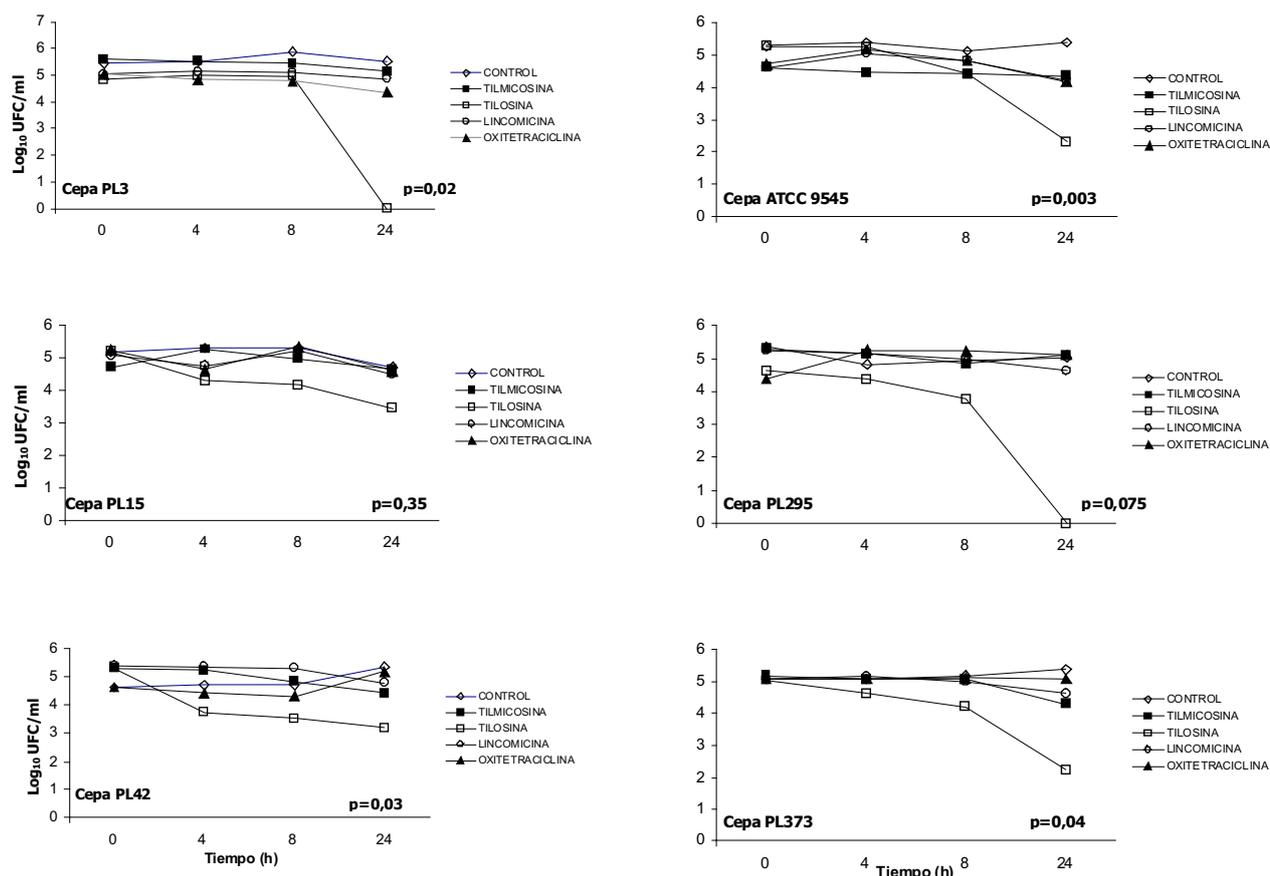


Figura 1: Curvas de muerte bacterianas de 6 cepas de *P. larvae* para los antibióticos tilosina, tilmicosina, lincomicina y clorhidrato de oxitetraciclina comparadas con un control sin antibiótico.  
 Figure 1: Killing curves corresponding to 6 strains of *P. larvae* against tylosin, tilmicosin, lincomycin and chlortetracycline in comparison with a control without antibiotic.

tático por CBM y tolerante por CBM/CIM frente a todos los antibióticos, el resto presentó un comportamiento variable. En términos generales la tilosina presentó un mayor efecto bactericida en tanto que la lincomicina presentó efecto bacteriostático en todas las cepas probadas.

El análisis de las curvas de muerte indicaría que la tilosina tiene un mayor efecto bactericida que el resto de los antibióticos sobre todas las cepas con excepción de la PL 15 y la PL 42, mientras que para OTC, lincomicina y tilmicosina no hubo diferencias con respecto al inóculo inicial para ninguna de las cepas probadas que resultaron tolerantes o indiferentes.

Los resultados obtenidos con respecto a los valores de CIM fueron coincidentes a los encontrados por otros autores para los antibióticos en estudio (6, 7, 8, 10, 11, 19). No existen datos previos sobre valores de CBM ni curvas de muerte en *P. larvae* por lo que sería interesante ampliar estas determinaciones sobre un mayor número de cepas bacterianas correlacionando los resultados con características fenotípicas o genotípicas diferenciales. Por otro lado, el efecto de tolerancia en contraposición con los bajos valores de CIM

obtenidos en la cepa ATCC 9545 para los 4 antibióticos ensayados abre la posibilidad al estudio de nuevos factores que podrían relacionarse con un posible cambio en la sensibilidad según la cepa de *P. larvae* que podría correlacionarse con diferentes tiempos de esporulación u otros factores intrínsecos que le permitirían a ciertas cepas evadir la acción del antibiótico.

La tilosina fue el antibiótico que presentó la mayor actividad in vitro para el control de *Paenibacillus larvae*, dado por los menores valores de CIM, CBM, relación CBM/CIM y mejor efecto bactericida en curvas de muerte.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue parcialmente financiada por la ANPCyT. FJR es miembro de la Carrera del Investigador Científico del CONICET; A.M.A. y R.R. son miembros de la Carrera del Investigador Científico de la CIC y S.A. es docente de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bailey L, Ball BV. (Eds.). Honey Bee Pathology, Second Edition, Academic Press, London. 1991.

2. Alippi, AM. Bacterial Diseases, pp. 31-59. In: Bee Disease Diagnosis. (Eds. Colin, M.E.; Ball, B.V. , and Kilani, M.). Options Méditerranéennes, Serie B: Etudes et Recherches. No. 25. CIHEAM Publications, Zaragoza. España, 182 pp. 1999.
3. Genersch E, Forsgren E, Pentikäinen J, Ashiraliev, A, Rauch S, Kilwinski J & Fries I. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvificiens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006; 56: 501-511.
4. Morse RA, Nowogrodzki R (Eds.) Honey bee pests, predators and diseases. Second Ed., 1990. Cornell University Press, 474pp.
5. Alippi AM. Characterization of *Bacillus larvae* White, the causative agent of AFB of honey bees. First record of its occurrence in Argentina. *Revista Argentina de Microrbiología.* 1992; 24:67-72.
6. Evans JD. Diverse origins of tetracycline resistance en la honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 2003; 83, 46-50.
7. Alippi AM, López AC, Reynaldi FJ, Grasso, DH & Aguilar OM. Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus larvae*, the causal agent of a honey bee larval disease. *Veterinary Microbiology* 2007; 125: 290-303.
8. Kochansky J & Pettis J. Screening additions antibiotics for efficacy against American Foulbrood. *Journal of Apicultural Research*, 2005; 44 (1): 24-28.
9. Colter D. Antibiotic Resistant American Foulbrood. *Alberta Bee News* 2000. February 4.
10. 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. *Veterinary Microbiology* 2005; 109: 47-55.
11. Reynaldi FJ, Albo GN & Allipi AM. Effectiveness of tilmicosin against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood disease of honeybees. *Veterinary Microbiology* 2008; 132: 119-128.
12. Pettis JS & Feldlaufer MF. Efficacy of tylosin and lincomicina in controlling American Foulbrood in honeybee colonies. *Journal of Apicultural Research.* 2005; 44, 106-108.
13. Mouton JW, Dudley MN, Cars O, Derendorf H & Drusano L. Standarization of pharmacodynamics (PK/PD) terminology for anti-infective drugs. *Journal of Antimicrobial Agents*, 2002; 19: 355-358.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. Approved Standard, 2<sup>nd</sup> ed. NCCLS document M31-A2. Wayne, PA. 2002.
15. Liu QY, Zhang YZ & Gao PJ. Novel concentration-killing curve method for estimation of bactericidal potency of antibiotics in an *in vitro* Dynamic Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004; 48(10): 3884-3891.
16. Krogstad DJ & Moellering RC. "Antimicrobial Combinations" IN "Antibiotics in Laboratory Medicine". Ed. Lorian, V. Baltimore: Williams & Wilkins, Cap. 15, pp 537-595. 1985.
17. Cafini F, González N, Torrico M, Echeverría O, Sevillano D, Alou L, Giménez MJ, Aguilar L & Gómez-Lus ML. Influencia del desplazamiento de la unión a proteínas por ibuprofeno en la actividad de una cefalosporina de tercera generación frente a *Streptococcus pneumoniae*. *Revista Española de Quimioterapia* 2006. 19 (4): 332-336.
18. Moredo FA, Landoni MF & Perfumo CJ. Concentración Inhibitoria Mínima de Tilmicosina y Eritromicina frente a cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* aisladas en la República Argentina. *Analecta Veterinaria* 2001, 21 (2): 6-11.
19. Okayama A, Sakogawa T, Nakajima C & Hayama T. Biological Properties and Antibiotic Susceptibility of *Bacillus larvae* Originated from American Foulbrood of Honeybee in Japan. *Journal of Veterinary Medicine Science* 1996, 58 (5): 439-441.