

Propóleos como alternativa natural para el tratamiento de colmenas infectadas con esporas de *Paenibacillus larvae*, agente causal de la Loque Americana*

Antúnez, K.¹, Harriet, J.², Zunino P.¹

RESUMEN

Paenibacillus larvae es el agente causal de la Loque Americana (LA), una severa enfermedad que afecta a las larvas de las abejas melíferas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el extracto etanólico de propóleos (EEP) como alternativa natural para el tratamiento de colmenas infectadas con *P. larvae*. En primer lugar se estudió la actividad *in vitro* del EEP frente a *P. larvae* mediante ensayos de difusión en disco y se calculó de la concentración inhibitoria mínima (CIM). Luego se estimó la toxicidad para las abejas y por último se evaluó su actividad *in vivo* en colmenas naturalmente infectadas.

Todos los aislamientos resultaron sensibles al EEP, la CIM promedio resultó en 54 ppm y a 50.000 ppm el EEP no resultó tóxico para las abejas. Los ensayos de campo indicaron que 21 y 42 días después de la aplicación de EEP mediante alimentador y aspersor respectivamente, el número de esporas de *P. larvae* por g de miel en las colmenas tratadas resultó significativamente menor con respecto a los recuentos de los controles. Este trabajo constituye el primer reporte del uso de propóleos para el tratamiento de la colmenas infectadas con *P. larvae*, constituyendo una alternativa natural, inocua y económica.

Palabras clave: Loque Americana, *Paenibacillus larvae*, extracto etanólico de propóleos, enfermedades de las abejas, tratamientos naturales.

SUMMARY

Paenibacillus larvae is the causative agent of American Foulbrood (AFB), a severe disease affecting larvae of honeybee. The aim of the present work was to evaluate the effect of a propolis ethanolic extract (EEP) against *P. larvae* and as a therapeutic tool for the control of AFB. *In vitro* activity of PEE against *P. larvae* isolates was evaluated by the disk diffusion method and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined. Then the toxicity for honeybees was evaluated by oral administration. Lastly, the *in vivo* activity against *P. larvae* naturally infected colonies was determined. All isolates resulted sensitive to EEP and the MIC median resulted in 52 ppm and it was not toxic for bees at least at 50.000 ppm.

Field assays showed that 21 and 42 days after the application of the PEE treatments by aspersion or by supplementation of the food, the number of *P. larvae* spores/g of honey resulted significantly lower in colonies treated with PEE compared to the control colonies. This work constitutes the first report about the use of propolis for the treatment of beehives affected with *P. larvae* spores, appearing as a novel, natural and innocuous alternative for the treatment of AFB-affected hives.

Keywords: American Foulbrood, *Paenibacillus larvae*, propolis ethanolic extract, honeybee disease, natural treatments.

INTRODUCCIÓN

El propóleos es un producto natural derivado de resinas de plantas y elaborado por las abejas para sellar la entrada y paredes de la colmena, constituyendo una defensa invaluable contra patógenos de diversa índole. Posee diferentes propiedades biológicas, en particular, como agente antibacteriano, antiviral, antifúngico y anti-inflamatorio (9, 14, 15, 17, 18, 27, 29).

El propóleos ha sido utilizado con fines medicinales desde la antigüedad. Como agente antibacteriano, se ha reportado su actividad frente a patógenos humanos, incluyendo *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa* entre otros (9, 14). En apicultura, ha sido ocasionalmente utilizado para la prevención de enfermedades

de las abejas, aunque no hay reportes científicos que prueben su efectividad.

La Loque Americana es una de las más severas enfermedades de origen bacteriano que afectan a las larvas de las abejas melíferas *Apis mellifera*, causando una disminución en la población de abejas así como en la producción de miel. El agente causal es *Paenibacillus larvae*, una bacteria gram positiva, formadora de esporas, de distribución mundial (11). Un método comúnmente utilizado para el control de esta enfermedad es el uso de antibióticos, especialmente clorhidrato de oxitetraciclina (12). En Uruguay, su uso no está recomendado, ya que existen muchos problemas asociados a su aplicación. Su empleo puede originar la aparición de químicos en la miel, afectando su calidad para el consumo humano, reducir la vida media de las abejas y aumentar el riesgo de aparición de cepas bacterianas res-

*Premio de la Academia Nacional de Veterinaria 2007. Resultados parcialmente publicados en Veterinary Microbiology.

¹Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Montevideo, Uruguay. Avda. Italia 3318. C.P.11600. Montevideo, Uruguay. E-mail: karina@iibce.edu.uy.

²Sección Apicultura, División de Laboratorios Veterinarios "Miguel C. Rubino". Montevideo, Uruguay.

sistentes (20, 28). La presencia de cepas *P. larvae* resistentes a oxitetraciclina ha sido reportada hasta el momento en Argentina, Estados Unidos, Italia, Nueva Zelanda y en el Reino Unido (2, 10, 22). En nuestro país no se han detectado cepas resistentes a oxitetraciclina aunque se ha detectado un 22 % de aislamientos resistentes a sulfisoxazole, otra droga potencialmente utilizada en colmenas (3, 26). En Uruguay, la actividad apícola ha adquirido una gran relevancia dentro del sector agro-exportador. Actualmente, el rubro cuenta aproximadamente con 4.300 apicultores registrados y una dotación de colmenas cercana a las 400.000. Éstas producen alrededor de 12.000 toneladas de miel al año, habiendo generado ingresos para el país por exportación de miel, de aproximadamente US\$ 27.000.000 al cierre del año 2004 (30). Debido a las graves pérdidas asociados a la Loque Americana y a los problemas relacionados al uso de antibióticos, es necesario desarrollar estrategias naturales para el control de esta enfermedad.

El objetivo del presente trabajo constituyó en la evaluación del uso del extracto etanólico de propóleos (EEP) como una alternativa natural para el tratamiento de colmenas naturalmente infectadas con esporas de *P. larvae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos de *P. larvae* y condiciones de crecimiento

Cincuenta y cinco aislamientos de *P. larvae* fueron seleccionados al azar de la colección del Laboratorio de Microbiología del IIBCE. Estos aislamientos fueron obtenidos a partir de abejas obreras, larvas y miel de diferentes zonas geográficas de Uruguay y Argentina entre los años 1999 y 2002. Dichos aislamientos corresponden a los cuatro genotipos de *P. larvae* previamente establecidos (Genersh *et al.*, 2006; Antúnez *et al.*, 2007). Los aislamientos fueron rutinariamente sembrados en medio J (13) e incubados a 37°C en condiciones de microaerofilia (5 a 10 % de CO₂).

Preparación de EEP

Se preparó una solución concentrada de propóleos homogeneizando 400 g de pro-

póleos en 1 l de etanol. La mezcla se incubó durante 10 días, se filtró con papel de filtro y se incubó nuevamente hasta que el etanol se evaporó y el producto obtuvo una consistencia de miel. Este extracto se diluyó al 10 % en etanol para constituir el EEP (100.000 ppm).

Ensayos de actividad antibacteriana

La susceptibilidad de *P. larvae* frente al EEP se evaluó mediante la técnica de difusión en disco, de acuerdo a las líneas generales propuestas por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (5, 23). Se prepararon placas de Petri con medio J (10 ml) y se inocularon con un hisopo previamente sumergido en una suspensión bacteriana de *P. larvae* en PBS, equivalente al valor de 0,5 de la escala McFarland. La placa se dejó secar durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se colocaron sobre su superficie discos embebidos en diferentes concentraciones de EEP (200.000, 20.000, 4.000 y 2.000 ppm). Como control se utilizaron discos embebidos con etanol (vehículo de la preparación). Las placas se incubaron a 37°C en condiciones de microaerofilia (5 a 10 % de CO₂) durante 72 hs.

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima

Para la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del EEP se partió de la solución stock del mismo. Un ml de dicha solución se colocó en 1 ml de medio líquido MYT (Mueller-Hinton, suplementado con 1.5 % de extracto de levadura y 0.1 ml/l de tiamina; L. Gende y colaboradores, comunicación personal) y a partir de esa dilución se prepararon diluciones seriadas en MYT. Posteriormente los tubos fueron inoculados con 0,5 ml de una suspensión bacteriana de *P. larvae* en PBS equivalente a 0,5 McFarland. El control negativo se realizó utilizando etanol en lugar del EEP. Los tubos se incubaron a 37°C durante 96 hs en condiciones de microaerofilia. La determinación de la CIM se realizó mediante observación directa de crecimiento bacteriano.

Evaluación de la toxicidad en abejas

La evaluación de la toxicidad del EEP en abejas se realizó en base al protocolo di-

señado por M. Eguaras (comunicación personal). Se formaron grupos de entre 300 y 400 abejas, los que se colocaron en paqueteros de 16 cm x 12 cm x 6 cm y se estabilizaron con feromona de reina. En cada caja se colocó un frasco conteniendo 10 ml de jarabe 2:1 (2 kg de azúcar, 1 kg de agua) suplementado con EEP. Se evaluaron diferentes concentraciones de EEP, en un rango ubicado entre 50.000 ppm y 3125 ppm. Como control negativo se utilizó jarabe sin EEP. El ensayo se realizó por quintuplicado. Las cajas se colocaron a temperatura ambiente y se incubaron durante 24, 48 y 72 hs. Cada día se registró el número de abejas muertas y las mismas se retiraron de las cajas. Al finalizar el experimento se mataron todas las abejas y se calcularon los porcentajes de mortalidad debidas al EEP. Posteriormente se calculó la dosis letal 50 (dosis de EEP requerida para matar el 50 % de los individuos).

Ensayos de campo

La eficacia del EEP para el control de colmenas naturalmente infectadas con esporas de *P. larvae* se evaluó en un apiario localizado en Florida, Uruguay. Dicho apiario fue escogido por haber presentado episodios de pérdidas de colmenas por Loque Americana en temporadas anteriores. Dado que el número de esporas de *P. larvae* en miel (estimado como el número de unidades formadoras de colonias, UFC) puede ser considerado un indicador del status sanitario de la colmena (4, 8), se extrajeron 20 ml de miel (aproximadamente 27 g) de cada colmena y se determinó el número de UFC de *P. larvae* en cada muestra. Este muestreo preliminar se realizó en febrero del año 2006 para evaluar la situación sanitaria inicial del apiario.

Una vez finalizado el análisis de las muestras y de acuerdo a esos resultados, las colmenas se dividieron en cuatro grupos, dos grupos de 10 colmenas cada uno (grupos 1 y 2) y dos grupos de 5 colmenas (grupos 3 y 4). Las colmenas pertenecientes al grupo 1 se trataron con EEP al 6% en jarabe 1:1 (1 kg de azúcar en 1 l de agua) mientras que las colmenas control (grupo 2) se trataron sólo con jarabe 1:1. Ambos tratamientos se aplicaron mediante aspersor (50 ml por colmena) so-

bre la cámara de cría, una vez por semana durante tres semanas consecutivas, luego de la última cosecha (abril-mayo, 2006). Por otro lado, las colmenas del grupo 3 se trataron con EEP al 6% en 2 l de jarabe 2:1 pero en este caso el tratamiento se aplicó mediante alimentador. Las colmenas control (grupo 4) se trataron sólo con jarabe 2:1 mediante alimentador. Estos tratamientos se aplicaron sólo una vez, luego de la última cosecha.

El día de la primera aplicación de los tratamientos (día 0) y a los 21, 42 y 85 días, las colmenas fueron inspeccionadas y se tomaron muestras de miel para su posterior análisis.

Cuantificación de esporas de *P. larvae* en miel

Para la cuantificación de esporas de *P. larvae*, las muestras de miel se diluyeron en 20 ml de agua destilada estéril y se centrifugaron a 6.000 x g durante 45 min (4). El sedimento se resuspendió en 1 ml de agua destilada estéril y se calentó a 80 °C durante 20 minutos para eliminar otros microorganismos y activar la germinación de esporas de *P. larvae*. Se sembraron diluciones del sedimento en placas de medio J, las que se incubaron a 37 °C en condiciones de microaerofilia durante 96 hs, con el fin de determinar el número de UFC de *P. larvae* por gramo de miel. Tres a cinco colonias de cada muestra se seleccionaron para una identificación inicial mediante evaluación de la morfología de la colonia, caracterización microscópica y producción de catalasa (1). La confirmación de la identidad se realizó mediante amplificación específica de un fragmento del gen que codifica para el ARNr 16S (7, 25).

Posteriormente se realizaron análisis estadísticos (*Man Whitney two-sample test*) para corroborar la existencia de diferencias significativas entre el número de esporas en miel de las colmenas tratadas con EEP y de las colmenas control.

RESULTADOS

Ensayos de actividad antibacteriana

Todos los aislamientos de *P. larvae* evaluados resultaron susceptibles a las concentraciones ensayadas de EEP, siendo

la medida del halo de inhibición mayor a 20 mm en todos los casos. Por otro lado, el etanol no mostró actividad antibacteriana (Figura 1). La CIM promedio fue calculada en 54 ppm.

Toxicidad del EEP en abejas

Los análisis de toxicidad en abejas demostraron que aún a una concentración de EEP de 50.000 ppm no se alcanzó la dosis letal 50 (Figura 2). Por otra parte en estos ensayos no se observaron problemas de palatabilidad del EEP para las abejas.

Ensayos de campo

De acuerdo al muestreo preliminar, el 96% de las colmenas analizadas presentó esporas de *P. larvae*, de las cuáles el 82 % presentaron entre 1 y 200 esporas por g de miel, aunque no se detectaron síntomas clínicos de Loque Americana. Teniendo en cuenta estos resultados, las colmenas se dividieron en dos grupos de 10 y dos grupos de 5. La colmena 21, perteneciente al grupo tratado con EEP mediante aspersión (grupo 1) no produjo miel por lo que no fue

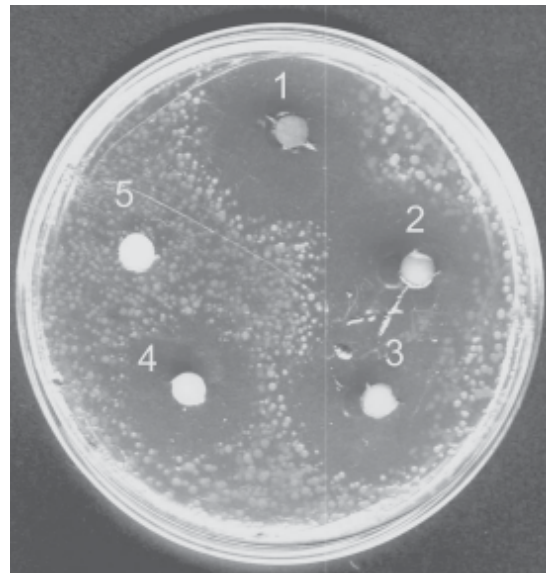


Figura 1. Ensayo de actividad antibacteriana de diferentes concentraciones de EEP frente a *P. larvae*. 1.- 200.000 ppm; 2.- 20.000 ppm; 3.- 4.000 ppm; 4.- 2.000ppm; 5.- control negativo.

posible incluirla en el estudio, por lo que este grupo quedó formado por 9 colmenas.

El día de la primera aplicación de los tratamientos se llevó a cabo un nuevo muestreo (día 0). Los análisis estadísticos indicaron que en ese momento no existían diferencias significativas entre el número de esporas por g de miel entre los grupos 1 (posteriormente tratado con EEP mediante aspersión) y 2 (control), ni entre los grupos 3 (posteriormente tratado

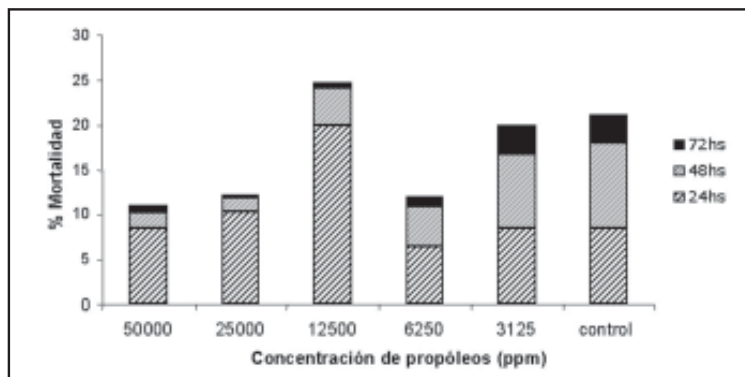


Figura 2.- Toxicidad del EEP en abejas.

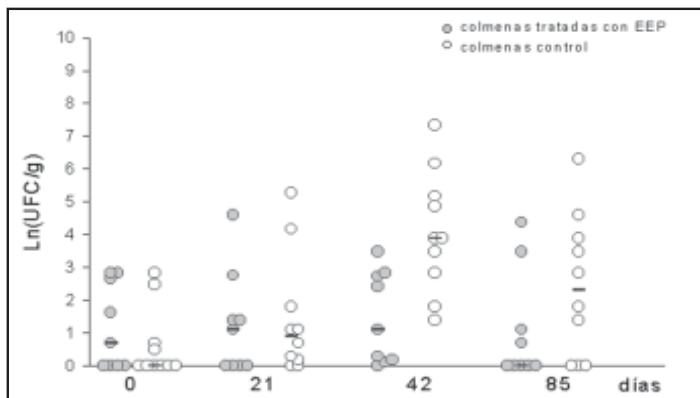


Figura 3. Variación del número de UFC de *P. larvae* en miel en colmenas tratadas con EEP mediante aspersor. Los puntos representan los valores de UFC por gramo de miel de cada colmena. Las líneas horizontales representan las medianas.

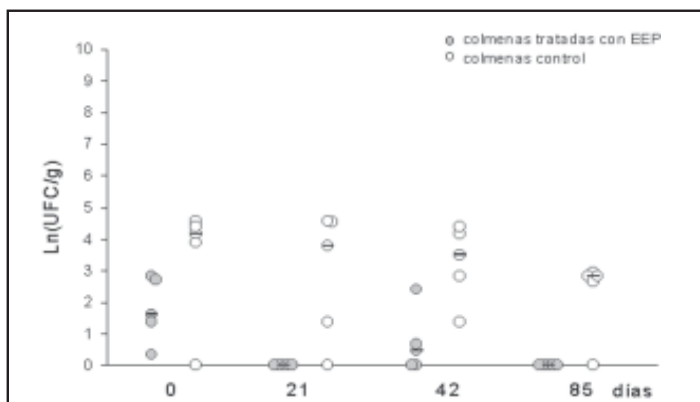


Figura 4. Variación del número de UFC de *P. larvae* en miel en colmenas tratadas con EEP mediante alimentador. Los puntos representan los valores de UFC por g de miel de cada colmena. Las líneas horizontales representan las medianas.

con EEP mediante alimentador) y 4 (control). Los resultados correspondientes a los niveles de UFC por g de miel de las distintas colmenas se presentan en la figuras 3 y 4. Veintiún días después de la aplicación de los tratamientos, no se detectaron diferencias significativa entre los grupos 1 y 2, aunque el número de esporas en las colmenas tratadas con EEP mediante alimentador (grupo 3) resultó significativamente menor que en el grupo control (grupo 4).

Sin embargo, 42 y 85 días después de la primera aplicación de los tratamientos el número de esporas por g de miel resultó significativamente menor en los grupos tratados con EEP (mediante aspersor y

alimentador, grupo 1 y 3) en relación a sus respectivos controles (grupos 2 y 4).

DISCUSIÓN

El presente trabajo constituye el primer reporte acerca de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de propóleos frente a *P. larvae*, agente causal de una de las más severas enfermedades que afectan a las abejas. En este trabajo se demuestra que el EEP posee actividad antibacteriana *in vitro* e *in vivo* contra *P. larvae*, y que resulta inocuo para las abejas.

Si bien el propóleos está presente en la colmena, no puede ser consumido directamente por las abejas ya que se encuen-

tra en estado sólido. La administración oral de un extracto de propóleos a abejas adultas facilita su consumo y su llegada al intestino larval, donde interactuaría con las células vegetativas de *P. larvae* inhibiendo su crecimiento.

La administración de propóleos presenta numerosas ventajas con respecto a otras alternativas de tratamiento basadas en la administración de drogas. En primer lugar, puede ser preparado por los mismos apicultores utilizando propóleos de sus propias colmenas, asegurándose la calidad del producto y disminuyendo sus costos. La forma de aplicación es sencilla, pudiéndose aplicar junto con el jarabe de alimentación que habitualmente se coloca para mejorar la nutrición, eliminando esfuerzos y gastos extra. Tampoco existe el riesgo de contaminación de la miel, ya que los compuestos presentes en el propóleos se encuentran naturalmente en las colmenas, ni efectos tóxicos que afectan la vida de las abejas.

Por otra parte, hasta el momento no existen reportes acerca de la aparición de cepas bacterianas resistentes al propóleos. Esto posiblemente se deba a que la actividad antibacteriana del propóleos se vincula con un complejo grupo de compuestos químicos y no a uno sólo frente al cual se pueda desarrollar resistencia. Trabajos previos han demostrado que estos compuestos probablemente actúan de forma sinérgica, ya que se ha demostrado que ninguno de estos componentes por sí mismo muestra mayor actividad antimicrobiana que el extracto total (6, 21).

La composición química del propóleos varía de acuerdo con la zona geográfica de origen, ya que se relaciona estrechamente con la flora local (19). Específicamente, el propóleos se prepara en base a resinas de las plantas de la zona donde se encuentra la colmena. Estas resinas son producidas por las plantas con el fin de sellar y proteger sus heridas, y si bien su composición química varía según la especie vegetal, la función y las propiedades biológicas se conservan (24). Los mismo sucede con el propóleos, ya que a pesar de las variaciones en su composición siempre resulta activo, independientemente de su origen (16).

Esta alternativa de control podría utilizarse en forma complementaria a las medidas recomendadas usualmente por las autoridades sanitarias: vigilancia para obtener un diagnóstico precoz, eliminación de las colonias que presenten síntomas, aislamiento de colmenas y materiales que tuvieron contactos con las colmenas eliminadas, esterilización de material, no alimentación con miel, lavado de la palanca entre el manejo de una colmena y otra.

La apicultura se ha convertido en un rubro de importancia creciente en el sector agroexportador de Uruguay. Además de los beneficios económicos generados directamente al sector, las abejas melíferas son los principales agentes encargados

de la polinización. Esta labor es esencial para la manutención de la diversidad biológica y la conservación de especies amenazadas, así como para la obtención de semillas y cultivos esenciales en la agricultura y la ganadería, influyendo de esta forma en toda la cadena productiva del país.

Debido a la importancia de las abejas melíferas en la economía de nuestro país así como en el medio ambiente alrededor del mundo, resulta fundamental continuar investigando acerca de estrategias naturales para el tratamiento de patógenos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto "Jóvenes Investigadores en el Sec-

tor Productivo" del Ministerio de Educación y Cultura y la Comisión Nacional de Fomento Rural.

Los autores agradecen a M. Eguaraz, L. Gende y M. Maggi por la colaboración en los ensayos de CIM y toxicidad de abejas, a M. Scarzella por la donación de las colmenas para los ensayos de campo, y a la Sección Apicultura del DILAVE, a la Comisión Honoraria de Desarrollo Apícola y al Centro de Estudios Apícolas del Uruguay por el apoyo al proyecto.

Referencias bibliográficas

1. Alippi, A. (1992). Characterization of *Bacillus larvae* White, the causative agent of American Foulbrood of honey bees. First record of its occurrence in Argentina. *Rev. Arg. Microbiol.* 24:67-72.
2. Alippi, A. (1996). Caracterización de aislamientos de *Paenibacillus larvae* mediante tipo bioquímico y resistencia a oxitetraciclina. *Rev. Arg. Microbiol.* 28:197-205.
3. Antúnez, K.; Piccini, C.; Castro-Sowinski, S.; Rosado, A.S.; Seldin, L.; Zunino, P. (2007). Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus larvae* isolates. *Vet. Microbiol.* 124:178-183.
4. Antúnez, K.; D'Alessandro, B.; Piccini, C.; Corbella, E.; Zunino, P. (2004). *Paenibacillus larvae larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey. *J. Invertebr. Pathol.* 86:56-58.
5. Bauer, A.W.; Kirby, M.M.; Sherris, J.C.; Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:493-496.
6. Bonvehi, S.J.; Coll, V.F.; Jorda, E.R. (1994). Estudio de la composición, principios activos y actividades bacteriostáticas de los propóleos en el ámbito dietario. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71:529-532.
7. D'Alessandro, B.; Antúnez, K.; Piccini, C.; Zunino, P. (2006). DNA extraction and PCR detection of *Paenibacillus larvae* spores from naturally contaminated honey and bees using spore-decoating and freeze-thawing techniques. *W. J. Microbiol. Biotech.* 23:593-597.
8. de Graff, D.C.; Vanderkerchove, D.; Dobbelaere, W.; Peeters, J.E.; Jacobs, F.J. (2001). Influence of proximity of American foulbrood cases and apicultural management on the prevalence of *Paenibacillus larvae* spores in Belgian honey. *Apidologie* 32:587-599.
9. Drago, L.; Mombelli, B.; Vecchi, E.; Fascina, M.; Tocalli, M.; Gismondo, M. (2000). In vitro antimicrobial activity of propolis dry extract. *J. Chemotherapy* 12:390-395.
10. Evans, E. (2003) Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 83:56-50.
11. Genersch, E.; Forsgren, E.; Pentikainen, J.; Ashiralieva, A.; Rauch, S.; Kilwinski, J.; Fries, I. (2006). Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvificiens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae larvae* without subspecies differentiation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:501-511.
12. Hansen, H.; Brodsgaard, C. (1999). American Foulbrood: a review of its biology, diagnosis and bee control. *Bee World* 80:5-23.
13. Hornitzky, M.A.Z.; Nicholls, P.J. (1993). J medium is superior to Sheep Blood Agar and Brain Heart Infusion for the isolation of *Bacillus larvae larvae* from honey samples. *J. Apicult. Res.* 32:51-52.
14. Kartal, M.; Yildiz, S.; Kaya, S.; Kurucu, S.; Topcu, G. (2003). Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *J. Ethnopharmacol.* 86:69-73.
15. Koenig, B.; Dustmann, J.H. (1987). Baumharze, Bienen und antivirale Chemotherapie. *Naturwissenschaftliche Rundschau* 41:43-53.
16. Kujumgiev, A.; Tsvetkova, I.; Serkedjieva, Y.; Bankova, V.; Christov, R.; Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.* 64:235-240.
17. Manolova, N.; Maximova, V.; Gegova, G.; Sekedjieva, Y.; Uzunov,

- S, Marekov, N, Bankova, V (1985). On the anti influenza action of fractions from propolis. *Comptes rendus de l'Academie bulgare de Sciences.* 38:735-738.
18. Marcucci, M.C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26:83-99.
 19. Markham, K.E.; Mitchel, K.A.; Wilkins, A.L.; Daldy, J.A.; Lu, Y. (1996). HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry.* 42:205-211.
 20. Martel, A.C.; Zeggane, S.; Drajnudel, P.; Faucon, J.P.; Aubert, M. (2006). Tetracycline residues in honey after hive treatment. *Food. Addit. Contam.* 23:265-273.
 21. Metzner, J.; Schneidewind, E.M.; Friedrich, E. (1977). Zur wirkung von propolis und pinocembrin auf sprosspilze. *Pharmazie* 32:730.
 22. Miyagi, T.; Peng, C.Y.S.; Chuang, R.Y.; Mussen, E.C.; Spivak, M.S.; Doi, R.H. (2000). Verification of oxytetracycline-resistant American Foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. *J. Invertebr. Pathol.* 75:95-96.
 23. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1986). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. 3rd Ed., Approved Standard Document (M2-A3).
 24. Ogren, W. (1990). What in the world is propolis used for. *Am. Bee J.* 130:239-240.
 25. Piccini, C.; D'Alessandro, B.; Antúnez, K.; Zunino, P. (2002). Detection of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae* spores in naturally infected larvae and artificially contaminated honey by PCR. *W. J. Microbiol. Biotech.* 18:761-765.
 26. Piccini, C.; Zunino, P. (2000). American Foulbrood in Uruguay: Isolation of *Paenibacillus larvae larvae* from larvae with clinical symptoms and adult honeybees and susceptibility to oxytetracycline. *J. Inv. Pathol.* 78:176-177.
 27. Santos, F.; Bastos, E.; Maia, A.; Uzeda, M.; Carvalho, M.; Farias, L.; Moreira, E. (2003). Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. *Phytotherapy Res.* 17:285-289.
 28. Thompson, H.M.; Waite, R.J.; Wilkins, S.; Brown, M.A.; Bigwood, T.; Shaw, M.; Ridgway, C.; Sharman, M. (2005). Effects of European foulbrood treatment regime on oxytetracycline levels in honey extracted from treated honeybee (*Apis mellifera*) colonies and toxicity to brood. *Food. Addit. Contam.* 22:573-578.
 29. Tichy, J.; Novak, J. (2000). Detection of antimicrobials in bee products with activity against viridans streptococci. *J. Alt. Compl. Med.* 6:383-389.
 30. Tura. (2005). Mesa Apícola de Sanidad. 1º Congreso de Apicultura del Mercosur, Punta del Este, Uruguay.