

**JANINA CARVALHO GONÇALVES**

**AVALIAÇÃO DE ESPOROS *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* EM MEL DE  
APIÁRIOS DO ESTADO DO PIAUÍ E DE MÉTODOS DE DETECÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2004**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

G635a  
2004

Gonçalves, Janina Carvalho, 1972-  
Avaliação de esporos *Paenibacillus larvae subsp. larvae*  
em mel de apiários do estado do Piauí e de métodos de  
detecção / Janina Carvalho Gonçalves. – Viçosa : UFV,  
2004.  
vii, 39f. : il. ; 29cm.

Orientador: Dejair Message  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 32-39

1. *Paenibacillus larvae*. 2. Esporos bacterianos. 3. Mel.  
4. Testes microbiológicos. 5. Cria Pútrida Americana.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 20.ed.

**JANINA CARVALHO GONÇALVES**

**AVALIAÇÃO DE ESPOROS *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* EM MEL DE  
APIÁRIOS DO ESTADO DO PIAUÍ E DE MÉTODOS DE DETECÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 30 DE JULHO DE 2004.

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Cristina Dantas Vanetti  
(Conselheira)

---

Prof. Marcelo Coutinho Picanço  
(Conselheiro)

---

Prof. Lúcio Antônio de Oliveira Campos

---

Prof. José Cola Zanuncio

---

Prof. Dejair Message  
(Orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Dejair Message, pela orientação, confiança e apoio durante os estudos.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pela grande contribuição na finalização deste trabalho.

À doutora Dulce Maria Tocchetto Schuch pela atenção, aconselhamento e ensinamentos essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao professor Marcelo Coutinho Picanço, pelo apoio e auxílio na análise e conclusões deste trabalho.

Aos professores Lúcio Antônio de Oliveira Campos e José Cola Zanuncio pelas melhorias propostas na elaboração deste documento.

À doutora Maria Teresa Rêgo Lopes e demais colegas da Embrapa Meio-Norte pelo auxílio nos trabalhos realizados no Estado do Piauí.

À amiga Adriana Lago Melo pela atenção e apoio na coleta de amostras de mel.

Aos apicultores do Estado do Piauí que forneceram as amostras de mel para o estudo.

À doutora Lisane Goldmeier Tochetto pela atenção e conhecimentos transmitidos sobre a metodologia utilizada na pesquisa.

Aos colegas Alfredo e Márcio, pela ajuda na realização das análises estatísticas.

Aos servidores do Departamento de Biologia Animal da UFV, em especial ao Ferreira pelo auxílio técnico nas atividades de laboratório e a Dona Paula pela gentileza no atendimento e informações prestadas.

A todos os professores, amigos e colegas pelo apoio emocional e intercâmbio científico.

## ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Cria pútrida americana.....	4
2.1.1. Caracterização do agente etiológico.....	4
2.1.2. Etiologia.....	5
2.1.3. Sintomas e diagnóstico da doença na colméia.....	7
2.1.4. Mecanismos de dispersão de <i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> dentro e entre colméias .....	8
2.1.5. Distribuição geográfica da doença .....	9
2.2. Incidência de <i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> em produtos apícolas.....	9
2.2. Métodos para detecção de <i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> .....	11
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Investigação de <i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> em mel.....	15
3.1.1. Amostras de mel.....	15
3.1.2. Preparo das amostras.....	17
3.1.3. Isolamento e confirmação de <i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> .....	17

3.2. Avaliação de meios de cultura para detecção de <i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> em mel .....	18
3.2.1. Amostras de mel.....	18
3.2.2. Microrganismos.....	18
3.2.3. Preparo da suspensão de esporos de <i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> .....	18
3.2.4. Contaminação do mel com <i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> .....	19
3.2.5. Isolamento e contagem de <i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> .....	20
3.3. Avaliação da diluição, tempo e velocidade de centrifugação do mel para detecção <i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> .....	21
3.3.1. Amostras de mel.....	21
3.3.2. Contaminação do mel com <i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> .....	21
3.3.3. Isolamento e contagem de <i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> .....	22
3.4. Desinfecção de material contaminado com esporos de <i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> .....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1. Investigação de <i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> em mel de apiários do Estado do Piauí .....	23
4.2. Avaliação de meios de cultura para detecção de <i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> em mel .....	25
4.3. Avaliação da diluição, tempo e velocidade de centrifugação do mel para detecção <i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> .....	28
5. CONCLUSÕES.....	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

## RESUMO

GONÇALVES, Janina Carvalho, M. S., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2004. **Avaliação de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* em mel de apiários do Estado do Piauí e de métodos de detecção.** Orientador: Dejair Message. Conselheiros: Maria Cristina Dantas Vanetti e Marcelo Coutinho Picanço.

Este trabalho teve como objetivo investigar a presença de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* em mel de colméias do Estado do Piauí, pelo método analítico oficial brasileiro, e avaliar modificações nesta metodologia para reduzir seu limite de detecção. Esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* não foram detectados em mel das colméias de diferentes regiões do Estado do Piauí. Comparando meios de cultura, o ágar *P. larvae* isolou maior número esporos desta bactéria presentes em mel e inibiu do mesmo modo contaminantes aeróbios presentes. A diluição de uma parte de mel em quatro partes de solução salina fosfatada tamponada recuperou maior número de esporos *P. larvae* subsp. *larvae* presentes em mel. As forças centrífugas 6000 g e 8000 por 30 ou 40 minutos não diferiram entre si, contudo recuperaram maior número de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* em comparação com a oficialmente recomendada. A redução no limite de detecção é relevante para análise de mel, principalmente, quando o patógeno encontra-se em quantidades mínimas, tanto na colméia quanto no produto comercializado.



## ABSTRACT

GONÇALVES, Janina Carvalho, M. S., Universidade Federal de Viçosa, July de 2004. **Valuation of spores of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* in honey of apiary from Piauí State and of analyticals methods.** Adviser: Dejair Message. Committee members: Maria Cristina Dantas Vanetti and Mrcelo Coutinho Picanço.

This work had the following aims: detect the presence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in honey collected in Piauí State apiaries using official Brazilian analytical method and to verify modifications in this methodology to reduce its detection limit. Spores of *P. larvae* subsp. *larvae* were not found in honey of hives from different regions of Piauí State. Comparing mediums, *P. larvae* agar isolated bigger spores quantities of these bacteria found in honey and inhibited, in the same way, other aerobical bacteria presented. Addition of one part of honey in four parts of phosphate buffer saline pH 7.2 isolated a bigger number of *P. larvae* subsp. *larvae* spores presented in honey. Comparisons between centrifuge forces of 6000 g and 8000 during 30 or 40 minutes showed that they were not different, however they recuperated a bigger number of *P. larvae* subsp. *larvae* spores than centrifuge force recommended in Brazilian law. Reduction in detection limit is important to honey analyses, mainly when pathogen is present in minimal quantities in hives or in commercialized product.

## 1. INTRODUÇÃO

A criação de abelhas *Apis mellifera* no Brasil alcançou um destaque como atividade econômica, somente na década de 70, quase quinze anos após a introdução da subespécie africana *A. mellifera scutellata* e seu cruzamento com as demais subespécies européias presentes (*A. mellifera ligustica*, *A. mellifera mellifera* e *A. mellifera carnica*). O polihíbrido resultante mostrou-se extremamente produtivo, mas foi necessário estudá-lo intensamente e desenvolver técnicas de manejo e equipamentos adequados devido à dominância das características da subespécie africana, especialmente o seu comportamento defensivo.

A consolidação deste agronegócio tem levado ao aumento da produção, desenvolvimento de novas empresas e a exportação dos produtos apícolas. É uma atividade econômica sustentável, pois gera renda para os pequenos agricultores, ocupa a mão-de-obra familiar no campo, não necessita desmatar a vegetação nativa para sua implantação e as abelhas desempenham um papel importante na polinização. Também pode garantir, através da polinização, o aumento da produtividade quando consorciada com culturas agrícolas.

A sanidade é pode afetar o desenvolvimento da apicultura, pois *A. mellifera* é suscetível a doenças por agentes como bactérias, vírus, fungos, parasitas e á desordens metabólicas, nutricionais e hormonais, além de intoxicações diversas.

O ácaro ectoparasita *Varroa destructor* e a bactéria *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* causadora da Cria Pútrida Americana (CPA), estão entre os principais problemas de sanidade para a apicultura mundial. *V. destructor* foi introduzido no Brasil na década de 70 e encontra-se distribuída em todo o território com baixos níveis de infestação. Contudo nenhum caso de CPA foi oficialmente relatado no Brasil. Isto é importante, pois a CPA é uma das mais graves doenças de cria de abelhas, principalmente, pelo fato do agente etiológico desenvolver esporos altamente resistentes a agentes físicos e químicos. Estes esporos presentes na colméia naturalmente contaminam os produtos apícolas e, conseqüentemente, facilitam sua dispersão.

Nenhum caso sintomático de AFB foi oficialmente relatado no Brasil. Porém a introdução desta doença no Brasil ocasionaria prejuízos significativos como a perda de colméias e da produção. Além daqueles decorrentes de mudanças no manejo e da implantação de programas de controle do governo. Tratamentos curativos, além de seu custo adicional, poderiam selecionar linhagens resistentes do patógeno. Outros problemas relacionados seriam a desvalorização de produtos contaminados, o risco de embargo no mercado internacional e a inviabilização da produção de “mel orgânico”.

A intensificação da trocas comerciais internacionais de produtos agropecuários aumenta o risco da introdução de pragas e agentes patogênicos que comprometem os agronegócios brasileiros. Esta preocupação aumentou com a detecção pelo Brasil de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* em mel importado.

Nos registros de importação de mel observa-se, a partir de 2002, uma redução expressiva da importação e o crescimento da exportação. No entanto, sua escassez no mercado interno pode levar ao retorno das importações, principalmente, da Argentina e Uruguai onde a CPA ocorre, e ao perigo da introdução do patógeno *P. larvae* subsp. *larvae*.

A necessidade de identificar e controlar a CPA tem levado a implementação de programas de inspeção em muitos países. No Brasil a defesa sanitária brasileira criou o Comitê Científico Consultivo em Sanidade Apícola junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento com a finalidade de oferecer subsídios técnicos-científicos para elaboração de normas e procedimentos relacionados à sanidade do plantel apícola brasileiro e a importação de abelha e produtos apícolas (Brasil, 2003a).

Nesse sentido, também foi aprovada regulamentação sobre a importação de produtos apícolas (Brasil, 2003b). Atualmente, todo produto apícola importado, de qualquer procedência, além da exigência de certificado sanitário, deve ser submetido à teste por metodologia analítica oficial (Brasil, 2003c) para pesquisa de *P. larvae* subsp. *larvae*.

O primeiro isolamento de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* em abelhas e mel de colméias sem sintomas clínicos de CPA foi realizado no Estado do Rio Grande do Sul por Schuch (2003). A contaminação pode ter ocorrido pela alimentação das abelhas com produtos importados contaminados (mel e pólen) ou até pela colheita por abelhas campeiras do alimento contaminado no interior do entreposto. Então o governo brasileiro tomou medidas imediatas para erradicação deste patógeno naquela região.

O monitoramento desta bactéria em mel, coletado diretamente nas colônias de abelhas, entrepostos e comércio, é fundamental diante do risco de sua introdução e para controlar sua dispersão, caso seja introduzida. O método para pesquisa de *P. larvae* subsp. *larvae*, agente da enfermidade CPA, em produtos da colméia deve assegurar detecção de quantidades mínimas de esporos presentes em uma amostra. Para contribuir com estes propósitos, o presente estudo buscou:

- a) Realizar monitoramento sanitário preventivo em mel de colméias do Estado do Piauí com a metodologia analítica oficial brasileira destinada à verificação da presença de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae*;
- b) Avaliar modificações na metodologia analítica oficial para reduzir o limite de detecção de *P. larvae* subsp. *larvae* em mel.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. CRIA PÚTRIDA AMERICANA

#### 2.1.1. Caracterização do agente etiológico

*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (Ash *et al.* 1994; Heyndrickx *et al.*, 1996), anteriormente denominado *Bacillus larvae* (White, 1906), figura entre as 33 espécies do gênero *Paenibacillus* (DSMZ, 2004).

Esta bactéria é um bastonete delgado, Gram-positivo, com comprimento de 2,5 a 5  $\mu\text{m}$ , 0,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, terminações ligeiramente arredondadas, tendência de crescer em cadeias, móvel por flagelos peritriquios que formam esporos ovais, com cerca de 1,3  $\mu\text{m}$  x 0,6  $\mu\text{m}$ , podendo agrupar-se (White, 1920). O esporo tem superfície lisa e o revestimento interno consiste de, no máximo, sete lamelas distintas (Bakhiet & Stahly, 1985).

Durante a esporulação o endósporo imaturo de *P. larvae* subsp. *larvae* formado no esporângio incorpora a cópia do DNA bacteriano. O revestimento externo que se torna mais espesso no esporo maturo, indicando que sua diferenciação está completa, sendo liberado do esporângio.

*P. larvae* subsp. *larvae* não cresce em meios comuns de cultura (White, 1920; Bailey, 1991) e não sobrevive a transferência seriada em caldo nutriente (Piccini & Zunino, 2001). Suas colônias variam em tamanho e apresentam borda bem definida e uniforme na superfície de ágar, sendo menos proeminentes em culturas velhas (White, 1920).

As características de colônias predominantes de *P. larvae* subsp. *larvae* após cinco dias a 36°C sobre o ágar *Paenibacillus larvae* (ABL) são: planas; com superfície suavemente granulada; achatadas; com ou sem centro elevado de maior densidade; com bordas levemente irregulares; sem brilho; de cor verde amarelada e diâmetro de 2 a 5 mm; sem halo de precipitação da lectina da gema do ovo e com ou sem halo de lipólise (Schuch, 2002).

Os esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* sobrevivem no alimento larval e restos de larvas de abelhas mortas (escamas) por muitos anos (White, 1920). Têm alta resistência ao calor, desidratação, luz solar direta, fermentação e a desinfecção com diversas drogas (White, 1920; Sturtevant, 1926; Rose, 1969; Máchová, 1993; Miyagi *et al.*, 2000; Evans, 2003). A resistência dos esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* ao calor quando presentes no mel variam com a linhagem dessa bactéria (Hansen & Brødsgaard, 1999).

### 2.1.2. Etiologia

O *P. larvae* subsp. *larvae* é o agente etiológico da Cria Pútrida Americana (CPA), doença que afeta as crias de *Apis mellifera* (White, 1920). A CPA é altamente contagiosa devido à forma esporulada do patógeno e, se não detectada precocemente, pode matar a colônia e dispersar-se dentro e entre apiário (Shimanuki, 1997).

Enquanto, *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifasciens* (Ash *et al.* 1994; Heyndrickx *et al.*, 1996), descrita inicialmente como *Bacillus pulvifasciens* (Nakamura, 1984), causa uma doença conhecida como “powdery scale”, que raramente causa problema sanitário à colônia. A Cria Pútrida Européia, causada por *Melissococcus pluton*, recebe esta denominação, como no caso da CPA, devido à área onde foram inicialmente estudadas (Shimanuki, 1997).

Nenhuma raça ou linhagem de abelha melífera é, completamente, imune a CPA (White, 1920; Sturtevant, 1924; Danka & Villa, 1994), explicado parcialmente, pelo fato das abelhas não conseguirem remover por completo, os restos larvais (escamas) quando a doença se estabelece. Além disso o estado da colônia (forte ou fraca) exposta à doença, aparentemente, não tem relação com o desenvolvimento da enfermidade, exceto quando as fortes pilham aquelas fracas e dispersam a doença no apiário (Sturtevant, 1924).

Larvas de operárias, zangões e rainhas são suscetíveis a infecção durante o período da alimentação (White, 1920), mas abelhas adultas não são suscetíveis à esta doença (White, 1920; Shimanuki & Knox, 2000; Riessberger-Gallé *et al.*, 2001).

Resistência parcial à CPA foi obtida em colônias de abelhas selecionadas para comportamento higiênico (Newton & Ostasiewski, 1986; Palacio & Bedascarrasbure, 2001; Spivak & Reutter, 2001).

Larvas sadias expostas à infecção por *P. larvae* subsp. *larvae* não exibiram resposta imune transcricional, o que pode ser devido à fatores fisiológicos e alimentares explicando a vulnerabilidade ao patógeno. Além disso, indivíduos de colônias infectadas podem resistir ou tolerar a doença por mecanismos de defesa internos, incluindo resposta imune inata (Evans, 2004)

Larvas de abelhas com até 24 horas são mais suscetíveis quando ingerem esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* (Woodrow, 1941; 1942). Brødsgaard *et al.* (1998) também verificaram que aquelas larvas com 24 a 28 horas são mais suscetíveis a infecção e apresentam uma clara relação entre dose e resposta, sendo a  $DL_{50}=8,49$  esporos.

Substâncias presentes no intestino médio de abelhas adultas geralmente apresentam uma maior capacidade para inibir o crescimento de *P. larvae* subsp. *larvae* que aquelas presentes em larvas (Crailsheim & Riessberger-Gallé, 2001). Sendo que a partir de 30 horas até cinco dias da fase larval, existe um mecanismo que inibe o desenvolvimento desta bactéria (Crailsheim *et al.*, 2001).

A infecção por *P. larvae* subsp. *larvae* ocorre quando esporos, presentes no alimento, são ingeridos e germinam no lúmen intestinal da larva de abelha (White, 1920).

De acordo com Davidson (1972) citado por Hansen & Brødsgaard (1999), as células vegetativas no lúmen do intestino invadem a membrana peritrófica por fagocitose, penetram no epitélio e entram no hemocoel, proliferando-se intensamente pela hemolinfa até invasão geral da maioria dos tecidos.

Larvas de *A. mellifera* infectadas por *P. larvae* subsp. *larvae* levam a morte e desintegração, eventualmente se desidratam para formarem escamas contendo cerca de  $2,5 \times 10^9$  esporos (Sturtevant, 1932). E sua morte ocorre no estágio final de larva, pré-pupa ou pupa prematura (White, 1920).

A idade da morte é um das melhores características para diferenciar a CPA da Cria Pútrida Européia, causada por *Melissococcus pluton* (Bailey & Collins, 1982) e que afeta, apenas, larvas jovens com menos de 48 horas de idade (Shimanuki, 1997).

O número de esporos para desencadear a CPA em colônias de *A. mellifera* pode ser variável. Sendo necessários  $5,0 \times 10^7$  esporos (Sturtevant, 1932) ou  $5,0 \times 10^8$  esporos no xarope de açúcar por colônia (L'arrivée, 1958 citado por Hansen *et al.*, 1988).

Sintomas clínicos da CPA apareceram em colônias de *A. mellifera* alimentadas com mel com cerca de  $2,9 \times 10^9$  esporos (Hansen *et al.*, 1988) e  $2,0 \times 10^9$  esporos (Hansen & Brødsgaard, 1997). Esses autores concluíram que isto não está relacionado, apenas, com a quantidade de esporos presentes no mel da colônia, mas também, com as diferenças na resistência das linhagens de abelhas a esta bactéria.

### **2.1.3. Sintomas e diagnóstico da doença na colméia**

O diagnóstico da CPA pode ser feito pelo reconhecimento dos sinais clínicos da cria doente (Hansen & Brødsgaard, 1999).

Os sintomas gerais das crias nas colméias afetadas por esta doença foram os seguintes: favos de cria falhados com opérculos afundados, muitas vezes com aparência gordurosa e apresentando perfurações ou remoção total; cria morta nas fases de pré-pupa e pupa, além de alterações na cor do branco para marrom claro a escuro, consistência viscosa e odor característico (White, 1920).

A cria fica escura e ressecada no estágio final da doença, quando transformam-se em uma escama fortemente aderida à parede, com a prosbocide (língua) estirada de um lado ao outro da célula em caso de ter morrido na fase de pupa (White, 1920; Bailey, 1991; Hansen & Brødsgaard, 1999; Shimanuki & Knox, 2000).

### **2.1.4. Mecanismo de dispersão de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* dentro e entre colônias**

A transmissão primária de *P. larvae* subsp. *larvae* ocorre por alimento ou água contaminados (White, 1920) que, às vezes, é fornecido pelo próprio



apicultor (Hansen *et al.*, 1989). Os esporos podem, também, ser transmitidos pelas abelhas adultas encarregadas da limpeza dos favos (Bailey, 1991).

A dispersão natural de *P. larvae* subsp. *larvae* é baixa, pois a maioria dos esporos é removida pelas abelhas adultas durante o comportamento higiênico (White, 1920; Bailey, 1991; Hansen & Brødsgaard, 1999). No caso da morte de centenas de larvas da colônia, geralmente, a infecção se dispersa rapidamente e a colônia morre (Bailey & Ball, 1991). O intercâmbio de quadros entre colônias são as causas mais comuns de dispersão de *P. larvae* subsp. *larvae* no apiário (White, 1920; Shimanuki, 1997; Goodwin & Eaton, 1999).

O fornecimento de mel contaminado para algumas colônias de um apiário ocasionou, após 40 dias, a dispersão de CPA para as demais, sendo atribuída à pilhagem de alimento e deriva de abelhas das colônias doentes para as sadias (Hansen *et al.*, 1988). Entretanto, o desvio de abelhas não é considerado um fator importante para a dispersão de *P. larvae* subsp. *larvae* (Goodwin *et al.*, 1994a; Hornitzky, 1998).

*P. larvae* subsp. *larvae* pode se dispersar em um apiário ou região quando a infecção, ainda, está em um estado subclínico, isto é, sem sintomas aparentes. Além disso, abelhas *A. mellifera* adultas, de colônias sem sinais clínicos da enfermidade, podem transportar esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* (Hansen & Rasmussen, 1986; Hornitzky & Karlovski, 1989; Goodwin *et al.*, 1996; Piccini & Zunino, 2001; Schuch *et al.*, 2003).

Colônias de abelhas sem sintomas clínicos pode conter mel contaminado com elevado número de esporos durante anos (Hansen, 1986; Hansen & Rasmussen, 1986; Hansen *et al.*, 1988; Hornitzky & Karlovski, 1989; Hansen & Brødsgaard, 1997; Schuch *et al.*, 2003). Colônias com sintomas clínicos, normalmente, carregam números elevados de esporos (Goodwin *et al.*, 1996), mas aquelas colônias sem sintomas podem conter um número de esporos superior aquele das enfermas (Hansen & Rasmussen, 1986).

### **2.1.5. Distribuição geográfica da doença**

A doença causada pelo *P. larvae* subsp. *larvae* foi detectada em produtos da colméia oriundos da Austrália, Nova Zelândia, Dinamarca, Inglaterra, Irlanda, França, Alemanha, Suíça, Canadá, Cuba e Estados Unidos (White, 1920). A CPA foi diagnosticada mundialmente, exceto em alguns países da África, da Ásia e da América Latina, e na América do Sul, estaria

presente apenas no Uruguai (Nixon, 1982). No entanto, essa bactéria foi detectada em mel importado da Argentina em 1980 (Hansen, 1984a) e o primeiro registro da doença nesse país ocorreu em 1989 (Alippi, 1992a).

A CPA não foi relatada em algumas ilhas Caribenhas, Brasil, Chile, países do subsahara Africano e em parte da Índia (Matheson, 1996; Fries *et al.*, 2001). Esse patógeno também não foi detectado em méis brasileiros (Costa, 1995; Schuch, 2002), mas o primeiro isolamento de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* ocorreu em colméias do sul do país (Schuch *et al.*, 2003).

## **2.2. INCIDÊNCIA DE *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* EM PRODUTOS APÍCOLAS**

O exame de produtos da colméia (mel, pólen, cera, geléia real, larvas e abelhas adultas) para a presença de *P. larvae* subsp. *larvae* desempenha papel importante no monitoramento sanitário preventivo da CPA, sendo necessário um diagnóstico precoce e acurado da ocorrência do patógeno (Hansen & Brødsgaard, 2001).

A presença de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* foi detectado em 8% (15 de 187) das amostras de mel comercial de diferentes regiões dos Estados Unidos e com número de esporos abaixo do mínimo necessário para causar e dispersar a doença (Sturtevant, 1932).

*P. larvae* subsp. *larvae* foi detectada em 81% de amostras de mel estrangeiro e em 23% de amostras locais coletadas no mercado varejista da Dinamarca, e metade das amostras continha  $6,0 \times 10^5$  esporos por 5 g de mel (Hansen, 1984b). Além disso, 11% das 532 amostras de mel de colméias colhidos entre 1978 e 1985 na Dinamarca estavam contaminadas (Hansen & Ramussen, 1986).

*P. larvae* subsp. *larva* foi isolada de 12 das 46 amostras de abelhas oriundas de colônias da Austrália que estavam, aparentemente, normais e sem nenhum histórico anterior da doença. Também foram detectadas em 12,5% (63 de 505) de amostras de mel coletadas em tambores de apicultores australianos onde apenas 23,1% (12 de 52) dos produtores não tinham histórico da doença em nenhuma colméia (Hornitzky & Karlovskis, 1989).

Em 8,5% (7 das 82) das diferentes amostras de mel de apiários (44) e do comércio do Canadá e Estados Unidos continham  $2,5 \times 10^1$  a  $4,0 \times 10^3$  esporos por grama de mel (Steinkraus & Morse, 1992).

Apenas 6,4% (7 das 109) de amostras de abelhas coletadas em colônias silvestres da Nova Zelândia continham esporos de *P. larvae* subsp. *larvae*, enquanto todas de colméias racionais (15) apresentavam a doença (Goodwin *et al.*, 1994b).

A presença de *P. larvae* subsp. *larvae* foi detectada em mel da Argentina e Espanha importado pelo Brasil (Costa, 1995) e em 24,6% (347 das 1412) das amostras de produtos importados (mel e pólen) pelo Brasil durante janeiro de 1998 a maio de 2001 (Schuch *et al.*, 2001).

Dez das 122 amostras de mel coletadas em apiários de províncias da Argentina continham esporos de *P. larvae* subsp. *larvae*, sendo todas oriundas da Província de Buenos Aires onde 60% do mel argentino é produzido (Alippi, 1995).

A presença de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae*, em número elevado, foi detectada em todas as amostras de mel adquiridas em supermercados e diretamente de apiários da Argentina, Grécia, Iran, Rússia e Estados Unidos. No estudo, apenas 7% das amostras coletadas, aleatoriamente, em apiários da Alemanha estavam contaminadas (Von Der Ohe & Dustmann, 1997).

*P. larvae* subsp. *larvae* foi isolada de larvas de abelhas com sintomas clínicos e em abelhas adultas coletadas em apiários do Uruguai, sendo que o Office International des Epizooties já havia detectado esporos dessa bactéria em 44 amostras de mel uruguaio destinadas para exportação em 1999 (Piccini & Zunino, 2001). Números maiores que  $1,0 \times 10^3$  esporos por grama de mel estavam presentes em 51,5% das 101 amostras coletadas em colméias sem sintomas clínicos de 19 províncias do Uruguai durante 2001 e 2002. O padrão de distribuição de *P. larvae* subsp. *larvae* revelou que sua dispersão ocorreu a partir da margem do Rio Uruguai, na região ocidental próxima da Argentina, para região oriental onde afetou quase todo o país (Antúnez *et al.*, 2004).

Investigando 15 amostras de mel de apicultores e 24 amostras do mercado local em cinco países do subsahara Africano, Fries *et al.* (2001) não detectaram a presença do microrganismo. Porém, 6 das 14 amostras de mel importado de diferentes continentes e do Norte da África estavam contaminadas com o patógeno.

*P. larvae* subsp. *larvae* ainda não havia sido detectado em produtos apícolas produzidos no Brasil (Sattler, 1993; Costa, 1995; Sattler *et al.*, 1996;

Schuch *et al.*, 2001) até Schuch *et al.* (2003) realizarem a detecção dos esporos em mel, bem como em abelhas adultas e pólen.

### **2.3. MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae***

Muitas investigações foram feitas para aperfeiçoar meios seletivos que respondessem, qualitativa e quantitativamente, aos requerimentos do organismo nas fases de germinação, crescimento e esporulação de *P. larvae* subsp. *larvae*.

O diagnóstico conclusivo de CPA deveria ser feito por exame bacteriológico de materiais retirados adequadamente da colméia. White, em 1904, elaborou um ágar contendo larvas de abelhas sadias, porém o crescimento das colônias era sempre lento e escasso (White, 1920). Utilizando um filtrado estéril das larvas, em 1907, o referido autor alcançou resultados mais positivos, porém não obteve a esporulação. Posteriormente, em 1919, encontrou resultados satisfatórios usando suspensão de gema de ovo a 70% em água esterilizada. Sturtevant (1924) também adicionou suspensão de gema de ovo esterilizada, além de extrato de levedura, ao meio extrato de cenoura (Lochhead, 1928) e verificou o aumento do vigor de crescimento e longevidade das culturas.

O primeiro método para investigação qualitativa e quantitativa de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* baseou-se na concentração de esporos por centrifugação e exame microscópico (Sturtevant, 1932). Essa técnica porém, apresentou dificuldades para separação dos esporos da bactéria de outros componentes do sedimento.

A adição de tiamina (vitamina B<sub>1</sub>) ao meio elaborado por Lochhead (1942), composto de glicose, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KNO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaCl, FeCl<sub>3</sub>, peptona e ágar, foi essencial para promover um bom crescimento de *P. larvae* subsp. *larvae*. Os resultados foram confirmados por Matuka & Topolnik (1952).

Bailey & Lee (1962) não obtiveram bons resultados para detecção de *P. larvae* subsp. *larvae* com um ágar semi-sólido composto por extrato de levedura, glicose, amido e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Avaliando este meio para contagem de esporos viáveis Shimanuki *et al.* (1965) verificaram que a retirada da glicose facilitava o isolamento da bactéria. Este último resultado foi confirmado por Rose (1969).

Gordon *et al.* (1973) utilizando o meio de cultura J-ágar, composto por triptona, extrato de levedura e glicose, obtiveram resultados satisfatórios tanto para o crescimento vegetativo quanto para esporulação de *P. larvae* subsp. *larvae*. Hansen (1984b) descreveu dois métodos envolvendo a inoculação direta de mel no meio J-ágar, sugerido por Gordon *et al.* (1973), que determinavam a presença de aproximadamente  $1,0 \times 10^4$  esporos por grama de mel.

Avaliando diversos meios de cultura Lodesani *et al.* (1985) selecionaram o meio de Bailey & Lee (1962) modificado com 1,5% de amido como o mais adequado para esporulação.

Lloyd (1986) verificou que o ágar sangue apresentava resultado superior quanto à facilidade e rapidez no diagnóstico da doença em relação a outros meios comumente utilizados. O tratamento térmico de um preparado com larvas de abelhas infectadas inoculadas em placas com ágar base, suplementado com 7 % sangue de carneiro, foi eficiente para isolar o *P. larvae* subsp. *larvae* e evitou o crescimento de *Paenibacillus alvei* (Hornitzky & Karlovskis, 1989).

Para determinar o número de esporos presentes no mel Shimanuki & Knox (1988, 2000), após concentrar os esporos por diálise e centrifugação, inocularam em ágar cérebro-coração suplementado com tiamina (0,1 mg/L). Contudo a detecção do patógeno era dificultada quando o mel estava contaminado com *P. alvei*.

Hornitzky & Clark (1991) resolveram este problema suplementado ágar sangue de carneiro com ácido nalidíxico, na concentração de 3 µg/mL. Alippi (1991, 1992b) também adicionou a mesma concentração de ácido nalidíxico ao caldo nutriente desenvolvido por Rose (1969) para conseguir isolar o *P. larvae* subsp. *larvae* em restos larvais de abelhas contaminadas com *P. alvei*.

Comparando diferentes meios Hornitzky & Nicholls (1993), encontraram que o J-ágar foi superior ao ágar sangue de carneiro e ao ágar infusão cérebro-coração, todos suplementados com ácido nalidíxico. O ágar MYPGP que contém caldo Müller-Hinton, extrato de levedura,  $K_2HPO_4$ , piruvato de sódio, ágar e glicose, foi superior para recuperação de números baixos de esporos quando atmosfera com 5% de  $CO_2$ , após estudo comparativo com outros meios sólidos, entre eles o J-ágar (Nordstrom & Fries, 1995)

Concentração de esporos por centrifugação e cultivo em ágar cérebro de coração suplementado com 0,1 mg de tiamina e 3 µg/mL de ácido nalidíxico (Costa, 1995) apresentou resultados melhores que o cultivo direto em meio J-ágar (Hansen, 1984a) ou a concentração por diálise e cultivo em ágar cérebro de coração (Shimanuki & Knox, 1988), quando utilizadas para detecção de *P. larvae* subsp. *larvae* em mel.

Alippi (1995) evitou o desenvolvimento de outras espécies de *Bacillus* que normalmente se desenvolvem antes que os esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* germinem, adicionando os ácidos nalidíxico e pipemídico ao J-ágar.

Von Der Ohe & Dustmann (1997), detectaram até  $9,78 \times 10^1$  esporos por grama de mel utilizando o método desenvolvido por Von Der Ohe *et al.* (1996), onde o mel diluído a 50% é inoculado em ágar sangue de carneiro.

Recentemente, Schuch *et al.* (2001) elaboraram um meio sólido seletivo denominado ágar *Paenibacillus larvae* que compreende quantidades iguais de ágar base *Bacillus cereus* (PEMBA), ágar soja triptona (TSA) e ágar nutriente suplementado (SNA), enriquecido com ácido nalidíxico a 0,1%, ácido pipemídico a 0,2 % e emulsão de gema de ovo a 50%. A metodologia analítica completa desenvolvida detecta menos de 10 esporos viáveis por mililitro de mel.

Outros procedimentos baseados na combinação do crescimento do *P. larvae* subsp. *larvae* em meio seletivo e identificação por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) estão sendo desenvolvidos para detecção e identificação deste microrganismo (Govan *et al.*, 1999; Dobbelaere *et al.*, 2001; Lauro *et al.*, 2002, Piccini *et al.*, 2002).

Allipi *et al.* (2002) desenvolveram um procedimento rápido para identificação do *P. larvae* subsp. *larvae*, baseado em PCR e análise de fragmento de restrição dos genes rRNA 16S em larvas exibindo sintomas clínicos de CPA.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Patologia Apícola do Departamento de Biologia Animal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais em duas etapas. Na primeira, as amostras de mel de apiários do Estado do Piauí foram analisadas com a metodologia analítica oficial brasileira para pesquisa de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Na segunda, foram avaliadas modificações nesta metodologia, quanto ao meio de cultura utilizado e ao preparo da amostra de mel, visando torná-la mais fácil de executar e eficaz na recuperação de esporos presentes, além de redução de custos.

#### **3.1. INVESTIGAÇÃO DE *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* EM MEL**

##### **3.1.1. Amostras de mel**

As amostras de mel foram fornecidas por produtores, empresas e associações do Estado do Piauí e solicitadas pessoalmente ou por correspondência. Os locais de coleta foram selecionados em regiões com maior risco potencial de introdução do patógeno como as microrregiões e municípios pólo da atividade apícola e limítrofes com os Estados do Ceará e Bahia (Figura 1).

Uma amostra representativa de um apiário foi composta por uma fração de mel de cada colméia, coletada pressionando-se um copo sobre a região superior do favo de um quadro de cria até romperem os opérculos e o mel

escorrer para dentro do recipiente (Figura 2). Em seguida, o mel era transferido para um pote plástico de 250 g, lacrado, identificado com o nome do apicultor, apiário, município, data da coleta e enviado ao Laboratório de Patologia Apícola da UFV.

A coleta foi realizada em apenas um quadro do ninho de cada colméia. Quando o apiário possuía mais de 20 colméias, coletou-se, aleatoriamente, em 20. O recipiente de coleta do mel no favo, bem como os utensílios utilizados eram higienizados entre a coleta dos apiários.



**Figura 1.** Mapa do Estado do Piauí (IBGE, 2004), destacando os municípios amostrados pela pesquisa.



**Figura 2.** Coleta do mel operculado da região superior do favo com crias do ninho da colméia.



A amostra podia conter cera ou abelhas por não se tratar de análise de qualidade do produto. No momento da coleta a colméia foi examinada em busca de sintomas de doenças de crias.

Foram investigadas cerca de 1220 colméias em 61 apiários, totalizando 61 amostras. No Estado do Piauí, estima-se ter em torno de 170.000 colméias, baseando-se na produtividade média por colônia fixa (12,5 kg) e no total de mel produzido no Estado (2.2000 toneladas) segundo o IBGE (2002).

### **3.1.2. Preparo das amostras**

Conforme a metodologia oficial, cada amostra foi aquecida em banho-maria a 45°C durante o tempo necessário para descristalizar e/ou diminuir sua viscosidade. Após homogeneização vigorosa da amostra, transferiu-se, assepticamente, uma alíquota de 20 mL para tubo de centrífuga esterilizado, tipo “Falcon” com tampa rosqueável, e adicionaram-se 30 mL de solução salina tamponada fosfatada (PBS).

O tubo fechado foi agitado vigorosamente e centrifugado a 3000 *g* durante 30 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado. O sedimento, ressuspenso em 1 mL de PBS, foi transferido para tubo de ensaio com tampa de rosca e submetido a choque térmico de 80°C por 10 minutos para inativação das células vegetativas.

### **3.1.3. Isolamento e confirmação de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae***

Alíquotas de 0,1 mL da suspensão preparada a partir de cada amostra de mel foi inoculada, em duplicata, sobre a superfície seca de ágar *P. larvae* subsp. *larvae* (ABL), desenvolvido por Schuch *et al.* (2001) e recomendado pela Instrução Normativa nº62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2003c).

O ágar ABL é um meio sólido seletivo a base de quantidades iguais (100 mL) de ágar base *Bacillus cereus* (PEMBA), ágar soja triptona (TSA) e ágar nutriente suplementado (SNA), enriquecido com ácido nalidíxico (0,1 %), ácido pipemídico (0,2 %) e emulsão de gema de ovo (50 %).

Com auxílio de bastão de vidro tipo “hockey”, espalhou-se, cuidadosamente, o inóculo sobre a placa. As placas foram incubadas invertidas a 36±1°C e examinadas diariamente por até cinco dias quanto ao crescimento de colônias típicas de *P. larvae* subsp. *larvae*. Cada série de amostras

analisadas foi acompanhada de uma amostra-testemunha positiva propositalmente contaminada com esporos de *P. larvae* subsp. *larvae*.

Colônias de *P. larvae* subsp. *larvae* morfologicamente suspeitas foram submetidas aos testes de catalase e Gram. Para fins de comparação, um esfregaço de *P. larvae* subsp. *larvae* da amostra-testemunha positiva foi corado pelo método de Gram.

Em caso da ocorrência de colônias catalase negativas e células Gram-positivas, as análises complementares de crescimento em superfície de ágar nutriente sem extrato de levedura, decomposição da caseína e verificação de crescimento típico no ágar leite tiamina (ALT) desenvolvido por Schuch *et al.* (2001) seriam conduzidas.

## **3.2. AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA PESQUISA DE *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* EM MEL**

### **3.2.1. Amostras de mel**

O mel utilizado neste experimento foi coletado nas colméias do Apiário da UFV, em maio de 2004 e analisado com a metodologia oficial, para confirmar ou não a ausência de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae*.

Caso o mel colhido e analisado para o experimento não apresente esporos de *P. larvae* subsp. *larvae*, se evitará esterilizá-lo para que mantenha diferentes populações de bactérias naturalmente presentes.

### **3.2.2. Microrganismos**

Foi usada estirpe de referência *P. larvae* subsp. *larvae* da American Type Culture Collection (ATCC 9545), obtida pelo Laboratório Regional de Apoio Animal (LARA) do Ministério de Agricultura e Abastecimento, Porto Alegre, RS.

### **3.2.3. Preparo da suspensão de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae***

As células de *P. larvae* subsp. *larvae* foram cultivadas no meio de esporulação proposto por Rogert Fulginiti Corseuil denominado “Meio Experimental para Esporulação de Clostrídios” (Schuch, 2002). Este meio é composto por peptona (20 g), extrato de levedura (5 g), glicose (12,5 g), cloreto de sódio (5 g), L-cisteína (0,5 g), extrato de carne (3 g) e caldo de fígado (0,5

L) por 0,5 L de água destilada. O caldo de fígado foi obtido por fervura de 500 g de fígado bovino em 1 L de água durante uma hora e, em seguida, filtrado em papel de filtro.

Várias colônias do microrganismo cultivadas durante 3 dias em ABL foram inoculadas em 80 mL do meio de esporulação, contido em um tubo de ensaio, e incubadas por cinco dias a 35°C e cinco dias à temperatura ambiente.

O conteúdo do tubo foi centrifugado a 3.000 g por 30 minutos em temperatura ambiente após período de incubação. O sedimento foi ressuspensionado em 40 mL de PBS e centrifugado outra vez. O processo foi repetido mais quatro vezes. Na última vez o sedimento foi ressuspensionado em 10 mL de PBS para concentrar a suspensão de esporos e submetido ao choque térmico de 80°C por 10 minutos.

O número de esporos na suspensão foi determinado pelo método de contagem de colônias em meio ABL. A partir da suspensão foram preparadas diluições decimais sucessivas no mesmo diluente. Alíquotas de 0,1 mL das diluições foram plaqueadas em superfície de ágar ABL e espalhadas com bastão tipo “hockey” até completa absorção pelo meio. Então, foram incubadas a 36°C por até 120 horas para a contagem presuntiva de *P. larvae* subsp. *larvae*.

A contagem de colônias foi realizada em placas com 25 a 250 colônias típicas e o número de esporos da suspensão inicial foi determinado multiplicando-se o número de colônias observado pelo fator de diluição e dividindo-se este resultado pela quantidade da alíquota inoculada.

#### **3.2.4. Contaminação do mel com *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae***

Cada alíquota de 20 mL de mel foi contaminada com um número conhecido de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* e homogeneizada para garantir uma distribuição uniforme do microorganismo.

#### **3.2.5. Isolamento e contagem de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae***

Foram adotados os mesmos procedimentos descritos nos itens 3.1.2. e 3.1.3., porém, para propósitos comparativos os sedimentos procedentes das centrifugações foram ressuspensionados para completar 2 mL (inóculo A) e 1 mL (inóculo B) de PBS.

Os suplementos utilizados no meio de cultivo adotado pelo método oficial brasileiro para pesquisa deste microrganismo foram adicionados ao ágar cérebro-coração com tiamina (BHIT), utilizado por Shimanuki & Knox (1988). O BHIT é um meio de preparo mais simples que aquele (ABL) usado pela metodologia oficial. A escolha deste meio é devido à capacidade comprovada de isolar esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* em mel (Costa, 1995) e seu modo de preparo simplificado. Então, alíquotas de 0,1 mL de cada suspensão foram inoculadas, em duplicata, nos diferentes meios preparados:

1. Ágar *P. larvae* (ABL);
2. Ágar infusão cérebro coração, suplementado com 0,04 mL de tiamina a 0,25%, 10 mL de ácido nalidíxico a 0,1% e 10 mL de ácido pipemídico a 0,2% por litro de meio (BHITA);
3. BHITA suplementado com 100 mL de emulsão de gema de ovo a 50% (EMO) por litro de meio;
4. BHITA, suplementado com 30 mL de leite em pó desnatado reconstituído a 12% (LDR) por litro de meio e;
5. BHITA, suplementado com 100 mL de EMO a 50% e 30 mL de LDR a 12% por litro de meio.

A adição de LDR ao meio BHIT foi feita para tentar facilitar a identificação da colônia, baseando-se na detecção de enzimas produzidas pelo *P. larvae* subsp. *larvae* que hidrolisam a caseína presente no leite.

As amostras positivas submetidas a análises foram acompanhadas por uma amostra-testemunha negativa preparada a partir do mesmo mel. A determinação qualitativa e quantitativa da presença de *P. larvae* subsp. *larvae* baseou-se na avaliação das características morfológicas das colônias e testes bioquímicos após cultivo. Colônias morfológicamente duvidosas para *P. larvae* subsp. *larvae* foram submetidas a provas confirmatórias de catalase e Gram.

Foi feita a contagem, simultânea, do número de colônias de *P. larvae* subsp. *larvae* e de contaminantes aeróbios presentes por placa. A unidade experimental foi constituída pela placa de Petri e os tratamentos por cada meio mais o respectivo inóculo (A ou B). Foram feitas cinco repetições e o resultado das contagens médias das colônias foi submetido a ANOVA e comparado pelo teste de Duncan.

### 3.3. AVALIAÇÃO DA DILUIÇÃO, TEMPO E VELOCIDADE DE CENTRIFUGAÇÃO DO MEL PARA DETECÇÃO DE *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*

#### 3.3.1. Amostras de mel

O mel para compor as amostras desta etapa do experimento teve origem e análise conforme descrito no item 3.2.1.

#### 3.3.2. Contaminação do mel com *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*

Cada alíquota de mel inoculada com uma população conhecida de esporos, conforme os procedimentos descritos nos itens 3.2.3 e 3.2.4., foi submetida a rotinas de preparo da amostra, combinando diferentes diluições, tempos e força centrífuga (Tabela 1). Em cada repetição experimental foi preparada uma nova diluição a partir da suspensão de esporos para contaminar o mel, conforme descrito no item 3.2.3.

**Tabela 1.** As diluições, tempos de centrifugação e forças centrífugas empregadas para pesquisa de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* em mel.

Variáveis	Fatores		
Diluição (mel em PBS <sup>1</sup> )	1 : 2,5	1 : 5	1 : 10
Tempo de centrifugação (min <sup>2</sup> )	20	30	40
Força centrífuga (g <sup>3</sup> )	3.000	6.000	8.000

1 PBS = solução salina tamponada fosfatada.

2 min = minutos.

3 g = aceleração gravitacional.

Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspendido em 1 mL de PBS e submetido ao choque térmico. A diluição do mel foi realizada em um erlenmeyer quando o volume total da amostra (mel + PBS) excedeu à capacidade do tubo da centrífuga, sendo depois distribuída em um número suficiente de tubos. Ao final da centrifugação, os sedimentos foram reunidos em um único tubo antes do choque térmico.

#### 3.3.3. Isolamento e contagem de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*

Cada alíquotas de 0,1 mL, resultante do procedimento descrito no item 3.2.3., foi inoculada em duplicata sobre a superfície seca do meio selecionado na etapa anterior da pesquisa. As placas foram, então, incubadas a 36±1°C, examinadas diariamente. Fez-se a contagem de colônias típicas de *P. larvae*

subsp. *larvae* por placa após 72 horas. Cada série de amostras analisadas foi acompanhada com uma amostra-testemunha negativa do mel. Em colônias duvidosas quanto sua morfologia eram feitas provas confirmatórias de catalase e Gram.

A unidade experimental foi constituída pela placa de Petri e os tratamentos pela combinação entre os fatores da variável diluição, tempo de centrifugação e força centrífuga. Cada tratamento foi repetido três vezes. O resultado das contagens médias do número de colônias foi submetido a ANOVA e comparado pelo teste de Duncan.

#### **3.4. DESINFECÇÃO DE MATERIAL PROVENIENTE DOS TESTES COM ESPOROS DE *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae***

Devido à periculosidade de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, todo material usado durante as análises microbiológicas foi submetido a autoclavação por 60 minutos à 121°C, antes da lavagem ou descarte.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. INVESTIGAÇÃO DE *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* EM MEL DE APIÁRIOS DO ESTADO DO PIAUÍ

Todas as 61 amostras de mel, coletadas no Estado do Piauí, apresentaram resultados negativos quanto à presença de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, indicando que o patógeno não deve ter atingido estes apiários. Todas as colméias inspecionadas não exibiam nenhum sintoma de Cria Pútrida Americana (CPA). Isto é importante, pois a região amostrada compreende municípios que estão incluídos entre os mais importantes para a prática da apicultura desse Estado (Vilela, 2001).

Cada amostra composta por frações de mel de 20 colméias de um apiário, embora resultasse numa diluição de 1:20, o modo de coleta foi considerado eficiente, ao contrário do realizada no tambor do mel colhido em um apiário, onde a diluição pode ser extremamente maior. Além disso, o mel colhido nos favos de crias, ou seja, dentro do ninho, pode conter uma concentração de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* mais elevada em relação aos da melgueira. A coleta de amostra composta é recomendada por Hansen & Rasmussen (1986) e Hansen & Brødsgaard (1999) para reduzir o custo da análise.

A análise do mel das colméias é importante, pois o número de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* necessários para causar a infecção em uma colônia é variável (Sturtevant, 1932; Hansen *et al.*, 1988; Hansen & Brødsgaard, 1997). A incidência final de *P. larvae* subsp. *larvae* em mel de um apiário monitorado

de 1979 a 1984 foi acima de  $3,0 \times 10^6$  esporos por grama de mel, contudo sem qualquer sinal da infecção durante esse período (Hansen, 1986). A técnica desenvolvida por esse autor detectava a bactéria, apenas, quando a mesma apresentava mais de  $2,0 \times 10^3$  esporos por grama de mel. Mesmo com 10 esporos por mililitro de mel a detecção de contaminação em produtos apícolas pode ser realizada mesmo sem observar sinais da infecção (Schuch *et al.*, 2003).

O monitoramento para a prevenção da CPA é importante devido ao aumento da importação de mel pelo Brasil, a partir da década de 90, em especial para o Piauí e Estados vizinhos proveninetes, principalmente, da Argentina e do Uruguai (MDIC, 2004). Nestes países, essa doença está amplamente distribuída, o que constitui um risco para a introdução da doença.

A importação de mel fracionado pode facilitar a introdução e dispersão dos esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* até os apiários brasileiros, pelo fato dessas embalagens, ainda com resíduo de mel, serem descartadas em locais inadequados. Desta forma, as abelhas podem coletar e transportar o produto até sua colônia, onde estes esporos podem encontrar condições de germinação através das crias de abelhas da colônia (Message, 2000). O produto contaminado pode, também, conter resíduos de quimioterápicos devido à necessidade de realização do tratamento das colônias afetadas nos países afetados com a CPA. Em mel fracionado importado pelo Brasil foram detectados esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* (Costa, 1995; Schuch *et al.*, 2001).

No entanto, a presença de esporos *P. larvae* subsp. *larvae* não foi detectada em mel fracionado dos Estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia (Satller, 1993; Costa, 1995). Além disso, nenhuma colméia brasileira foi diagnosticada com CPA, apesar de terem sido isolados em produtos de colméias do sul do país (Schuch *et al.*, 2002, 2003).

É importante realizar-se o monitoramento da presença de esporos *P. larvae* subsp. *larvae*, a nível nacional, incluindo amostras nacionais e importadas, devido à extensa fronteira brasileira com países onde a doença ocorre. Os monitoramentos são feitos por amostragem, o que pode excluir alguma amostra positiva. Por isto, uma medida complementar seria a implantação de políticas que visem o treinamento dos apicultores no



reconhecimento dos sintomas da doença para que se possam registrar qualquer caso e tomar medidas sanitárias de controle.

#### **4.2. AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA DETECÇÃO DE *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* EM MEL**

Não foi necessário esterilizar o mel colhido para este estudo, pois não foram detectados esporos de *P. larvae* subsp. *larvae*. Deste modo, as amostras de mel continham outras populações de bactérias, além daquela de *P. larvae* subsp. *larvae* inoculada experimentalmente.

A suspensão de *P. larvae* subsp. *larvae* preparada continha  $7,6 \times 10^5$  esporos/mL. Ensaio preliminares, após centrifugação a 3000 g por 30 minutos, mostraram redução na grandeza de casas decimais na contagem dos isolados na placa em relação à concentração de esporos inoculada no mel. Por isto, foi usada uma alíquota de 0,1 mL a partir da diluição de 1 mL da suspensão em 9 mL de solução salina tamponada fosfatada (PBS) para inocular cada amostra de mel. Assim, garantiu-se o isolamento de um número inferior a 250 colônias, facilitando a contagem.

Verificou-se a formação de colônias *P. larvae* subsp. *larvae* a partir de 30 horas de incubação e as características morfológicas dos isolados não diferiram entre os meios e foram as mesmas descritas por Schuch *et al.* (2001).

O ágar *Paenibacillus larvae* (ABL) mostrou capacidade de isolar maior número de esporos desta bactéria em mel ( $P < 0.05$ ) comparada aos demais meios avaliados (Tabela 3). A contagem média de colônias nesse meio foi maior para as duas concentrações do inóculo. Schuch *et al.* (2001) não verificaram diferenças significativas entre as contagens do ABL e BHIT.

Esporos de bactérias do gênero *Bacillus*, provavelmente, germinam em resposta a nutrientes ou substâncias não nutritivas como lisozima, íons cálcio, ácido dipicolínico, surfactantes, sais e efeito de altas pressões (Selton, 2003). O ABL inclui em sua formulação extrato de levedura, presente no ágar nutriente suplementado (SNA), que é eficiente no isolamento de *P. larvae* subsp. *larvae* (Sturtevant, 1924; Bailey & Lee, 1962; Shimanuki *et al.*, 1965; Rose, 1969; Gordon *et al.*, 1973). Considerando que não houve adição de tiamina ao ABL, como foi feito para os outros meios, o extrato de levedura já é rico em tiamina (Matuka & Topolnik, 1952).

**Tabela 2.** Número de colônias de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* isoladas, após incubação a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 72 h, em diferentes meios: (ABL) ágar *P. l. larvae*; (BHITA) ágar infusão cérebro coração + tiamina + ácido nalidíxico + ácido pipemídico; (BHITA-1) BHITA1 + emulsão de gema de ovo a 50% (EMO); (BHITA-2) BHITA + leite em pó desnatado reconstituído a 12% (LDR); (BHITA-3) BHITA + EMO + LDR.

MEIO DE CULTURA	NÚMERO DE COLÔNIAS <i>P. larvae</i> subsp. <i>larvae</i> *	
	Inóculo A <sup>1</sup>	Inóculo B <sup>2</sup>
APL	129.4 aA	58.3 bA
BHITA	4.9 aC	1.1 aC
BHITA-1	70.5 aB	50.2 aAB
BHITA-2	8.7 aC	4.3 bC
BHITA-3	64.8 aB	47.6 aB

\* Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha ou maiúsculas na coluna, não diferem, entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

1 Inóculo de *P. larvae* subsp. *larvae* obtido pela ressuspensão do sedimento da centrifugação com solução salina tamponada fosfatada para completar 2 mL.

2 Inóculo de *P. larvae* subsp. *larvae* obtido pela da ressuspensão do sedimento da centrifugação com solução salina tamponada fosfatada para completar 1 mL.

Ágar infusão cérebro coração suplementado com tiamina quando foi adicionada emulsão gema de ovo a 50% (BHITA-1 e BHITA-3) isolou maior número de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* ( $P < 0.05$ ) em relação aqueles sem suplementos (BHITA) ou com leite em pó desnatado reconstituído a 12% (BHITA-2). Este efeito positivo também foi constatado nos meios propostos por White (1920), Sturtevant (1924) e Schuch *et al.* (2001).

Não foi possível distinguir a formação de um halo transparente ao redor das colônias nos meios onde o LDR foi adicionado devido à proteólise. Nestes meios as colônias não diferiram morfológicamente daquelas observadas nos demais meios avaliados. Schuch *et al.* (2001) não verificaram diferenças morfológicas em colônias inoculadas em ágar leite tiamina quando se observa o halo de clarificação resultante da hidrólise da caseína.

Todos os meios inibiram, de modo semelhante, os contaminantes aeróbios ( $P < 0.05$ ) (Tabela 3). Este resultado foi em razão da adição em todos os meios de quantidades iguais de ácido nalidíxico e pipemídico para inibir total ou parcialmente o crescimento de diversas espécies de microrganismos contaminantes.

**Tabela 3.** Número de colônias contaminantes aeróbios, após incubação a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 72 h, em diferentes meios de cultura: (ABL) ágar *P. l. larvae*; (BHITA) ágar infusão cérebro coração + tiamina + ácido nalidíxico + ácido pipemídico; (BHITA-1) BHITA1 + emulsão de gema de ovo a 50% (EMO); (BHITA-2) BHITA + leite em pó

desnatado reconstituído a 12% (LDR); (BHITA-3) BHITA + EMO + LDR.

MEIO DE CULTURA	NÚMERO DE COLÔNIAS <i>P. larvae subsp. larvae</i> *	
	Inóculo A <sup>1</sup>	Inóculo B <sup>2</sup>
APL	25.7 aB	5.0 aB
BHITA	18.9 aAB	7.4 bAB
BHITA-1	15.6 aAB	13.6 aAB
BHITA-2	23.9 aA	17.7 aA
BHITA-3	10.6 aB	9.4 aAB

\* Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha ou maiúsculas na coluna, não diferem, entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

1 Inóculo de *P. larvae subsp. larvae* obtido pela ressuspensão do sedimento da centrifugação com solução salina tamponada fosfatada para completar 2 mL.

2 Inóculo de *P. larvae subsp. larvae* obtido pela ressuspensão do sedimento da centrifugação com solução salina tamponada fosfatada para completar 1 mL.

O crescimento da microbiota natural contaminante do mel em meio de cultura não seletivo pode ocorrer antes do crescimento de *P. larvae subsp. larvae* (Alippi, 1991, 1995; Schuch *et al.*, 2001). Contudo, a inibição do *P. larvae subsp. larvae* não ocorre quando o meio é suplementado apenas com ácido nalidíxico (Hornitzky & Clark, 1991; Alippi, 1991, 1992b; Costa, 1995) ou quando se utiliza estes dois antibióticos no meio J-ágar e ABL (Alippi, 1995; Schuch *et al.*, 2001).

Verificam-se possibilidades de que a combinação de ácido nalidíxico com pipemídico pode influenciar o crescimento dessa bactéria quando inoculada no meio BHITA. Entretanto, efeitos de inibição do *P. larvae subsp. larvae* quando suplementaram o meio, apenas, com ácido nalidíxico não foram relatados (Hornitzky & Clark, 1991; Alippi, 1991, 1992b; Costa, 1995) ou com estes dois antibióticos no meio J-ágar e ABL (Alippi, 1995; Schuch *et al.*, 2001).

As bactérias relacionadas como os principais contaminantes de mel e capazes de crescerem nos meios de cultura usados para isolar esporos de *P. larvae subsp. larvae* inclui *Paenibacillus alvei*. Esporos dessa espécie germinam, rapidamente, e, em razão de sua motilidade, formam colônias que cobrem toda a placa de cultivo em 24 a 48 horas, o que impossibilita a visualização das colônias de *P. larvae subsp. larvae* (Alippi, 1991, 1992b). No entanto não foi constatada a presença dessa bactéria em nenhuma placa dos meios avaliados.

#### 4.3. AVALIAÇÃO DA DILUIÇÃO, TEMPO E VELOCIDADE DE CENTRIFUGAÇÃO DO MEL PARA PESQUISA DE *Paenibacillus larvae subsp. larvae*

A diluição de uma parte de mel em quatro de PBS (1:5) isolou maior número de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* em mel ( $P < 0.05$ ). Porém, a diluição de uma parte de mel em nove de PBS (1:10) isolou número inferior de esporos ( $P < 0.05$ ) dessa bactéria comparada aquela de 1:5 (Tabelas 3 e 4). Isto pode ter ocorrido em função da divisão do volume final da diluição 1:5 em dois tubos de centrifugação e de 1:10 em quatro. O sedimento era reunido em um único tubo ao final da centrifugação, assim este procedimento pode ter resultado na perda de esporos nas paredes dos tubos.

Sturtevant (1932) constatou ser necessário diluir, no mínimo, uma parte de mel para nove de água e uma dupla centrifugação, por 30 minutos e depois mais 20 minutos em 2000 r.p.m., para recuperar-se esporos de *P. larvae* subsp. *larvae*. Sugeriu que muitos esporos podem permanecer em suspensão após as centrifugações com diluições baixas e, assim, serem perdidos quando descarta-se o sobrenadante.

**Tabela 4.** Análise de variância referente à contagem de colônias *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* em função da diluição, tempo de centrifugação e força centrífuga.

FONTES DE VARIÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO *	F
Diluição (D)	2	1212.56 *	9.81
Tempo (T)	2	2000.60	1.62
D x T	4	106.11	0.86
Velocidade (V)	2	1748.21 *	14.14
D x V	4	141.81	1.15
T x V	4	304.96 *	2.47
D x T x V	8	107.12	0.87
Resíduo	52	619.02	5.01

\* Significativo a 5 % de probabilidade.

Após as centrifugações, foi verificada a presença de muito sedimento, podendo ter ocorrido pelo fato do mel ter sido coletado direto do favo, sem a adoção de qualquer procedimento de filtração. Sturtevant (1932, 1936) também encontrou dificuldades em separar a bactéria de outros componentes do sedimento após processo de centrifugação.

A solução para esses problemas pode ser a realização de uma filtração prévia do mel em peneira de aço para remoção dos sedimentos maiores e uma centrifuga com rotor para tubos cônicos de volume maior.

**Tabela 5.** Número de colônias de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* isoladas, após incubação a 36±1°C por 72h, em diferentes diluições.

DILUIÇÃO (mel em PBS)	GL	MÉDIA (UFC/ml de mel) * ± ERRO PADRÃO
1 : 2,5	27	39.05 C
1 : 5	27	52.44 A
1 : 10	27	45.22 B

\* Médias seguidas pela mesma letra não diferem, entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Os tempos de centrifugação investigados apresentaram resultados semelhantes. Entretanto, verificaram-se diferenças entre as forças centrífugas ( $P < 0.05$ ) e em sua interação com o tempo ( $P < 0.05$ ). Sob centrifugações de 6000 g e 8000 g por 30 ou 40 minutos foram isolados um número maior de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* (Tabela 6).

**Tabela 6.** Número de colônias de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* isoladas, após incubação a 36±1°C por 72h, sob diferentes tempos de centrifugação e força centrífuga.

TEMPO (min)	FORÇA CENTRÍFUGA (g)		
	3.000	6.000	8.000
20	31.04 bA	44.94 aB	51.33 aAB
30	37.22 bA	50.67 aAB	52.72 aA
40	40.78 bA	57.83 aA	43.61 bA

\* Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha ou maiúsculas na coluna, não diferem, entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Duncan.

Na técnica de Hornitzky & Clark (1991), com diluição 1:3 e força centrífuga de 3.000 g por 45 minutos, foi possível recuperar a bactéria quando em concentração inferior a 5000 esporos por mililitro de mel. Shimanuki & Knox (1988) centrifugaram o produto da diálise em 2.000 g por 20 minutos e obtiveram um limite de detecção em torno de 80 esporos/mL de mel. Costa (1995) com diluição de 1:10 submetida a 10.000 g por 40 minutos, obteve recuperação de até 10 UFC/g de mel. O método oficial brasileiro prevê diluição de uma parte de mel em uma e meia de PBS (1:2,5) e centrifugação a 3.000 g durante 20 minutos (Schuch *et al.*, 2001; Brasil, 2003c) para detectar menos de 10 esporos por mililitro de mel. Isto indica variação no número de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* detectados em função da diluição, tempo e força de centrifugação empregada.

A utilização de 6000 g e 8000 g por 30 e 40 minutos resultou na recuperação de maior número de esporos desse patógeno que a 3000 g. Isto sugere que haveria uma redução no limite de detecção de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* em mel para número inferior ao de Schuch *et al.* (2001), adotados pela metodologia oficial brasileira. Porém, é necessário investigar o

efeito de maior diluição, tempo de centrifugação e força centrífuga em função das limitações dos equipamentos para análise.

Trabalhos que visam melhorar a metodologia adotada são importantes em função da periculosidade de *P. larvae* subsp. *larvae* para abelhas *Apis mellifera* e pelo fato da CPA não ter, ainda, sido diagnosticada no Brasil. Além disso, a redução do limite de detecção é relevante, pois geralmente se analisam amostras de mel compostas à partir de um apiário ou de entrepostos, fracionados ou não, e que resultam na mistura de mel de todos os apiários. Nessas condições, o número de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* pode estar bastante reduzido.

## 5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- I. Os esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* não foram detectados em amostras de mel coletadas nas colméias de *Apis mellifera* do Estado do Piauí.
- II. O ágar *Paenibacillus larvae* isolou um número maior esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* em mel.
- III. Todos os meios de cultura avaliados inibiram igualmente o crescimento de contaminantes aeróbios.
- IV. Um maior número de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* foi isolado quando se diluía uma parte de mel em quatro partes de solução salina tamponada fosfatada.
- V. Sob centrifugações de 6000 g e 8000 g por 30 e 40 minutos foram isolados um número maior de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* em mel.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASH, C.; PRIEST, F. G.; COLLINS M. D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Willbanks and Collins) using a PCR probe test. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 64, p. 253-260. 1993.
- ALIPPI, A. M. A comparison of laboratory techniques for detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera*, in Argentina. **Journal of Apicultural Research**, v. 30, p. 75-80, 1991.
- ALIPPI, A. M. Characterization of *Bacillus larvae* White, the causative agente of AFB of honey bees. First record of its ocorrence in Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 24, p. 67-72, 1992a.
- ALIPPI, A. M. Detection de *Bacillus larvae* en poblaciones mixtas de esporas bacterianas a partir de restos larvales. **Microbiologia Sem**, v. 8, p. 115-118, 1992b.
- ALIPPI, A. M. Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium. **Microbiologia Sem**, v. 11, p. 343-350, 1995.



- ALIPPI, A. M.; LÓPEZ, A. L.; AGUILAR, O. M. Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American foulbrood of honeybees, by using PCR and restriction fragment analysis of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 3655-3660, 2002.
- ANTÚNEZ, K. D'ALESSANDRO; PICCINI, C.; CORBELLA E., ZUNINO, P. *Paenibacillus larvae larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 86, p.56-58, 2004.
- BAILEY, L.; BALL, B. V. **Honey bee pathology**. London: Academic Press, 1991. 124p.
- BAILEY, L.; COLLINS, M. D. Reclasification of *Streptococcus pluton* (*Bacillus pluton* White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton* nom. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 53, p. 215-217, 1982.
- BAILEY; L.; LEE, D. C. *Bacillus larvae* - its cultivation in vitro and its growth in vivo. **Journal of General Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 711-717, 1962.
- BAKHUET N.; STAHLY, D. P. Ultrastructure of sporulating *Bacillus larvae* in a broth medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 690-692, 1985.
- BRASIL. Portaria n.º 9, de 20 de fevereiro de 2003a. Institui o Comitê Científico Consultivo em Sanidade Apícola. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/agrolegis>>. Acesso em: 22 jun. 2004.
- BRASIL. Instrução Normativa n.º 11, de 21 de fevereiro de 2003b. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/agrolegis/>>. Acesso em: 22 jun. 2004.
- BRASIL. Instrução Normativa n.º 62, de 26 de agosto de 2003c. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Anexo, Capítulo XIX Pesquisa de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/agrolegis/>> Acesso em: 22 jun. 2004.
- BRØDSGAARD, C. J.; RITTER, W.; HANSEN, H. Response of *in vitro* reared honey bee larvae to various doses of *Paenibacillus larvae larvae* spores. **Apidologie**, v. 29, n. 6, p. 569-578, 1998.
- COSTA, P.S.C. **Cria Pútrida Americana: comparação de técnicas de detecção de esporos em mel e avaliação em amostras nacionais e importadas**. 1995. 74 f. (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- CRAILSHEIM, K.; RIESSBERGER-GALLÉ, U. Honey bee age-dependent resistance against American foulbrood. **Apidologie**, v. 32,n. 1, p. 91-103, 2001.
- CRAILSHEIM, K.; RIESSBERGER-GALLÉ, U.; WEDENIG, M. Substances inhibiting the growth of *Paenibaillus larvae larvae* in honeybee colonies. In:

- INTERNATIONAL CONGRESS OF APIMONDIA, 37, **Proceedings...**, Durban, South Africa, 2001. v.CD.
- DANKA, R. G.; VILLA, J. D. Preliminary-observations on the susceptibility of africanized honey-bees to American foulbrood. **Journal of Apicultural Research**,33 (4): 243-245 1994.
- DOBBELAERE, W.; GRAF, D. C. de; PEETERS, J. E.; JACOBS, F. J. Development of a fast and reliable diagnostic method for american foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) using a 16 rRNA gene based PCR. **Apidologie**, v. 32, p. 363-370, 2001.
- DSMZ. Deutsche SammlLung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Bacterial Nomenclature Up-to-Date – (Approved Lists, Validation Lists). Jul. 2004. Braunschweig, Germany. Disponível In: <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>
- EVANS, J. D. Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 83, p. 46-50, 2003.
- EVANS, J. D. Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. **Journal de Invertebrate Pathology**, v. 85, p. 105-111, 2004.
- FRIES, I.; COLEMAN, S. W. C.; RAINA. Is american foulbrood (*Paenibacillus larvae larvae*) absent in honey bee colonies in sub-saharan Africa? **Proc. 37 Int. Apic. Congr.**, Durban, South Africa, 2001.
- GOODWIN, R. M.; EATON, C. V. **Elimination of American foulbrood without the use of drugs:** a practical manual of beekeepers. National Beekeepers' Association of New Zealand, 1999. 78p.
- GOODWIN, R. M.; PERRY, J. H.; TENHOUTEN, A. The effect of drifting honey-bees on the spread of American foulbrood infections. **Journal of Apicultural Research**, v. 33, n. 4, p. 209-212, 1994a.
- GOODWIN, R. M.; PERRY, J. H.; HAINE, H. M. A study on the presence of *Bacillus larvae* spores carried by adult honey bees to identify colonies with clinical symptoms of American foulbrood disease. **Journal of Apicultural Research**, v.35, n. 3/4. p118-120, 1996.
- GOODWIN, R. M.; TENHOUTEN, A.; PERRY, J. H. Incidence of American foulbrood infections in feral honey-bee colonies in New Zealand. **New Zealand Journal of Zoology**, v. 21, n. 3, p. 285-287, 1994b.
- GORDON, R. E.; HAYNES, W. C.; PANG, C. H. The genus *Bacillus*. **Agriculture Handbook**, US Department of Agriculture, n. 427, 1973. 283p.
- GOVAN, V. A.; ALLSOPP, M. H.; DAVISON, S. A PCR detection for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 2243-2245, 1999.

- HANSEN, H. Methods for determining the presence of the foulbrood bacterium *Bacillus larvae* in honey. **Tidsskrift for Planteavl**, v. 88, p. 325-328, 1984a.
- HANSEN, H. Incidence of the foulbrood bacterium *Bacillus larvae* in honey retailed in Denmark. **Tidsskrift for Planteavl**, v. 88, p. 329-336, 1984b.
- HANSEN, H. The investigation of honey from bees colonies for *Bacillus larvae*. **Tidsskrift for Planteavl**, v. 90, p. 81-86, 1986.
- HANSEN, H.; BRØDSGAARD, C. J. Field trial with induced infection of *Bacillus larvae*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF APIMONDIA, 34, Lausanne. **Proceedings...** Apimondia Publishing House; Bucharest, Romania; pp166-171, 1997.
- HANSEN, H.; BRØDSGAARD, C. J. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. **Bee World**, v. 85, n. 1, p. 5-23, 1999.
- HANSEN, H.; BRØDSGAARD, C. J. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF APIMONDIA, 37, **Proceedings...**, Durban, South Africa, 2001. v.CD.
- HANSEN, H.; RASMUSSEN, B. The investigation of honey from bee colonies for *Bacillus larvae*. **Danish Journal of Plant and Soil Science**, v. 90, p. 81-86, 1986.
- HANSEN, H.; RAMUSSEN, B.; CHRISTENSEN, F. A preliminary experiment involving induced infection from *Bacillus larvae*. **Tidsskrift for Planteavl**, v. 92, p. 11-15, 1988.
- HANSEN, H.; RAMUSSEN, B.; CHRISTENSEN, F. Infection experiments with *Bacillus larvae*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF APIMONDIA, 32, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Apimondia Publishing House; Bucharest, Romania; pp 207-212, 1989.
- HEYNDRICKX, M.; VANDEMEULEBROECKE, K.; HOSTE, B.; JANSSEN, P.; KERSTERS, K.; DE VOIS, P.; LOGAN, N. A.; ALI, N.; BERKELEY, R. C. W. Reclassification *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvificiens* (Nakamura 1984) Ash *et al.* 1994, a later subjective synonymo of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash *et al.* 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with amended description of *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvificiens*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 270-279, 1996.
- HORNITZKY, M. A. Z. The spread of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* infection in an apiary. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 4, p. 261-265, 1998.
- HORNITZKY, M. A. Z.; CLARK, S. Culture of *Bacillus larvae* from bulk honey samples for the detection of American foulbrood. **Journal of Apicultural Research**, v. 30, n. 1, p. 13-16, 1991.

- HORNITZKY, M. A. Z.; KARLOVSKIS, S. A culture technique for the detection of *Bacillus larvae* in honeybees. **Journal of Apicultural Research**, v. 28, n.2, p. 118-120, 1989.
- HORNITZKY, M. A. Z.; NICHOLLS, P. J. J medium is superior to sheep blood agar and brain heart infusion agar for isolation of *Bacillus larvae* from honey samples. **Journal of Apicultural Research**, v. 32, p. 51-52, 1993.
- IBGE. **Pesquisa Pecuária Municipal de 2002**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/ufs/pi.htm>>. Acesso em: 12 jun. 2004.
- IBGE. **Cidades**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/ufs/pi.htm>>. Acesso em: 12 jun. 2004.
- L'ARRIVEE, J. C. M. Survival of honey bee larvae following colony inoculation with various dosages of *B. larvae*. (**Ph. D. Thesis**) - W. Iowa State College, USA.
- LAURO, F.M.; FAVARETTO, M.; COVOLO, L.; RASSU, M.; BERTOLONI, G. Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, n. 3, p. 195-201, 2002.
- LLOYD, J. M. Simplified Laboratory Diagnosis of American Foul Brood Disease. **Journal of Apicultural Research**, v. 25, n. 1, p. 55-57, 1986.
- LOCHHEAD, A. G. Cultural studies of *Bacillus larvae* (White). **Sci. Agr**, v. 9, p. 80-89, 1928.
- LOCHHEAD, A. G. Grow factor requeriments of *Bacillus larvae* "White". **Journal of Bacteriology**, v. 44, p. 185, 1942.
- LODESANI M, BENASSI C, GRAZIA L, et al. A study on the sporulation of *Bacillus larvae*. **Journal of Apicultural Research**, v. 4, n. 4, p. 205-210, 1985.
- MATUKA, S.; TOPOLNIK, E. The culture of *B. larvae* on a medium containing thiamine. **Veterinarski Arhiv**, v. 22, n. 9-10, p. 375-377, 1952.
- MÁCHOVÁ, M. Resistance of *Bacillus larvae* in beewax. **Apidologie**, v. 24, p. 23-31, 1993.
- MATHESON, A. World bee health update 1996. **Bee World**, v. 77, p. 45-51, 1996.
- MDIC. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Secretaria do Comércio Exterior. Importação Brasileira. Disponível em: <<http://www.aliceweb.desenvolvimento.gov.br>>. Acesso em: 22 jun. 2004
- MESSAGE, D. Doenças de crias e o Mercosul. O que fazer? In: SIMPÓSIO SOBRE PATOLOGIAS APÍCOLAS IMPORTANTES E SEU CONTROLE NOS PAÍSES DO MERCOSUL, 13, Florianópolis, 2000. **Anais...** São Paulo: Sonopress-Rimo - Industria e Comércio Fonográfico Ltda., 2000. v.CD.

- MIYAGI, T.; PENG, C. Y. S.; CHUANG, R. Y. Verification of oxytetracycline-resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 75, n. 1, p. 95-96, 2000.
- NEWTON, D. C.; OSTASIEWSKI, Jr. N. J. A simplified bioassay for behavioral resistance to American foulbrood in honey bees (*Apis mellifera* L.). **American Bee Journal**, v. 126, n. 4, p. 278-281, 1986.
- NIXON, M. Preliminary world maps of honey bee diseases and parasit. **Bee World**, v. 63, n. 3, p. 23-24, 1982.
- NORDSTROM, S.; FRIES, I. A comparison of media and cultural conditions for identification of *Bacillus larvae* in honey. **Journal of Apicultural Research**, v. 34, n. 2, p. 97-103, 1995.
- PALACIO, A. M.; BEDASCARRASBURE, E. L. Honey bee hygienic behavior and its relation to brood diseases. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF APIMONDIA, 37, **Proceedings...**, Durban, South Africa, 2001. v.CD.
- 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. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 78, n. 3, p. 176-177, 2001.
- PICCINI, C.; DÁLESSANDRO, B.; ANTÚNEZ, K.; ZUNINO, P. Detection of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in naturally infected bee larvae and artificially contaminated honey for PCR. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 8, p. 751-765, 2002.
- RIESSBERGER-GALLÉ U.; VON DER OHE, W.; CRAILSHEIM K. Adult honeybee's resistance against *Paenibacillus larvae larvae*, the causative agent of the American foulbrood. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 77, n. 4, p. 231-236, 2001.
- ROSE, R. I. *Bacillus larvae* isolation, culturing, and vegetative thermal death point. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 14, n. 3, p. 411-&, 1969.
- SATLLER, A. **Investigação da ocorrência de esporos de *Bacillus larvae* em mel no Rio Grande do Sul, Brasil, e subsídios para a prevenção e controle da Cria Pútrida Americana**. 1993. 84 f. (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SATLLER, A.; LELL C.; BASSI, E. A.; MASSAO, H. Diagnóstico patológico da apicultura no Estado do Paraná – CITPAR-SIDEE/FEPA (GTZ). In: SIMPÓSIO ESTADUAL DE APICULTURA DO PARANÁ, 11. **Anais...** Pato Branco, PR. p.50-53, 1996.
- SCHUCH, D. M. T.; MADDEN, R. H.; SATTLER, A. An improved method for the detection and presumptive identification de *Paenibacillus larvae* spores in honey. **Journal of Agricultural Research**, v. 40, n. 2, p. 59-64, 2001.
- SCHUCH, D. M. T. ***Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* em produtos da colméia produzidos e importados pelo Brasil: Métodos de detecção,**

- perfis de resistência, isolamento de bacteriófagos e sua identificação por microscopia eletrônica de transmissão.** 2002. 137 f. (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SCHUCH, D. M. T.; TOCHETTO, L. G.; SATTLER, A. Isolamento de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 3, p. 441-444, 2003.
- SELTON, P. Spore germination. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 550-556, 2003.
- SHIMANUKI, H. Bactéria. In: MORSE, R. A. & NOWOGRODZKI. **Honey bee pests, pretators, and diseases**. 2 ed., New York: Cornell University Press, 1997.
- SHIMANUKI, H.; HARTMAN, P. A.; ROTHENBU, W. C. In vitro growth studies of *Bacillus larvae* White. **Journal Invertebrate Pathology**. V. 7, n.4, p. 437-&, 1965.
- SHIMANUKI, H.; KNOX, D. A. Improved method for detection of *Bacillus larvae* spores in honey. **Americam Bee Journal**, v. 128, n. 5, p. 353-354, 1988.
- SHIMANUKI, H.; KNOX, D. A. American Foulbrood. In: **Diagnosis of Honey Bee Diseases**. Agriculture Handbook, USDA/ARS, n. 690, 2000. 61p.
- SPIVAK, M.; REUTTER, S. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. **Apidologie**, v. 32, p. 555-565, 2001.
- STEINKRAUS K. H.; MORSE, R. A. American foulbrood incidence in some United States and Canadian honeys. **Apidologie**, v. 23, n. 6, p. 497-501, 1992.
- STURTEVANT, A. P. The development of American foulbrood in relation to the metabolism of its causative organism. **Journal Agricultural Research**, v. 28, p. 129-168, 1924. illus.
- STURTEVANT, A. P. **The sterilization of American foulbrood combs**. Department of Agriculture, US, Washington. Circular n° 284, 1926. 29p.
- STURTEVANT, A. P. Relation de commercial honey to the spread of american foulbrood. **Journal of Agricultural Research**, v. 45, n. 51932, p. 257-285, 1932.
- STURTEVANT, A. P. Quantitative demonstration of the presence of spores of *Bacillus larvae* in honey contaminated by contact with American foulbrood. **Journal of Agricultural Research**, v. 52, n. 9, p. 697-704, 1936.
- VILELA, S. L. O. (org.). **Cadeia Produtiva do mel no Estado do Piauí**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2000. 121 p. il.

- VON DER OHE, W.; DUSTMANN, J. H. Efficient prophylactic measures against American foulbrood by bacteriological analysis of honey for spore contamination. **American Bee Journal**, v. 137, n. 8, p. 603-606, 1997.
- VON DER OHE, W; SCHUTZE, K.; LIENAU, F. W. Arealuntersuchungen aut *Bacillus larvae* spores in Honig als prophylaktikum. **Apidologie**, v. 27, n. 4, p. 122-123, 1996.
- WHITE, G. F. **The bacteria of the apiary, with special reference to bee diseases**. U.S Dept. Agr. Bur. Ent. Tech. Ser. n. 14, 50 p., 1906.
- WHITE, G. F. **American foulbrood**. New York, Department of Agriculture, 1920, 48 p. (Bulletin, 809)
- WOODROW, A. W. Suscptibility of honey bee larvae to American foulbrood. **Gleanings in Bee Culture**, v. 69, p. 148-151, 1941.
- WOODROW, A. W. Suscptibility of honey bee larvae to inoculations with spores of *Bacillus larvae*. **Journal of Economic Entomology**, v. 35, p. 892-895, 1942.