

NOTAS CIENTÍFICAS

Isolamento de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* no Brasil⁽¹⁾

Dulce Maria Tocchetto Schuch⁽²⁾, Lisane Goldmeier Tocchetto⁽²⁾ e Aroni Sattler⁽³⁾

Resumo – Este trabalho objetivou detectar presença de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* em produtos de um entreposto do interior do Estado do Rio Grande do Sul, a identificação de possíveis fontes de contaminação e a avaliação da possibilidade da transferência de esporos para colméias de apiários adjacentes a partir de produtos importados contaminados. Foram analisados mel e pólen importados disponíveis no entreposto, favo do ninho (crias, pólen e mel) colhido de uma colméia sadia, mel estocado em um dos apiários e abelhas adultas. Os resultados foram positivos em relação ao mel e pólen importados, a três grupos de abelhas adultas e ao mel do favo.

Termos para indexação: *Apis mellifera*, mel, pólen, contaminação, colméia.

Detection of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in Brazil

Abstract – The objective of this work was to detect the presence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in products from a warehouse located in Rio Grande do Sul State, Brazil, the identification of possible contamination sources, and the assessment of spores transference possibility from contaminated imported products from the warehouse to apiaries located in the surrounding area. Samples of imported pollen and bulk honey stocked in the warehouse, and honeycomb (brood, honey and pollen) from a healthy hive, honey from one apiary and adult bees were analyzed. Imported honey and pollen, and three groups of adult bees and the honey collected from the honeycomb resulted positive.

Index terms: *Apis mellifera*, honey, pollen, contamination, hives.

A cria pútrida americana (CPA), conhecida internacionalmente pela sigla AFB (american foulbrood), é uma das enfermidades que mais prejudicam as crias das abelhas *Apis mellifera*. É produzida pela forma esporulada do microrganismo *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* e é transmitida antes do terceiro dia de vida através da alimentação das larvas (Hansen, 1984; Shimanuki

⁽¹⁾ Aceito para publicação em 4 de dezembro de 2002.

⁽²⁾ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Lab. Regional de Apoio Animal, Estrada da Ponta Grossa, 3036, CEP 91780-580 Porto Alegre, RS. E-mail: micro-lara-rs@agricultura.gov.br

⁽³⁾ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Fac. de Agronomia, Dep. de Fitossanidade, Av. Bento Gonçalves, 7712, CEP 91540-000 Porto Alegre, RS. E-mail: aronisattler@zipmail.com.br

& Knox, 1991). Até o momento, a enfermidade não foi diagnosticada no Brasil (Sattler, 1993; Costa, 1995; Sattler et al., 1996; Schuch, 2000) e o isolamento do seu agente etiológico, em produtos ou materiais apícolas produzidos no país, também ainda não havia sido registrado.

Os objetivos deste trabalho foram a detecção da presença de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* em produtos de um entreposto do interior do Estado do Rio Grande do Sul, a identificação de possíveis fontes de contaminação e a avaliação da possibilidade da transferência de esporos para colméias de apiários adjacentes a partir de produtos importados contaminados.

Foram colhidas e analisadas 16 amostras de produtos importados estocados no entreposto, sendo 11 de mel a granel e cinco de pólen. As amostras de mel foram analisadas segundo o método oficial brasileiro (Brasil, 1999; Schuch et al., 2001). As amostras de pólen foram pesadas em alíquotas de 5 g, homogeneizadas com 45 mL de tampão fosfato pH 7,2 (PBS) e filtradas em papel Whatman nº 2. A seguir, o sobrenadante foi centrifugado a 2.500 a 3.000 g por 30 minutos, o sedimento re-suspenso em 1 mL de PBS e aquecido a 80°C por 15 minutos, seguindo-se as etapas constantes no método oficial para amostras de mel. Cinco amostras de produtos importados, duas de mel e três de pólen, apresentaram resultados positivos em relação à presença de esporos, o que é indicativo de que o controle realizado para a emissão do certificado zoossanitário internacional, que obrigatoriamente acompanha os produtos de origem animal importados pelo Brasil, não é suficientemente sensível para garantir a ausência de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* nos produtos apícolas importados.

Para avaliar a possibilidade de transferência de esporos, pelas abelhas adultas, do entreposto para colméias localizadas nas proximidades, na área externa do entreposto foram expostos alimentadores-armadilhas e colhidos 16 grupos de abelhas adultas (60 a 100 exemplares por grupo) e uma amostra de abelhas de uma caixa-isca povoada havia três semanas. Em cada grupo de abelhas foram adicionados 100 mL de PBS e, após mistura e enxágüe manual, uma porção de 45 mL da parte líquida da mistura foi transferida para tubos de centrífuga com tampa de rosca e centrifugada a 2.500 a 3.000 g por 30 minutos. O sedimento foi tratado como os sedimentos das amostras de mel, de acordo com Schuch et al. (2001). Dois desses grupos de abelhas adultas apresentaram resultado positivo quanto a esporos de *P. larvae* subsp. *larvae*.

Também foram realizadas inspeções visuais em outros cinco apiários do mesmo proprietário, localizados em um raio de 3 km do entreposto, de onde foram colhidas amostras (grupos) de abelhas adultas de qualquer origem mediante alimentadores-armadilha. Em um dos apiários foi colhida amostra de abelhas do interior da colméia, a qual revelou presença de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* pelas análises laboratoriais. De outra colméia foi colhida uma amostra de favo da área do ninho que, além de crias sadias, continha mel e pólen armazenados. As análises das crias e do pólen resultaram negativas em relação a esporos do agente, ao contrário das análises com o mel armazenado no favo; observou-se ainda crescimento de números de colônias correspondentes a 10 e 20 esporos por 20 mL de mel. Também foram colhidas e analisa-

das amostras de mel estocado pelo apicultor em um de seus apiários, as quais se mostraram isentas de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae*. Durante as análises microbiológicas, foram utilizados como controles positivos uma cultura de *P. larvae* subsp. *larvae* ATCC 9545 e duas amostras de mel importado positivas em análises previamente realizadas no Laboratório Regional de Apoio Animal do Ministério da Agricultura, de Porto Alegre (Lara/RS); como controles negativos foram utilizadas duas amostras de mel negativas em análises também realizadas pelo Lara/RS.

Baseando-se nos sintomas apresentados por Bailey (1984) e Shimanuki & Knox (1991), as inspeções não revelaram sinais clínicos de CPA.

O baixo número de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* na amostra de mel do favo, a ausência de esporos nas crias e no pólen armazenados em alvéolos desse favo, junto com a comprovação da presença de esporos no mel e pólen importados, associados ainda ao resultado positivo da presença de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* obtido em um dos grupos de abelhas colhido de colméia de outro apiário de propriedade do mesmo apicultor, são forte indício de que a presença de esporos do agente no mel do favo tenha sido por causa do uso de resíduos contaminados do entreposto na alimentação das abelhas, ou mesmo em colheita de mel contaminado no interior do entreposto por abelhas campeiras deste apiário.

Os resultados da análise deste estudo constituem o primeiro isolamento oficial de esporos de *P. larvae* subsp. *larvae* em produto apícola obtido no interior de uma colméia, bem como em abelhas adultas, em território brasileiro.

Como a cria pútrida americana é uma enfermidade de instalação lenta e progressiva, podendo levar anos desde a detecção de esporos no mel até a manifestação dos sintomas na colméia (Hansen, 1984), a adoção imediata de medidas sanitárias de contingência preconizadas para os casos de doenças exóticas, pelas autoridades sanitárias brasileiras, será importante para impedir a instalação e disseminação dessa doença no Brasil.

Referências

BAILEY, L. Loque americano. In: PATOLOGÍA de las abejas. Zaragoza: Acribia, 1984. p. 29-34.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 248, de 30 de dezembro de 1998. Of. 109/98. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 5 jan. 1999. Seção 1, p. 13.

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. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1995.

HANSEN, H. Methods for determining the presence of the foulbrood bacterium *Bacillus larvae* in honey. **Tidsskrift for Planteavl**, Lyngby, n. 1724, p. 325-328, 1984.

SATTLER, 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. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.

SATTLER, A.; LELL, C.; BASSI, E. A.; MASSAO, H. Diagnóstico patológico da apicultura no Estado do Paraná. In: SIMPÓSIO ESTADUAL DE APICULTURA DO PARANÁ, 7., 1996, Pato Branco. **Anais...** Curitiba: Federação Paranaense de Apicultores, 1996. p. 50-53.

SCHUCH, D. M. T. Barreiras sanitárias na apicultura: ações do governo brasileiro para o controle da entrada da cria pútrida americana. In: SEMINÁRIO SUL-BRASILEIRO DE APICULTORES, 5., 2000, Balneário Pinhal. **Anais...** Porto Alegre: Evangraf, 2000. p. 47-52.

SCHUCH, D. M. T.; MADDEN, R. H.; SATTLER, A. An improved method for the detection and presumptive identification of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in honey. **Journal of Apicultural Research**, Cardiff, v. 40, n. 2, p. 59-64, 2001.

SHIMANUKI, H.; KNOX, D. A. American foulbrood. In: ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. **Diagnostic of honey bee diseases**. Washington, 1991. p. 4-12. (Agriculture Handbook, 690).