

Characterisation of *in vitro* antibacterial effect of a veterinary medical product called NAF against the causative agent (*Paenibacillus larvae*) of American foulbrood of honey bee (*Apis mellifera*)

L. Makrai^{1*}

K. Sági¹

Zs. Lőrincz²

K. Nemes-Barnás²

L. Békési³

1. Állatorvostudományi Egyetem,
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék,
1143 Budapest, Hungária krt. 23-25.

*e-mail: makrai.laszlo@univet.hu

2. Autovakcina Kft.,
1171 Budapest, Szabadság sugárút 57.

3. Haszonállat-génmegőrzési Központ,
Méhészeti és Méhbiológiai Intézet,
2100 Gödöllő, Isaszegi út 200.

A mézelő méhek (*Apis mellifera*) nyúlós költésrothadását okozó hazai *Paenibacillus larvae* törzsek NAF gyógyhatású állatgyógyászati készítménnyel szembeni *in vitro* érzékenységének jellemzése

Makrai László^{1*}, Sági Krisztina¹, Lőrincz Zsanett²,
Nemes-Barnás Katalin², Békési László³

ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálataink során meghatároztuk a NAF gyógyhatású állatgyógyászati készítmény *in vitro* minimális gátló koncentrációját (MIC) összesen 30, Magyarország különböző területeiről izolált *Paenibacillus larvae* törzs esetén. A MIC-értékeket leveshígítási módszerrel határoztuk meg, összhangban a CLSI ajánlásaival. Az eredmények alapján a készítmény minimális gátló koncentrációja a megvizsgált 30 izolátum esetén 0,015 és 1,953 µl/ml közötti tartományba esett. Vizsgálataink a kórokozó vegetatív alakjára érvényesek. A kórokozó vegetatív alakjának *in vitro* érzékenységéből nem vonhatóak le közvetlen következtetések a termék *in vivo* hatékonyságára vonatkozóan.

SUMMARY

Background: American foulbrood (AFB) is the most important bacterial disease of honeybees with worldwide distribution, which causes high economic losses. The causative agent is *P. larvae* a Gram-positive, rod-shaped, motile, spore forming bacterium species. Usage of antibiotics for treatment of this disease is not allowed in most countries because of the residues in honey and other bee-products. Therefore, there is a great interest to find alternative and effective AFB-controlling natural substances, such as plant essential oils, which have natural antibacterial effect.

Objectives: Antibacterial activity (Minimal Inhibitory Concentration) of a veterinary medical product called „NAF” (Chemor Ltd., Hungary) against 30 *P. larvae* strains isolated from different area of Hungary was determined. Strains originating from Hungarian apiaries were isolated and identified in 2015.

Materials and Methods: Vegetative cells of *P. larvae* were grown on Columbia Agar supplemented with 10% defibrinated sheep blood. Bacterial suspension was set to MacFarland standard 0.5 that corresponds with 10⁵ CFU/ml bacterial density.

Determination of MIC-values were carried out using broth dilution method in 48-well tissue culture plates. After the inoculation of the bacteria the tissue culture plates were incubated at 37 °C for 48 hours. After the incubation period the bacterial growth was evaluated with naked eye.

Results and Discussion: MIC range of NAF veterinary medical product was between 0.015 and 1.953 µl/ml in case of the investigated *P. larvae* strains. MIC₅₀ and MIC₉₀ values were both determined as 0.997 µl/ml.

In vivo effect of the product should be carefully evaluated due to the poor information about the concentration of the active ingredients in the royal jelly. Therefore, conclusion about *in vivo* efficacy of the product should not be deducted, based on the *in vitro* susceptibility of the vegetative form of the pathogen.

MÉH
MÉH

A mézelő méh (*Apis mellifera*) egyik legelterjedtebb és jelentős gazdasági károkat okozó bakteriális fertőző betegsége a *P. larvae* által okozott nyúlós (v. amerikai) költésrothadás (17).

Korábban a betegséget antibiotikumokkal kezelték (8, 21), azonban a legtöbb európai országban a beteg méhcsaládok gyógykezelése jelenleg tilos. Az antibiotikumok nem hatnak a *P. larvae* spórákra, hiszen ezek aktív anyagcserével nem rendelkeznek. Antibiotikumok használata esetén, azok belekerülnének a mézbe, ami szakmai szempontból több ok miatt is aggályos lenne (19). Ezt felismerve, egyre több kutatás keres a betegségre alternatív gyógymódot (10). A betegség klinikai tüneteinek kialakulásának megelőzésére irányuló kutatások egyik területe a természetes antibakteriális hatású szerek, növényi kivonatok és illóolajok használata.

A növényi eredetű illóolajok antimikrobiális hatását számos kórokozóval szemben kimutatták

A növényi eredetű illóolajok antimikrobiális hatását számos kórokozóval szemben kimutatták (22). Ezek a tulajdonságok a bennük található fenoloid és terpenoid típusú vegyületeknek köszönhetőek (6). DORMAN és DEANS 25 különböző baktériumtörzs, többek között fakultatív patogén *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* érzékenységét vizsgálták feketebors (*Piper nigrum*), szegfűszeg (*Syzygium aromaticum*), muskátli (*Pelargonium graveolens*), szerecsendió (*Myristica fragrans*), oregánó (*Origanum vulgare*) és kakukkfű (*Thymus vulgaris*) illóolaj, valamint egyes összetevőik tekintetében. Valamennyi illóolaj esetében megfigyelték a baktériumok szaporodására gyakorolt gátló hatást. A különböző komponensek közül a fenolos vegyületek, mint a karvakrol, eugenol és timol bizonyultak a leghatékonyabbnak (8).

A mézelő méhek kártevői elleni védekezésben is hatásosnak bizonyultak bizonyos antibakteriális és gombaellenes hatású illóolajok *in vitro* vizsgálatokban (3, 4, 7, 11, 12, 13, 14). EUGARAS és mtsai egy vadon élő bársonyvirág faj (*Tagetes minuta*) illóolajának gomba- és atkaölő tulajdonságát írták le *Ascosphaera apis* és *Varroa destructor* esetében (9).

Számos növényi kivonat antimikrobiális hatását bizonyították *P. larvae* ellen

Számos növényi kivonat, többek között kakukkfű, oregánó, borsmenta és az eukaliptusz illóolajának antimikrobiális hatását bizonyították *P. larvae* ellen (1, 2, 3, 22, 23). ALIPPI és mtsai különböző illóolajok MIC-értékeinek meghatározása során a leghatékonyabbnak az indiai citromfűvet (*Cymbopogon citratus* [MIC: 50–100 µl/l]), a kakukkfűvet (*Thymus vulgaris* [MIC: 100–150 µl/l]) és az oregánót (*Origanum vulgare* [MIC: 250–450 µl/l]) találták (3). Eredményeiket a kakukkfű és az oregano esetében Kuzyšinová és mtsai is megerősítették (18).

A fahéj és különböző komponensei kiemelkedően jó antibakteriális hatással rendelkeznek

A fahéj (*Cinnamon zeylanicum*) és különböző komponensei kiemelkedően jó antibakteriális hatással rendelkeznek (22). Fő összetevői a fahéjaldehid (79,3%) és az eugenol (11,9%), emellett találhatóak még benne terpén vegyületek is (α-pinén, karofillén) kisebb mennyiségben (15). GENDE és mtsaia fahéjolaj *in vitro* vizsgálata során erős gátló hatást írtak le *P. larvae* ellen (MIC: 25–100 µl/l), hasonlóan ALIPPI és mtsai (3) kakukkfűvel és indiai citromfűvel kapott értékeihez (15). Későbbi vizsgálataik során a fahéjolaj MIC-értékét a kísérlet során használt oxitetraciklin antibiotikumhoz hasonló, 50 µg/ml koncentrációban határozták meg az általuk vizsgált *P. larvae* törzsekkel szemben. A fahéjolaj a betegség kezelésében az oxitetraciklinhez hasonló mértékben hatásosnak bizonyult mesterséges ráfertőzéses kísérlet során is (16).

A NAF gyógyhatású állatgyógyászati készítmény a kakukkfűből kinyerhető timol illóolajat és fahéjolajat tartalmaz gyógynövények vizes-alkoholos kivonatában oldva

A NAF gyógyhatású állatgyógyászati készítmény a kakukkfűből kinyerhető timol illóolajat (1,9–2,3 g/100 ml) és fahéjolajat (0,5–0,9 g/100 ml) tartalmaz gyógynövények (diólevél, kerti kakukkfű, majoránna, szurokfű) vizes-alkoholos kivonatában oldva, amelyet az indikáció alapján a mézelő méhek etetésére készített cukorszirupba kell bekeverni 1%-os arányban.

Vizsgálataink célja az volt, hogy hazai földrajzilag reprezentatív eredetű és számú baktériumtörzs bevonásával megvizsgáljuk és konkrét adatokkal jelle-

A nyúlós költésrothadás kezelésére egyre több kutatás keres alternatív gyógymódot

mezzük ezen állatgyógyászati termék *P. larvae* vegetatív alakjainak szaporodására gyakorolt gátló hatását.

SAJÁT VIZSGÁLAT

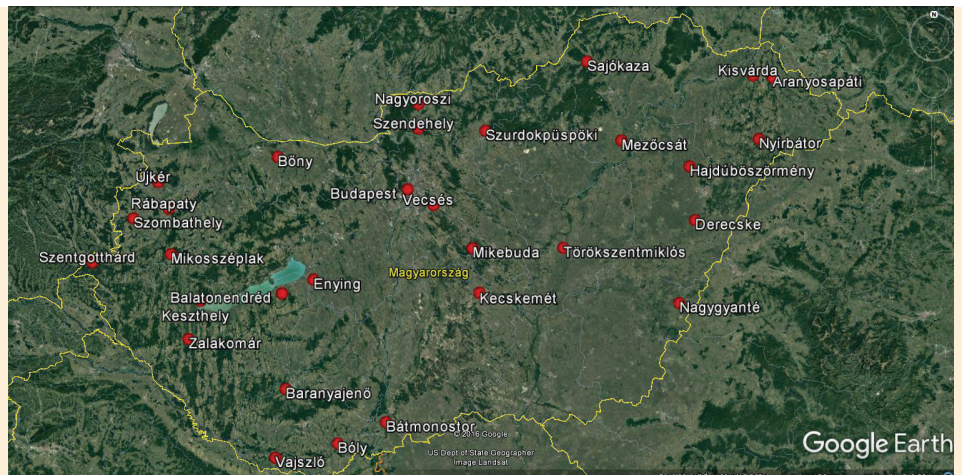
A szerzők a készítmény *P. larvae* vegetatív alakjainak szaporodására gyakorolt gátló hatását vizsgálták

A vizsgálataink célja a NAF gyógyhatású állatgyógyászati készítmény minimális gátló koncentrációjának (MIC) meghatározása Magyarország különböző területeiről izolált *P. larvae* törzsek esetében. A felhasznált baktériumtörzseket hazai méhészetekből izoláltuk és azonosítottuk a 2015-ös év folyamán (20). A MIC értékeket leveshígítási módszerrel határoztuk meg, összhangban a Committee of Laboratory Standards Institute (CLSI) „Eljárási szabványok állatokból izolált baktériumok antibiotikumokkal szembeni érzékenységének kororogdiffúziós és hígítási vizsgálatához” VET01-A4 jelzésű kiadványában megadott, standard eljárásokkal (5).

A vizsgálatba bevont, mézmintákból izolált baktériumtörzsek földrajzi eredetét a térképen ábrázoltuk (Ábra).

ÁBRA. A vizsgálatba bevont 30 *Paenibacillus larvae* törzs földrajzi eredete

FIGURE. Geographical origin of the investigated 30 *Paenibacillus larvae* strains



ANYAG ÉS MÓDSZER

BAKTÉRIUMSZUSZPENZIÓ (INOKULUM) KÉSZÍTÉSE

A baktériumokat 10% steril, defibrinált juhvérrel kiegészített Columbia agaron szaporítottuk el 5% CO₂-ot is tartalmazó aerob légköri viszonyok között. A szilárd táptalaj felületéről néhány baktériumtelepet steril vattatamponnal összegyűjtöttünk, majd steril fiziológiai konyhasóoldatban szuszpendáltuk úgy, hogy a baktériumsűrűség 0,5 MacFarlandnak (kb. 10⁵ telepformáló egység (TFE)/ml) feleljen meg.

A MIC-ÉRTÉKEK MEGHATÁROZÁSA LEVESHÍGÍTÁSOS MÓDSZERREL

1. Munkaoldat-készítés

A NAF-készítményt a CHEMOR Kutató, Fejlesztő és Kereskedő Kft. bocsátotta rendelkezésünkre. A készítményt felhasználás előtt minden esetben homogenizáltuk.

2. MIC-értékek meghatározása leveshígítási módszerrel

A MIC-értékek meghatározását leveshígítási módszerrel végeztük 24 lyukú tenyésztőlemezen (Greiner Bio-One Hungary Kft.). 1–1 ml táptalajt (Müller-Hinton Broth, Biolab Zrt.) mértünk minden egyes lyukba A1-től D6-ig, majd 1 ml

A MIC-értékek meghatározását leveshígítási módszerrel végezték

NAF-oldatot adtunk az A1 lyukhoz és 1 ml-es pipettával alaposan összekevertük. Ezek után felező hígítást végeztünk az A1-től a D2-es lyukig. Minden lépésnél 1 ml NAF-tartalmú szuszpenziót vittünk tovább a következő lyukba és alaposan összekevertük. A D3 és D4-es lyuk nem tartalmazott sem NAF-oldatot sem baktériumszuszenziót, ezek a lyukak negatív kontrollként szolgáltak. A D5 és D6 lyukak nem tartalmaztak NAF-oldatot, ezek a pozitív kontrollok voltak.

A NAF-koncentrációk a lemezen 500 µl/ml és 0,0009 µl/ml közötti tartományba estek. A negatív kontrollok kivételével valamennyi cellát beoltottuk 5 µl baktériumszuszenzióval (inokulum) (10⁵ TFE/ml).

A tenyészetek beoltása után a lemezeket 48 órán keresztül inkubáltuk 37 °C hőmérsékleten, majd 48 óra után a baktériumok növekedését szabad szemmel történő vizsgálatokkal értékeltük ki.

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

Vizsgálataink során meghatároztuk a NAF gyógyhatású állatgyógyászati készítmény *in vitro* minimális gátló koncentrációját (MIC) összesen 30, Magyarország különböző területeiről izolált *Paenibacillus larvae* törzs esetén.

Az eredmények alapján a NAF minimális gátló koncentrációja a 0,015 és 1,953 µl/ml közötti értéktartományba esett, tehát a törzsek nem egységesen viselkedtek, akár 130-szoros különbség is megfigyelhető volt az érzékenységükben, bár a legkevésbé érzékeny törzs is jelentős gátlást szenvedett a készítmény jelenléte esetén. A vizsgált *Paenibacillus larvae* törzsek 50%-a esetében a MIC-értéke 0,977 µl/ml volt. A legkevésbé érzékeny törzs MIC-értékét 1,953 µl/ml-nek, a legérzékenyebb törzsekét pedig 0,015 µl/ml-nek találtuk (Táblázat).

A vizsgálatokban a törzsek nem egységesen viselkedtek, akár 130-szoros különbség is megfigyelhető volt az érzékenységükben

TÁBLÁZAT. Az NAF gyógyhatású állatgyógyászati készítmény MIC- (minimális gátló koncentráció) értékei a vizsgált *Paenibacillus larvae* törzsek esetén

TABLE MIC values of the NAF veterinary medical product in the investigated *Paenibacillus larvae* strains

MIC érték (µl/ml)	Izolátumok száma (%)
1,953	1 (3,33%)
0,977*	15 (50%)
0,488	9 (30%)
0,244	1 (3,33%)
0,061	1 (3,33%)
0,031	1 (3,33%)
0,015	2 (6,66%)

* MIC₅₀ és MIC₉₀ értékek felel meg

A legkevésbé érzékeny törzs is jelentős gátlást szenvedett a készítmény jelenléte esetén

A kapott eredmények a kórokozó vegetatív alakjára érvényesek, nem nyújtanak információt a spórák tekintetében

A vizsgálat részeként meghatároztuk az összes baktériumtörzs 50%-ának, ill. 90%-ának növekedését gátló NAF-koncentrációt (MIC₅₀ és MIC₉₀ értékek). Eredményeink alapján a MIC₅₀ és a MIC₉₀ értékeket egyaránt 0,997 µl/ml-nek találtuk.

A gyártó az NAF-készítmény használata során az 1%-os bekeverési arányt javasolja, ami 10 µl/ml végső koncentrációnak felel meg. Eredményeink alapján ez a koncentráció *in vitro* gátló hatása a *P. larvae* baktérium vegetatív alakjára.

Vizsgálataink a kórokozó vegetatív alakjára érvényesek, nem nyújtanak információt a kórokozó spórájának kicsírázásának gátlására, ill. a spóra, mint fertőző alak károsítására vonatkozóan.

Kellő óvatossággal és mértéktartással értékelendők a készítmény *in vitro* hatékonyságából levonható következtetések az *in vivo* hatásra vonatkozóan, mivel erre nem terjedtek ki a vizsgálataink, ill. nem állnak rendelkezésre

A kórokozó vegetatív alakjának in vitro érzékenységéből nem vonhatóak le közvetlen terápiás következtetések a termék in vivo hatékonyságára vonatkozóan

adatok arról, hogy a méhpempőben, és a lárva középbélében ezek a hatóanyagok milyen koncentrációban lehetnek jelen. Emiatt a kórokozó vegetatív alakjának *in vitro* érzékenységéből nem vonhatóak le közvetlen terápiás következtetések a termék *in vivo* hatékonyságára vonatkozóan.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnénk köszönetünket kifejezni DR. ORBÁN GYULÁNAK, a CHEMOR Kutató, Fejlesztő és Kereskedő Kft. igazgatójának, hogy a NAF gyógyhatású állatgyógyászati készítményt a rendelkezésünkre bocsátotta.

IRODALOM

- ALBO, G. N. – CERIMELE, E. et al.: Foulbrood: field trials for evaluating the effectiveness of some essential oils (In Spain). *Vida Apícola*, 2001. 108. 41–46.
- ALBO, G. N. – HENNING, C. et al.: Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American foulbrood disease in honey bees. *Apidologie*, 2003. 34. 417–437.
- ALIPPI, A. M. – RINGUELET, J. A. et al.: Antimicrobial activity of some essential oils against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood disease. *J. Herbs. Spices. Med. Plants.*, 1996. 4. 9–16.
- ANSARI, M. J. – AL-GHAMDIA, A. et al.: *In vitro* evaluation of the effects of some plant essential oils on *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 2016. 30. 49–55.
- CLSI: *Performance standards for antibacterial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved Standard – 4th Edition*. CLSI document VET01-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA. 2013.
- CONNER, D. E.: Naturally occurring compounds. In: Davidson, P. – Branen, A. L. (editors) *Antimicrobials in foods*. New York (NY): Marcel Dekker Publishing Company; 1993. 441–468.
- DELLACASA, A. D. – BAILAC, P. N. et al.: *In vitro* activity of essential oils from San Luis-Argentina against *Ascosphaera apis*. *J. Essent. Oil. Res.*, 2003. 15. 282–285.
- ORMAN, H. J. D. – DEANS, S. G.: Antimicrobial agents from plants, antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Applied. Microbiol.* 2000. 88. 308–316.
- EGUARAS, M. – FUSELLI, S. R. et al.: An *in vitro* evaluation of *Tagetes minuta* essential oil for the control of the honeybee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*, and the parasitic mite *Varroa destructor*. *J. Essent. Oil. Res.*, 2005. 17. 336–340.
- EVANS, J. D.: Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 2003. 83. 1. 46–50.
- FUSELLI, S. R. – GARCÍA DE LA ROSA, S. B. et al.: Antimicrobial activity of some Argentinean wild plant essential oils against *Paenibacillus larvae larvae*, causal agent of American foulbrood (AFB). *J. Apicult. Res.*, 2006. 45. 2–7.
- FUSELLI, S. R. – GARCÍA DE LA ROSA, S. B. et al.: Efficacy of indigenous plant essential oil Andean thyme (*Acantholippia seriphoides* A. Gray) to control American foulbrood (AFB) in honey bee (*Apis mellifera* L.) hives. *J. Essent. Oil. Res.*, 2007. 19. 501–506.
- FUSELLI, S. R. – MAGGI, M. D. et al.: *In vitro* antibacterial and antiparasitic effect of citrus fruit essential oils on the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae* and the parasitic mite *Varroa destructor*. *J. Apic. Res.*, 2009. 48. 77–78.
- FUSELLI, S. R. – GARCÍA DE LA ROSA, S. B. et al.: *In vitro* antibacterial effect of exotic plants essential oils on the honeybee pathogen *Paenibacillus larvae*, causal agent of American foulbrood. *Spain. J. Agric. Res.*, 2010. 8. 651–657.
- GENDE, L. B. – FLORIS, I. et al.: Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil and its main components against *Paenibacillus larvae* from Argentine. *Bull. Insectology*, 2008. 61. 1–4.
- GENDE, L. B. – MAGGI, M. D. et al.: Advances in the apiary control of the honeybee American Foulbrood with Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil. *Bull. Insectology*, 2009. 62. 1. 93–97.
- GENERSCH, E.: American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 2010. 103. 10–19.
- KUZYŠINOVÁ, K. – MUDROŇOVÁ, D. et al.: Testing of inhibition activity of essential oils against *Paenibacillus larvae* – the causative agent of American foulbrood. *Acta Vet. Brno*, 2014. 83. 9–12.
- LODESANI, M. – COSTA, M.: Limits of chemotherapy in beekeeping: development of resistance and the problem of residues. *Bee World*, 2005. 86. 102–109.
- MAKRAI, L. – SÁGI K. – LŐRINCZ ZS. – NEMES-BARNÁS K. – BÉKÉSI L.: Baktériumtörzs-gyűjtemény létrehozása a mézelő méhek (*Apis mellifera*) nyúlós (amerikai) költésrothadását okozó *Paenibacillus larvae* hazai reprezentatív izolátumaiból. *Magy. Állatorv. Lapja*, 2017. 139. 361–376.
- McKEE, B.: Contamination issues for honey in Australia. Workshop International of Quality Honey, Quality assurance manager, Capilano Group of Companies, Rafaela, Santa Fé, Argentina, 2004. 24–29 September.
- RANA, I. S. – SINGH, A. – GWAL, R.: *In vitro* study of antibacterial activity of aromatic and medicinal plants essential oils with special reference to cinnamon oil. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2011. 3. 376–380.
- ROUSSENOVA, N.: Antibacterial activity of essential oils against the etiological agent of American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae*). *Bulg. J. Vet. Med.*, 2011. 1. 17–24.

Közlésre érk.: 2017. ápr. 8.