



INFORME BREVE

Evaluación del método epsilométrico Etest para la determinación de la sensibilidad a tetraciclina en *Paenibacillus larvae*, agente causal de la loque americana de las abejas

Adriana M. Alippi*, Francisco J. Reynaldi y Ana C. López

Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina

Recibido el 20 de marzo de 2013; aceptado el 31 de julio de 2013

PALABRAS CLAVE

Paenibacillus larvae;
Loque americana;
Abejas;
Tetraciclina;
Etest;
Resistencia
a antibióticos

Resumen

La bacteria esporulada gram positiva *Paenibacillus larvae* es el agente causal de la loque americana de las abejas. El objetivo de este trabajo fue comparar las CIM de tetraciclina obtenidas por el método Etest y las obtenidas por el método de dilución en agar frente a 22 cepas del patógeno, empleando dos medios de cultivo: Iso-Sensitest y MYPGP. Se encontró una concordancia de categoría entre dichos métodos del 100 % usando agar Iso-Sensitest, mientras que con MYPGP la concordancia de categoría fue del 86,36 % (con 3 errores menores). Los resultados de este estudio sugieren que la combinación de las tiras de Etest con agar Iso-Sensitest sería una alternativa rápida y confiable para determinar las CIM de tetraciclina en *P. larvae*; sin embargo, estos resultados deberán confirmarse en futuros estudios que contemplen un mayor número de aislamientos.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Paenibacillus larvae;
American foulbrood;
Honeybees;
Tetracycline;
Etest;
Antibiotic resistance

Evaluation of the Epsilonometer (Etest) method for the detection of tetracycline susceptibility in *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood disease of honeybees

Abstract

American foulbrood (AFB) is a bacterial disease caused by the spore-forming, gram-positive bacterium *Paenibacillus larvae*, which affects honeybee broods worldwide. The aim of this work was to compare the Epsilonometer test (Etest) to the agar dilution method for testing a collection of 22 *P. larvae* strains to tetracycline by using MYPGP and Iso-Sensitest agars. Results showed that a categorical agreement of 100% was found when using Iso-Sensitest, while a categorical agreement of 86.36% was found (with 3 minor

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: alippi@biol.unlp.edu.ar, adrianaalippi@gmail.com (A.M. Alippi).

errors) when MYPGP was tested. In conclusion, the Etest could be a rapid and reliable method for testing MIC values of tetracycline in *P. larvae* only when used in combination with Iso-Sensitest agar. Nevertheless, these results should be confirmed with future studies involving a larger number of isolates.

© 2013 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

La loque americana es la enfermedad más grave y peligrosa que afecta a las larvas y pupas de las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.)¹¹. Está difundida a nivel mundial en todos los países productores de miel y su agente causal es la bacteria esporulada gram positiva *Paenibacillus larvae*¹². Las esporas, que constituyen la forma infectiva y de supervivencia, mantienen su capacidad patógena por largos períodos, además de ser muy resistentes al calor, los agentes químicos y la radiación UV.

En la mayoría de los países desarrollados la quema de colmenas es la única alternativa para el control de loque americana, y existen distintos métodos para recuperar el material inerte, como la esterilización por radiación gamma, la inmersión en parafina o la desinfección con óxido de etileno, soda cáustica o hipoclorito de sodio.

En países como Argentina, EE. UU. y Canadá, se emplean, entre otros, los antibióticos tetraciclina (TET) y oxitetraciclina (OTC) para el control de esta enfermedad, junto con pautas de manejo integrado del colmenar^{4,14}. Las tetraciclinas eliminan los síntomas porque inhiben las formas vegetativas, pero no las esporas, que son las responsables de la diseminación de la enfermedad.

El empleo continuado de TET trajo como consecuencia la aparición de cepas bacterianas resistentes en poblaciones naturales del patógeno. Este antibiótico impide el crecimiento bacteriano por inhibición de la síntesis de proteínas y, hasta el presente, se han identificado tres tipos diferentes de mecanismos de resistencia a este agente en las bacterias: eflujo de tetraciclina, protección ribosómica y modificación de la molécula del antibiótico. Los dos primeros están ampliamente distribuidos en bacterias gram negativas y gram positivas, en las que los genes de resistencia correspondientes se asocian frecuentemente con elementos móviles, como plásmidos y transposones. En el caso de *P. larvae* se ha podido correlacionar la presencia de cierto tipo de plásmidos con alta resistencia a TET en cepas bacterianas provenientes de EE. UU.^{4,14}.

Al no existir recomendaciones del CLSI para la determinación de las CIM de TET para *P. larvae*, en estudios previos se propuso como técnica de referencia para esta especie el método de dilución en agar utilizando caldo Muller-Hinton adicionado con extracto de levadura, K_2HPO_4 , glucosa, piruvato de sodio y agar (conocido como MYPGP) como medio basal¹⁰, y se establecieron los puntos de corte entre cepas sensibles (S) y resistentes (R), considerando a la cepa S cuando el valor de CIM era $< 4 \mu\text{g/ml}$, I con CIM entre 4 y $8 \mu\text{g/ml}$ y R frente a CIM $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ ^{4,9}.

El Etest (Epsilon-meter-test) es una técnica cuantitativa para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de antibióticos y antifúngicos mediante un gradiente de concentración del antimicrobiano sobre una tira. Es una alternativa sencilla y rápida a las determinaciones

convencionales de CIM. El método está calibrado para cumplimentar con los requerimientos de los métodos de referencia del CLSI^{7,8}. No obstante, para ciertas combinaciones de especies bacterianas y antibióticos, se han obtenido resultados controvertidos en relación con la técnica de referencia^{5,13}. Asimismo, no existen comunicaciones acerca de su confiabilidad con respecto a su uso para evaluar la sensibilidad de aislamientos de *P. larvae* o de otras bacterias patógenas de abejas.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el desempeño diagnóstico del Etest comparándolo con el método de dilución en agar para la determinación cuantitativa de la sensibilidad/resistencia de *P. larvae* hacia tetraciclina, y correlacionar las CIM obtenidas por ambos métodos comparando dos medios de cultivo aptos para el desarrollo de *P. larvae*, MYPGP e Iso-Sensitest agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra).

Se probaron 16 cepas de *P. larvae* provenientes de distintos orígenes geográficos; estas presentaban distinta sensibilidad a TET y distintos perfiles de amplificación obtenidos por rep-PCR empleando cebadores BOX^{3,9}. Se seleccionaron los cebadores BOX porque permiten diferenciar un mayor número de genotipos dentro de las poblaciones de *P. larvae*; hasta el presente se han encontrado 7 perfiles BOXA1R a nivel mundial, denominados A, B, C, D, E, F y G^{3,9} (Alippi AM y López AC, resultados no publicados). Adicionalmente, se emplearon 5 cepas de *P. larvae* (ATCC 9545, NRRL B-3555, NRRL B-14154, CCM486, CCM 38) y la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 como controles de referencia y calidad, respectivamente (tabla). Las cepas empleadas (que habían sido aisladas por métodos previamente descritos^{1,2,3,9} de muestras de larvas infectadas por loque americana o de mieles que contenían esporas del patógeno) se obtuvieron de la Colección bacteriana de la UB-CIDEFI (Unidad de Bacteriología, Centro de Investigaciones de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, Argentina).

Para determinar las CIM mediante el método de dilución en agar se emplearon como medios basales agar MYPGP¹⁰ y agar Iso-Sensitest, dado que *P. larvae* no desarrolla o lo hace muy pobremente en agar Muller-Hinton (MH)⁹, que es el medio recomendado por el CLSI para las pruebas de sensibilidad a tetraciclina^{7,8}. Para la preparación del agar MYPGP se empleó caldo Muller-Hinton (Britania, Argentina), agar (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) y K_2HPO_4 , glucosa y piruvato de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania).

Los medios de cultivo previamente esterilizados fueron mantenidos a 45°C hasta la incorporación de las soluciones de tetraciclina (Sigma-Aldrich, Chemie, Steinheim, Alemania) para obtener el siguiente gradiente de concentraciones crecientes en las placas: 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 y $128 \mu\text{g/ml}$. Como controles se emplearon

Tabla Comparación de las CIM de tetraciclina frente a cepas de *Paenibacillus larvae*, determinadas por las técnicas de dilución en agar y Etest

Cepas	Origen	Perfil de BOX-PCR*	Agar Iso-Sensitest		Agar MYPGP	
			CIM Dilución (µg/ml)	CIM Etest (µg/ml)	CIM Dilución (µg/ml)	CIM Etest (µg/ml)
<i>P. larvae</i> PL3	larvas, Entre Ríos, Argentina	A	1	0,125	0,5	0,064
<i>P. larvae</i> PL7	larvas, Buenos Aires, Argentina	A	0,125	0,064	0,125	0,064
<i>P. larvae</i> PL29	escamas, Nueva Zelanda	B	< 0,0625	0,032	< 0,0625	0,016
<i>P. larvae</i> PL38	larvas, Río Negro, Argentina	C	0,125	0,5	0,0625	0,125
<i>P. larvae</i> PL48	escamas, Var, Francia	A	< 0,0625	0,016	< 0,0625	< 0,016
<i>P. larvae</i> PL56	escamas, Uppsala, Suecia	B	0,0625	< 0,016	< 0,0625	< 0,016
<i>P. larvae</i> PL96	larvas, Leicester, Reino Unido	B	< 0,0625	< 0,016	< 0,0625	< 0,016
<i>P. larvae</i> PL213	miel, Toronto, Canadá	B	< 0,0625	0,016	< 0,0625	0,23
<i>P. larvae</i> PL255	miel, España	B	< 0,0625	0,016	< 0,0625	< 0,016
<i>P. larvae</i> PL295	miel, EE. UU.	A	32	24	32	16
<i>P. larvae</i> PL373	miel, EE. UU.	D	64	16	128	8
<i>P. larvae</i> PL374	miel, EE. UU.	D	64	32	128	12
<i>P. larvae</i> PL394	miel, Miami, EE. UU.	A	32	16	32	4
<i>P. larvae</i> PL395	miel, Miami, EE. UU.	D	32	16	32	8
<i>P. larvae</i> PL420	miel, Italia	B	0,0625	0,016	0,0625	0,016
<i>P. larvae</i> PL427	larvas, Pretoria, Sudáfrica	A	0,25	0,125	0,5	0,064
<i>P. larvae</i> SAG 10367	miel, Chile	E	< 0,0625	0,032	<0,0625	0,023
<i>P. larvae</i> ATCC 9545	ATCC, EE. UU.	A	0,25	0,016	0,125	0,016
<i>P. larvae</i> NRRL B-3555	NRRL, EE. UU.	A	< 0,0625	< 0,016	0,125	0,016
<i>P. larvae</i> NRRL B-14154	NRRL, EE. UU.	F	< 0,0625	0,016	< 0,0625	0,023
<i>P. larvae</i> CCM 486	CCM, República Checa	B	< 0,0625	0,016	< 0,0625	< 0,016
<i>P. larvae</i> CCM 38	CCM, República Checa	G	< 0,0625	0,032	< 0,0625	0,023
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	ATCC, EE. UU.	ND	1	1	0,5	1

* Según bibliografía (citas 3 y 9). ND: No determinado; SAG: Servicio Agrícola Ganadero, Chile; ATCC: American Type Culture Collection, EE. UU.; NRRL: ARS Culture Collection, Peoria, EE. UU.; CCM: Czech Collection of Microorganisms, Brno, República Checa.

ambos medios de cultivo sin el agregado de TET. La preparación del inóculo bacteriano se efectuó a partir de cultivos de *P. larvae* de 24-48 h de incubación en MYPGP a 36 ± 1 °C como suspensiones en agua destilada estéril, ajustadas a una concentración 1 de la escala Mc Farland ($A_{620nm} = 0,4$), y se sembraron según los criterios definidos oportunamente para *P. larvae*^{4,9}. Antes de efectuar las suspensiones, se verificó que todas las cepas presentaran un porcentaje superior al 95 % de células vegetativas mediante conteos con microscopio con contraste de fase (Leica ICC50). Para el control de calidad (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213) se siguieron las especificaciones del CLSI, pero empleando agar MYPGP o Iso-Sensitest en reemplazo de MH. En todos los casos, se efectuaron 2 repeticiones por cada cepa y por cada concentración a probar, sembrando 15 gotas de 10 µl cada una por placa⁴. Las placas se incubaron en posición invertida a 36 ± 1 °C y las lecturas se efectuaron a las 48 h

para *P. larvae* y a las 24 h para *S. aureus* ATCC 29213, tomando el valor de CIM como la menor concentración de TET que inhibió el crecimiento bacteriano visible en la placa de cultivo.

Para los ensayos empleando las tiras Etest, se siguieron las recomendaciones del fabricante (bioMérieux S.A., Marcy l'Etoile, Francia), usando agar MYPGP o Iso-Sensitest. El inóculo bacteriano se preparó de la misma forma que la detallada para el método de dilución en agar. Las placas sembradas con *P. larvae* se incubaron en posición invertida a 36 ± 1 °C durante 48 h, al cabo de las cuales se leyó el valor de CIM en el punto de intersección de la elipse de inhibición con la tira. Para el control de calidad de *S. aureus* ATCC 29213, la lectura se efectuó a las 24 h. Cuando se emplearon las tiras Etest, se consideró una cepa S cuando el valor de CIM fue < 4 µg/ml, I para CIM entre 4-15 µg/ml y R para MIC ≥ 16 µg/ml, dado que las tiras plásticas están cali-

bradas con un gradiente predefinido de concentraciones de antibiótico con 15 diluciones dobles seriadas, dentro de un rango de 0,012 µg/ml y 256 g/ml.

Para el análisis de los resultados, se definió como concordancia de categoría cuando de acuerdo a los resultados obtenidos por ambos métodos, los aislamientos cayeron dentro de la misma categoría clínica (R, S o I). Para la categorización de los errores, se consideró que los valores obtenidos por Etest que llevaron a las siguientes discrepancias con respecto al método de dilución en agar, S vs. I, R vs. I, I vs. R o I vs. S, fueron errores menores. Los resultados que fueron S por Etest y R por dilución en agar fueron interpretados como errores muy mayores o de falsa sensibilidad; y los que fueron R por Etest pero S por dilución en agar se consideraron errores mayores o de falsa resistencia⁶.

Los valores de CIM obtenidos mediante la técnica de dilución en agar con ambos medios de cultivo solo difirieron dentro del rango de $\pm 1 \log_2$ de dilución. Por ello fue posible comparar los valores de CIM determinados por Etest con los establecidos por la técnica de dilución en agar en medio Iso-Sensitest, a pesar de que este medio no es el método de referencia.

Los valores de CIM de TET determinados por Etest y los determinados por la técnica de dilución en agar para todas las cepas ensayadas en ambos medios de cultivo se presentan en la tabla.

Mediante la técnica de dilución en agar, tanto en MYPGP como en Iso-Sensitest, se encontraron 17 cepas de *P. larvae* sensibles y 5 resistentes ($n = 22$), con valores de CIM que oscilaron entre $< 0,0625$ y $128 \mu\text{g/ml}$ al emplear MYPGP y entre $< 0,0625$ y $64 \mu\text{g/ml}$ cuando se utilizó el Iso-Sensitest, de acuerdo con la cepa probada (tabla). Los valores de CIM obtenidos para el control de calidad *S. aureus* ATCC 29213 en ambos medios de cultivo y por ambos métodos (tabla) cayeron dentro del rango aceptable para la cepa control en agar MH ($0,125\text{-}1 \mu\text{g/ml}$)⁸.

Al comparar las CIM obtenidas por Etest con las obtenidas por dilución en agar, en el caso del agar Iso-Sensitest hubo concordancia de categoría del 100 %, dado que no se encontraron errores de tipo menor, mayor o muy mayor (tabla). Se encontró la misma proporción de cepas sensibles y resistentes que por la técnica de dilución en agar, 17 S y 5 R, con valores de CIM que oscilaron entre $< 0,016$ y $32 \mu\text{g/ml}$ de TET (tabla). Como se observa en la tabla, el medio Iso-Sensitest muestra una tendencia a presentar valores de CIM más bajos por Etest que los obtenidos por dilución en agar; esta misma tendencia ha sido observada por otros autores para distintas combinaciones de antibióticos^{5,13}.

En el caso del agar MYPGP, al comparar las CIM obtenidas por Etest con las obtenidas por dilución en agar, la concordancia de categoría resultó del 86,36 %, dado que se hallaron 3 errores de tipo menor (correspondientes a 3 cepas que por dilución en agar resultaron R y por Etest I) (tabla). Por Etest, 17 cepas resultaron S, 2 cepas cayeron en la categoría R y 3 cepas en la categoría I con valores de CIM que oscilaron entre $< 0,016$ y $16 \mu\text{g/ml}$, mientras que por dilución en agar se encontraron 5 cepas R y 17 S. En el caso de la cepa PL374, el valor de CIM obtenido por Etest fue de $12 \mu\text{g/ml}$; como este se encuentra entre dos diluciones de CIM (8 y $16 \mu\text{g/ml}$), se redondeó a la inmediata superior, considerándose como R y no como I. También en el caso del

agar MYPGP, los valores de CIM resultaron más bajos cuando se empleó Etest comparados con los obtenidos por dilución en agar, pero estas diferencias fueron mucho mayores que para el caso del agar Iso-Sensitest (tabla).

En conclusión, consideramos que la combinación de las tiras de Etest con el agar Iso-Sensitest sería una excelente alternativa para determinar las CIM de tetraciclina en cepas de *P. larvae*; sin embargo, estos resultados deberán confirmarse en futuros estudios que contemplen un mayor número de aislamientos.

La técnica empleando las tiras de Etest es considerablemente más rápida y requiere una menor cantidad de medio de cultivo que la técnica de dilución en agar, por lo que puede adaptarse fácilmente al trabajo de laboratorio para el análisis de numerosas cepas bacterianas. Es importante destacar que todas las cepas de *P. larvae* ensayadas mostraron un desarrollo confluyente en Iso-Sensitest, el cual podría usarse también como medio alternativo para el desarrollo de las células vegetativas de este patógeno.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

AMA es miembro de la Carrera del Investigador Científico de la CIC (Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires); ACL y FJR son miembros de la Carrera del Investigador Científico de CONICET (CCT-La Plata). Esta investigación fue subsidiada por la ANPCyT y la CIC.

Bibliografía

- Alippi AM. A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee *Apis mellifera* L. in Argentina. *J Apic Res.* 1991;30:75-80.
- Alippi AM. Characterization of *Bacillus larvae* White, the causative agent of American Foulbrood of honeybees. First record of its occurrence in Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 1992;24:67-72.
- Alippi AM, Reynaldi FJ, López AC, De Giusti, MR, Aguilar OM. Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae larvae* and incidence of American Foulbrood in Argentinean honeys from Buenos Aires Province. *J Apic Res.* 2004;43:135-43.
- 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. *Vet Microbiol.* 2007;125:290-303.
- Arroyo LA, García-Curiel A, Pachón-Ibañez ME, Llanos AC, Ruiz M, Pachón J, Aznar J. Reliability of the E-test method for detection of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microb.* 2005;43:903-5.
- Blanco MA, Casimir L, Lopardo HA. Identificación y sensibilidad de bacilos gram-negativos. Evaluación de uso de un sistema automatizado directamente de los frascos de hemocultivo. *Acta Bioquim Clin Latinoam.* 2008;42:5-10.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; 2006; M7-A7, Wayne PA, EE. UU.

8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 17th Informational Supplement, 2006; M100-S16. Wayne PA, EE. UU.
9. de Graaf DC Alippi AM, Antúnez K, Aronstein KA, Budge G, De Koker D, De Smet L, Dingman DW, Evans JD, Foster LJ, Fünfhaus A, Garcia-Gonzalez E, Gregorc A, Human H, Murray KD, Nguyen BK, Poppinga L, Spivak M, Van Engelsdorp D, Wilkins S, Genersch E. Review Article: Standard methods for American foulbrood research. *J Apic Res.* 2013;52. doi:10.3896/IBRA.1.52.1.11.
10. Dingman DW, Stahly DP. Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Appl Environm Microbiol.* 1983;46:860-9.
11. Genersch, E. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol.* 2010;103(Suppl 1):S10-9.
12. Genersch E, Forsgren E, Pentikäinen A, Ashiralieva A, Rauch S, Kilwinski J, Fries I. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56:501-11.
13. Mohamed MJ, Marston CK, Popovic T, Weyant RS, Tenover FC. Antimicrobial susceptibility testing of *Bacillus anthracis*: Comparison of results obtained by using the National Committee for Clinical Laboratory Standards broth microdilution reference and Etest agar gradient diffusion methods. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1902-7.
14. Murray KD, Aronstein KA, de Leon JH. Analysis of pMA67, a predicted rolling-circle replicating, mobilizable, tetracycline-resistance plasmid from the honey bee pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Plasmid.* 2007;58:89-100.