

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ESTABELECIMENTO DE MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE *Paenibacillus larvae*
ATRAVÉS DA PCR

Sérgio Salla Chagas

Porto Alegre

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ESTABELECIMENTO DE MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE *Paenibacillus larvae*
ATRAVÉS DA PCR

Autor: Sérgio Salla Chagas

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias
na área de Microbiologia Veterinária, especialidade
Bacteriologia.

Orientador: Adriano Brandelli

Porto Alegre

2010

Sérgio Salla Chagas

ESTABELECIMENTO DE MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE *Paenibacillus*
larvae ATRAVÉS DA PCR

Aprovada em 28/04/2010.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Adriano Brandelli
Orientador

Membro da Comissão
Prof. Dr. Cláudio Wengek Canal

Membro da Comissão
Prof^a. Dr^a. Mercedes Passos Gemba

Membro da Comissão
Prof. Dr. Delmar Bizani

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho tornou-se possível pelo apoio recebido de muitas pessoas, entidades e empresas, às quais expresso meus sinceros agradecimentos.

Prof. Dr. Adriano Brandelli, pelo exemplo, estímulo e orientação.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da UFRGS.

Colegas e professores do Curso de Doutorado.

Colegas do Laboratório Nacional Agropecuário, LANAGRO/RS.

Prof. Dr. Rodrigo Vaucher, pela amizade, convivência e ajuda na realização deste trabalho.

Dras. Dulce Schuch e Melissa Markosky, pelo fornecimento das amostras e auxílio científico.

Cláudia Militz da Costa e família, pelo apoio incondicional.

CAPES/CNPq.

Meus familiares e amigos.

Esta tese é dedicada a meus filhos Sérgio e Rafael.

RESUMO

“Cria Pútrida Americana” (CPA) é uma enfermidade que afeta apenas o estágio larval de abelhas melíferas. O agente causal desta doença denomina-se *Paenibacillus larvae* e sua forma esporulada é a infectante, podendo determinar a morte da colméia. Os sintomas clínicos da doença são típicos, e as larvas afetadas apresentam-se escuras e viscosas. Na América do Sul já foi isolado na Argentina, Uruguai e Brasil, sugerindo uma via de distribuição da doença.

O diagnóstico é baseado nos sinais clínicos da doença na colméia e larvas e no isolamento e caracterização *P. larvae* envolvido. A detecção de esporos de *P. larvae* requer técnicas de cultivo microbiológico. Alternativamente, podem ser utilizados métodos de diagnóstico molecular, baseados na análise comparativa de seqüências do gene 16S rDNA ou do gene para metaloprotease, entre outros.

No presente estudo, objetivou-se caracterizar as linhagens que circularam no Brasil, conhecer sua disseminação e indicar alternativas de diagnóstico. Foram reavaliados 80 isolados coletados entre 2002 e 2007 e disponíveis na coleção do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/RS), sendo confirmado um protocolo de diagnóstico por PCR convencional, baseado nos genes 16S rDNA e metaloprotease. O gene 16S rDNA dos isolados brasileiros foi seqüenciado e realizada análise filogenética. Numa segunda etapa do trabalho, foram utilizados 28 isolados de *P. larvae* para desenvolver um protocolo de diagnóstico baseado na detecção do gene 16S rDNA por PCR em Tempo Real, estabelecendo-se o limite de detecção observado (LOD) em 6,0 ng de DNA cromossomal.

Os resultados permitiram concluir que existe alta homologia entre as linhagens que circularam no Brasil, que a análise combinada de diferentes genes de *P. larvae* representa uma importante alternativa de diagnóstico e que é possível reduzir o tempo de detecção utilizando PCR em Tempo Real.

Descritores: *Paenibacillus larvae*, diagnóstico, 16S rDNA, metaloprotease, PCR em Tempo Real.

ABSTRACT

"American Foulbrood" (AFB) is a disease that only attacks the larval stage honey bees. His causative agent is *Paenibacillus larvae*, which is infective in spore form, determining the death of the hive. The clinical symptoms are typical, and the larvae affected presents dark and slimy. Besides food with honey containing spores, the introduction of honeybees from beekeeper hives contaminated and even may contribute to its spread. In South America has been isolated in Argentina, Uruguay and Brazil, suggesting a route of disease distribution.

The diagnosis is based on clinical signs of disease and in their isolation and characterization, and the speed and skill in diagnosis are important to minimize economic losses. The detection of spores of *P. larvae* requires microbiological culture. Alternatively, methods may be used for molecular diagnostics based on comparative analysis of 16S rDNA gene sequences or the gene for metalloproteinase, among others.

In the present study aimed to characterize the strains that circulated in Brazil, know its spread and to indicate alternative diagnosis. Were reassessed 80 isolates collected between 2002 and 2007 and available in the collection of National Agricultural Laboratory (LANAGRO/RS), and confirmed a diagnostic protocol for conventional PCR, based on 16S rDNA and metalloproteinase. The 16S rDNA of the Brazilian isolates was sequenced, and performed phylogenetic analysis. In the second stage of labor were used 28 isolates of *P. larvae* to develop a diagnostic protocol based on the detection of 16S rDNA PCR Real-time, taking the limit of detection observed (LOD) at 6.0 ng of chromosomal DNA.

The results showed also that there is high homology between the strains that circulated in Brazil, the combined analysis of different genes of *P. larvae* represents an important alternative diagnosis, which can reduce the detection time using Real Time PCR.

Keywords: *Paenibacillus larvae*, diagnosis, 16S rDNA, metalloproteinase, real-time PCR.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1	Primers usados para a ampliação dos genes 16S rDNA e Metaloprotease	40
TABELA 2	Avaliação microbiológica dos isolados de <i>Paenibacillus larvae</i>	41

CAPÍTULO 2

TABELA 1	Sequências de 16S rDNA usadas para confirmar a especificidade dos primers PI <i>tr</i> F/R para detecção de <i>Paenibacillus larvae</i> por PCR em Tempo Real	56
TABELA 2	Sensibilidade dos primers PI <i>tr</i> F/R para detecção de <i>Paenibacillus larvae</i> por PCR em Tempo Real	57
TABELA 3	Comparação entre a detecção de <i>Paenibacillus larvae</i> por PCR convencional e PCR em Tempo Real, baseado na amplificação das sequências de 16S rDNA	58

LISTA DE FIGURAS**CAPÍTULO 1**

FIGURA 1 Produtos de PCR em eletroforese de gel de agarose 42

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 Relação entre CT e diluições seriadas de *Paenibacillus larvae* 59

APÊNDICE

FIGURA 1 Fragmentos gerados com as diferentes enzimas de restrição sobre o gene parcial 16S rDNA de *Paenibacillus larvae*. 76

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
1. CAPÍTULO 1	
1.1. INTRODUÇÃO	10
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	
1.2.1 Características microbiológicas	11
1.2.2 Características de patogenicidade	13
1.2.3 Sintomas da doença na colméia e nas crias	16
1.2.4 Características de virulência	17
1.2.5 Proteases	17
1.2.6 Diagnóstico microbiológico	18
1.2.7 Alternativas de diagnóstico	18
1.2.8 Métodos moleculares	19
1.2.9 Detecção de <i>Paenibacillus larvae</i> pela técnica da PCR convencional	21
1.2.10 PCR em Tempo Real	22
2. CAPÍTULO 2	
2.1 Assessment of the presence of <i>Paenibacillus larvae</i> in Brazil	26
3. CAPÍTULO 3	
3.1 Detection of <i>Paenibacillus larvae</i> by real-time PCR	44
4. DISCUSSÃO	
4.1 Análises microbiológicas e por PCR	60
4.2 Análise filogenética	63
4.3 Avaliação de <i>Paenibacillus larvae</i> utilizando enzimas de restrição	64
4.4 Considerações finais	65
5. CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICE	76

INTRODUÇÃO

A implantação e disseminação da enfermidade “Cria Pútrida Americana” (CPA) impacta grandemente a apicultura, causando perdas econômicas pela redução da produção e barreiras a comercialização internacional de seus produtos (GONÇALVES, 2000).

CPA é uma enfermidade que afeta o estágio larval de abelhas melíferas, ocorrendo em todos os países onde estas são criadas. É doença notificável, de alta importância socioeconômica e significativa para o comércio internacional, classificada pela OIE como doença da lista B (OIE, 2000).

O agente causal desta doença denomina-se *Paenibacillus larvae* e sua forma esporulada é a infectante. Apesar de ser um importante patógeno, seus fatores de virulência e mecanismos de patogenicidade estão pouco esclarecidos. O diagnóstico é baseado nos sinais clínicos observados na colméia e no isolamento e identificação do *P. larvae* envolvido. Para o controle do surto, evidenciado pela presença de sinais clínicos da doença, é necessário a destruição da colméia doente e a desinfecção do material contaminado.

A identificação de *P. larvae* requer o crescimento da bactéria em laboratório (OIE, 2000). Entretanto, o diagnóstico microbiológico é demorado, caro e trabalhoso (SCHAAD et al., 2001). Recentemente, métodos utilizando a técnica da PCR foram desenvolvidos para identificar as espécies de *Paenibacillus spp* envolvidas e diferenciar as linhagens de *P. larvae* presentes (DOBBELARE et al., 2001; GOVAN et al., 1999; LAURO et al., 2003).

Justificou-se a realização deste trabalho pela necessidade de estudar as amostras coletadas no país, conhecer suas características e estabelecer alternativas de diagnóstico, desenvolvendo um método rápido para a detecção de *Paenibacillus larvae*.

REVISÃO DE LITERATURA

Características microbiológicas

O gênero *Paenibacillus* pertence a família *Bacillaceae*, apresentando uma grande diversidade de requerimentos ecológicos, nutricionais e de metabolismo, estando distribuído nos mais diversos ambientes. Algumas espécies são patógenos de larvas e pupas de insetos (ASH et al., 1993).

Bacillus larvae, sua denominação original, foi reclassificado por Ash et al. (1993) como *P. larvae*. Em seguida, amparados em análises morfológicas, bioquímicas e moleculares, Heyndrickx et al. (1996) descrevem as subespécies *larvae* e *pulvificiens*.

Apesar do consenso de que as características bioquímicas do *P. larvae* e do *P. pulvificiens* eram semelhantes, *P. larvae* é relacionado como o patógeno responsável pelo desenvolvimento da doença conhecida como Cria Pútrida Americana (CPA). Por sua vez, mesmo sem evidências que assegurassem sua comprovação inequívoca, uma rara enfermidade descrita como "powdery scale" era imputada a *P. pulvificiens*.

Kilwinski et al. (2004) propuseram a reclassificação de uma cepa ATCC de *P. larvae* subespécie *larvae* e de uma cepa ATCC de *P. larvae* subespécie *pulvificiens*, como *P. larvae* subespécie *larvae*, devido a alta homologia entre elas. Tal fato levou a que posteriormente fossem eliminadas as designações de subespécies *larvae* e *pulvificiens*, passando-se a adotar a denominação *P. larvae*.

P. larvae é um bastonete Gram positivo esporulado, de extremidades arredondadas, reto ou as vezes curvo, medindo aproximadamente 0,5 µm de largura por 1,5 a 6,0 µm de comprimento, isolados ou em cadeias de tamanhos variáveis; produzindo esporos elípticos centrais ou sub-terminais que podem deformar o esporângio e com frequência se encontram livres, sendo escassos *in vitro*. É anaeróbico facultativo e algumas linhagens são móveis por flagelos peritríquios. Seu pH ótimo de multiplicação é próximo de 7,0 e sua temperatura ideal de crescimento situa-se entre 35° e 36°C, numa faixa de 25°C a 40°C. É relativamente

halotolerante, crescendo em concentrações de até 2% de NaCl. É catalase e lecitinase negativo, hidrolisa a caseína, fermenta a glicose mas não fermenta o manitol, ou o faz lentamente. Reduz o nitrato a nitrito, não é capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono e não produz pigmentos (GOECHAUER & CORNER, 1974; SCHUCH et al., 2001).

As características da morfologia colonial são importantes na diferenciação dos *Paenibacillus* spp. *P. larvae* geralmente apresenta colônias irregulares, com diâmetro em torno de 6 mm, opacas, planas e com centro levemente elevado (NEUENDORF et al., 2004).

P. larvae não difere dos demais microrganismos mesófilos quanto a resistência ao estresse ambiental. Contudo, seus esporos são resistentes ao calor, dessecação, produtos químicos e outros agentes; podendo manter sua viabilidade no ambiente por muitos anos, o que limita a possibilidade de sua eliminação.

Identificados casos de CPA, sua notificação é obrigatória (OIE, 2000), com imediata destruição das colméias e desinfecção do material utilizado no manejo do apiário. O diagnóstico da doença é baseado em sinais clínicos na colméia e larvas, e no isolamento do agente etiológico, através da pesquisa de esporos de *P. larvae* em materiais retirados da colméia. Esporos podem estar presentes no mel mesmo na ausência de sinais clínicos de CPA. O diagnóstico laboratorial, utilizado no monitoramento da doença, é feito por métodos microbiológicos (HORNITZKY & CLARK, 1991), bioquímicos (GORDON et al., 1973) ou moleculares (OIE, 2009).

Recentemente, Gillard et al. (2008) destacaram a importância da avaliação de colméias assintomáticas, uma vez que colméias aparentemente sadias podem apresentar esporos de *P. larvae*, tendo inclusive verificado que apenas 86% destes casos são realmente diagnosticados pela análise de amostras de mel.

Sendo *P. larvae* um microrganismo ubíquo, é encontrado em diferentes sistemas agrícolas, desde o solo até as flores de plantas de cultivo ou silvestres. Estando as abelhas envolvidas nos fenômenos de polinização (SILVEIRA, 2008), é esperada sua presença nas

patas ou papo de abelhas campeiras, responsáveis pela coleta do pólen e néctar para a elaboração do mel (DE GRAAF et al., 2006).

O isolamento de esporos a partir de amostras de mel é uma das dificuldades do diagnóstico e as técnicas disponíveis apresentam diferentes limites de detecção, após a semeadura em meios de cultura seletivos (ALIPPI, 1995; HORNITZKY & NICHOLLS, 1993; HORNITSKY & KARLOVSKIS, 1989; SCHUCH et al., 2001; SHIMANUKI & KNOX, 1988).

A consequência de um resultado positivo para *P. larvae* é sério e a habilidade no diagnóstico e conhecimentos epidemiológicos são importantes para prevenir perdas econômicas.

O método a ser utilizado para o diagnóstico depende se existem sinais clínicos da doença ou não. No caso de enfermidade clínica, as técnicas de laboratório necessárias para confirmação requerem o isolamento do patógeno por meio de cultivos, verificando-se a presença de esporos, as características de crescimento da bactéria e a morfologia da colônia, combinadas com a coloração de Gram e teste da catalase, sendo facultativa a realização da prova de redução de nitratos, dentre outras provas bioquímicas necessárias para sua diferenciação. Também pode-se utilizar a reação em cadeia da polimerase (OIE, 2009).

Na ausência de sinais clínicos, a identificação do patógeno é realizada mediante testes microbiológicos e provas bioquímicas das colônias suspeitas ou pela PCR; feita diretamente das amostras de produtos apícolas ou do cultivo microbiano.

Características da patogenicidade

A bactéria *P. larvae* pode causar a morte da colméia, mas é infectante somente na forma esporulada e exerce ação apenas sobre o estágio larval das abelhas *Apis mellifera* e outras *Apis* spp (BAKONYI et al., 2003; GENERSCH, 2010), não atacando as demais fases de desenvolvimento das abelhas (CAMARGO, 1972). Em condições naturais, raramente observa-se a infecção de larvas de rainhas e zangões.

A infecção ocorre pelo fornecimento e ingestão de alimento contaminado com esporos de *P. larvae* que, após 24 horas, germinam no trato digestivo. Em seguida, invadem os túbulos de Malpighi e atingem a cavidade corporal da larva, produzindo septicemia e morte num período de aproximadamente 10 dias após o contato inicial. Os sintomas clínicos são típicos e as larvas afetadas apresentam-se escuras e viscosas (ALIPPI, 1992; SHIMANUKI & KNOX, 1991).

A medida que aumenta a idade da larva, aumenta a resistência à infecção por *P. larvae*. De uma maneira geral, as larvas de abelhas são sensíveis à infecção no máximo até 53 horas após a eclosão dos ovos (OIE, 1992), sendo a dose infectante média (LD₅₀) necessária para o início da infecção estimada em 35 esporos para larvas de até 48 horas de vida. De acordo com Sanford (1996), para o desenvolvimento da enfermidade em uma colméia é necessário sua alimentação com mel altamente contaminado (5×10^5 ufc/g). Já Genersch (2010) e Lauro et al. (2003), informam que as larvas são sensíveis apenas nas primeiras 36 horas de vida, quando 10 esporos ou menos são suficientes para causar a infecção, enquanto que larvas com mais de 48 horas de vida são relativamente imunes a doença.

Favos de colméias contaminadas, introduzidos em colméias sadias são uma das principais fontes de disseminação de esporos de *P. larvae*, e as abelhas podem atuar como vetores da doença (DE JONG, 1996).

Eischen et al. (2005), verificaram altas contagens de *P. larvae* em enxames americanos, sendo a bactéria endêmica naquele país. Como enxames de abelhas são uma importante via de disseminação de esporos de *P. larvae*, pesquisadores como Ryba et al.

(2009), tem se dedicado ao desenvolvimento de técnicas de PCR para a detecção de esporos partindo diretamente da abelha. Ryba et al. (2009), esclarece que como o número de esporos presentes na superfície do corpo das abelhas é geralmente baixo, para possibilitar sua identificação faz-se necessário o emprego de técnicas sensíveis, como a PCR.

Não há um prazo estabelecido para o surgimento da doença, uma vez que após a introdução de esporos de *P. larvae* na colméia sua evolução é lenta, e pode levar anos entre a introdução dos esporos e a identificação dos primeiros sinais clínicos da doença (SCHAECHTER & EISENSTEN, 1993), pois esta é influenciada pelo estado sanitário e características genóticas da colméia e pela carga infectante e características genóticas da linhagem de *P. larvae* envolvida, dentre outros fatores (HANSEN, 1984).

Evans & Armstrong (2006) demonstraram a presença de um claro efeito bacteriostático sobre o *P. larvae*, exercido pelo complexo bioma microbiano presente no interior das colméias. Esta simbiose entre microrganismos pode aumentar a resistência individual da colméia, indicando uma potencial estratégia de controle frente ao *P. larvae*.

Gillard et al. (2008), comprovaram que esporos de *P. larvae* são carregados pelas abelhas, mas sofrem um forte efeito inibitório pelas substâncias secretadas durante a elaboração do mel, o que faz com que os esporos realmente viáveis estejam presentes em baixa concentração. Durante a alimentação das larvas estes são diluídos no mel oferecido como alimento, reduzindo a possibilidade de estabelecer a infecção.

Para a destruição de *P. larvae* na forma vegetativa ou esporulada é indicado o uso de hipoclorito de sódio (GOODWIN & HAINE, 1998), ou ácido peracético. Em caso de surtos, a recomendação é a imediata incineração da colméia, dos materiais e produtos apícolas.

O controle da doença, pela destruição das colméias afetadas, pode exercer pressão de seleção sobre linhagens menos virulentas e orientar uma alteração na virulência de *P. larvae* (GENERSCH et al., 2005).

Sintomas da doença na colméia e nas crias

A cor do corpo das abelhas varia conforme seu estágio de desenvolvimento. Na fase de larva, pré-pupa ou pupa apresentam coloração branco-pérola. O aspecto da cria indica a fase na qual ocorreu a morte, geralmente antes que se complete a pigmentação do corpo. Quanto mais jovem for a cria, mais rapidamente se manifesta a doença, podendo levar de uma a duas semanas.

Larvas doentes mudam sua coloração para marrom-escuro ou preto. Na maioria dos casos a morte ocorre na fase de pupa, podendo os alvéolos estarem operculados ou não. Os opérculos ficam abaulados, escurecidos e com aspecto úmido. Apresentam perfurações irregulares, resultantes da inspeção dos mesmos.

Um sintoma típico da doença é o cheiro pútrido característico. Nesta fase geralmente a doença está em estágio avançado, com a presença de crias mortas, marrom-escuras ou pretas, formando uma massa com alta viscosidade (SHIMANUKI et al., 1992). Observam-se ainda larvas mortas, em posição irregular em alvéolos fechados; pré-pupas ou pupas fundidas e com a língua estendida na direção do vértice superior do alvéolo; e alvéolos fechados depois que a maioria das abelhas emergiu. Sendo evidenciada a presença de escamas, que são restos de larva, desidratada e escura, aderidas nas paredes do alvéolo e de difícil remoção; estas poderão conter grande quantidade de esporos de *P. larvae*.

Em todos os casos pode-se verificar a presença de favos falhados, com alvéolos vazios ao lado de alvéolos contendo crias saudáveis; pois as rainhas evitam realizar a postura em alvéolos onde ocorreu a morte das crias (PEREIRA et al., 2003).

Características da virulência

A virulência da cepa circulante é um dos fatores que determinam a variação na expressão da infecção por CPA em colméias de abelhas.

Estudos do genoma da abelha apresentam evidências de um aumento dos níveis de serina proteases após a infecção da larva, indicando uma possível correlação entre o estágio de desenvolvimento do embrião e a imunidade inata. A infecção por *P. larvae* pode ativar a cascata de liberação de serina proteases, as quais participam, dentre outros fatores, com respostas de defesa (ZOU et al., 2006).

Alippi et al. (2002), utilizando PCR-RFLP, identificaram diferenças nos genótipos de *P. larvae* circulantes. Genersch et al. (2005), demonstraram que, apesar das dificuldades de diferenciação entre as subespécies de *P. larvae*, algumas linhagens apresentam distintas virulências, e que esta variabilidade deve-se a genótipos específicos.

Neuendorf et al. (2004), além de caracterizarem diferentes genótipos de *P. larvae*, indicaram diferenças na virulência entre as linhagens e demonstraram a presença de plasmídeo em uma linhagem resistente a antibióticos.

Proteases

As enzimas proteolíticas constituem um importante grupo de enzimas bacterianas (UYAR & BAYSAL, 2004). A maioria destas proteases é extracelular (TREVAN et al, 1990) e os *Bacillus spp* seus maiores produtores (NASCIMENTO & MARTINS, 2004). Dentre estas estão a metaloprotease I e metaloprotease II, que foram descritas como tendo potencial para utilização diagnóstica.

P. larvae é produtor de metaloproteases neutras (BACH et al., 2001), que além de orientar o diagnóstico presuntivo pode fornecer indicativos de seu mecanismo de patogenicidade e fatores de virulência.

Diagnóstico microbiológico

A abordagem usual está voltada para a detecção de esporos de *P. larvae*, utilizando-se diferentes metodologias. No Brasil, como método oficial analítico foi definido o protocolo estabelecido por Schuch (2001), onde primeiramente a amostra é diluída com solução salina tamponada e aquecida a 45°C, o que possibilita sua melhor homogeneização e favorece as etapas subsequentes; além de reduzir o efeito de compostos com ação antibacteriana que porventura estejam presentes. Em seguida, a amostra é centrifugada e o sedimento obtido é eluído e aquecido a 80°C, visando estimular a germinação dos esporos e inativar células bacterianas competidoras.

Para isolamento de *P. larvae*, esta solução é então semeada sobre a superfície de meio de cultura composto por ágar, soja triptona e ágar *cereus*, suplementado com ácido pipemídico, ácido nalidíxico e gema de ovo. Esta composição possibilita a verificação da produção de lecitinase e inibe o crescimento de outras espécies microbianas, que poderiam saturar completamente o meio de cultivo.

A confirmação da presença de *P. larvae* é feita considerando dentre outras características a sua incapacidade em degradar o peróxido de hidrogênio e seu crescimento em ágar leite com tiamina, onde as colônias de *P. larvae* apresentam halos de atividade proteolítica, resultante da hidrólise da caseína; sendo esta característica útil para o diagnóstico da presença de *P. larvae* (BAILEY, 1984).

Alternativas de diagnóstico

O diagnóstico microbiológico é demorado, caro e trabalhoso. Com a finalidade de minimizar estes problemas, vários autores sugerem a adoção de métodos de diagnóstico molecular (PCR convencional), utilizando-se a análise comparativa da sequência dos genes 16S rDNA (ALIPPI et al., 2002; GOVAN et al., 1999; LAURO et al., 2003) e do gene para metaloprotease (KILVINSKY et al., 2004) para confirmar o diagnóstico microbiológico,

caracterizar os diferentes genótipos de *P. larvae* e fornecer dados epidemiológicos da doença.

Recentemente, Han (2008), indicou a possibilidade da detecção do gene 16S rDNA de *P. larvae* ser feito pela técnica da PCR em Tempo Real.

Métodos moleculares

Diferentes métodos moleculares, como a PCR convencional, a PCR em Tempo Real, o uso de enzimas de restrição, dentre outras; vem sendo utilizadas na avaliação de *P. larvae*.

A confirmação do diagnóstico de *P. larvae* por métodos moleculares representa uma redução no tempo de análise e maior segurança no resultado, sendo utilizados protocolos específicos para a detecção de DNA de *P. larvae* presente em amostras de produtos apícolas.

A extração do DNA bacteriano constitui uma das etapas mais importantes do processo de diagnóstico molecular, compreendendo três etapas principais: (1) a lise da célula, (2) a inativação de nucleases celulares e (3) a separação do DNA dos outros componentes celulares por filtração ou precipitação.

A lise pode ser física (mecânica), química (detergentes) ou por digestão enzimática, devendo ser conduzida de forma que as membranas celulares sejam rompidas, liberando os ácidos nucléicos íntegros. A inativação das nucleases celulares é feita por meio de sais. Para a separação do DNA podem ser combinadas diferentes metodologias, como o uso de fenol-clorofórmio para a remoção das proteínas seguida da precipitação com isopropanol ou etanol; ou através de altas concentrações de sal e mudanças no pH. Resíduos de fenol ou detergentes utilizados na extração devem ser eliminados durante a etapa de precipitação do DNA, pois são inibidores da reação da PCR.

Podem ser empregados também kits comerciais de extração, os quais utilizam uma resina que tem afinidade de ligação ao DNA, sendo este diretamente purificado da solução após digestão enzimática e tratamento químico.

É possível obter DNA de qualidade a partir de colônias isoladas de *P. larvae* utilizando um método rápido baseado na desnaturação da parede celular pelo calor, seguido de centrifugação e imediata utilização do conteúdo celular na reação da PCR, sem etapas de purificação (SAMBROOK & RUSSEL, 2001; OIE, 2009).

No caso de extração de DNA de esporos de *P. larvae* diretamente a partir de amostras de mel, é necessário a realização de diluições seriadas para eliminar a inibição da PCR causada pelos constituintes do mel, combinando-se com uma etapa de lise enzimática, ou pela incubação do sedimento em caldo nutritivo composto por extrato de cérebro e coração (BHI) suplementado com tiamina, a 37°C durante 2 a 24 horas, dentre outros.

Após a extração, o DNA deve ser eluído em tampão salino ou água, livre de DNAses e RNAses, quantificado e armazenado a -20°C.

As análises moleculares consistem no estudo de genes ou fragmentos de genes específicos, que indicam o patógeno ou sua característica em avaliação. Num primeiro momento, por meio da reação de polimerização em cadeia (PCR) realiza-se a amplificação da região a ser estudada. Sobre esta amplificação podem ser aplicadas outras técnicas, como o corte com enzimas de restrição. Todas envolvem um passo complementar de visualização em transluminador e foto documentação, após prévia eletroforese em gel.

Recentemente foram desenvolvidas metodologias que permitem o acompanhamento em tempo real de cada ciclo da amplificação do DNA alvo, cujo sistema baseia-se na detecção e quantificação de um sinal fluorescente, permitindo avaliar e quantificar o número de moléculas produzidas ciclo a ciclo.

Deteção de *Paenibacillus larvae* pela técnica de PCR convencional

Alguns métodos analíticos utilizando a PCR tem sido desenvolvidos para detectar qualitativamente a presença de seqüências de DNA de *P. larvae*. Esta análise baseia-se na amplificação de um fragmento específico do gene de interesse, o qual identifica o patógeno. A amplificação é realizada utilizando a enzima DNA polimerase, e seqüências iniciadoras específicas de DNA (primers), que flanqueiam a região alvo (ROZEN & SKALETSKY, 2000). Também é necessário a adição de desoxinucleotídios trifosfatados (dntp) e de cofatores da polimerase, como o Mg^{2+} .

O número de seqüências de DNA alvo amplificadas aumenta exponencialmente a cada ciclo, que é constituído de três etapas: (1) na primeira etapa ocorre a desnaturação da molécula de DNA, a uma temperatura de aproximadamente 94°C, e a fita dupla é separada. Em seguida, (2) a temperatura é reduzida até 50°C - 60°C, para o anelamento dos primers; (3) a temperatura é elevada a 72°C para que ocorra a polimerização da cadeia. Os ciclos são repetidos até 50 vezes, dependendo da quantidade do DNA alvo presente na reação. Após cada ciclo, as cópias obtidas são utilizadas como molde para um novo ciclo de amplificação, resultando em amplificação exponencial do número de fragmentos.

Uma reação de PCR é composta por três fases, sendo que (1) na fase inicial observa-se grande variabilidade na amplificação, uma vez que existem poucas cópias das seqüências alvo, (2) na fase linear ou exponencial teóricamente o dobro de produto é amplificado a cada ciclo, (3) na fase final ou platô, a reação é menos eficiente devido a limitação dos reagentes e a competição com os produtos gerados. Como a cinética da reação é individual para cada amostra, na mesma reação podem ser observados platôs diferentes entre as amostras.

A análise é feita ao final da reação, quando o produto da amplificação é comparado em gel, com um padrão de tamanho molecular conhecido. Para a visualização em gel do fragmento amplificado utiliza-se um corante intercalante de dupla fita de DNA, revelado em luz ultravioleta.

Apesar de sua precisão e sensibilidade, uma das desvantagens do método da PCR convencional é o fato da análise ser realizada ao término da reação, o que impossibilita coletar informações sobre a quantidade do alvo que está sendo amplificado. Da mesma forma, a necessidade de etapas pós PCR aumenta a possibilidade de contaminação e impacta o resultado obtido (WEHRLE et al., 2009; MUMFORD, 2000).

PCR em Tempo Real

A reação da PCR em tempo real, uma variante da reação da PCR convencional, representa grande avanço nos métodos moleculares de auxílio diagnóstico, uma vez que facilita as tarefas de detecção e quantificação de expressão gênica.

O sistema é baseado na detecção e quantificação de um sinal fluorescente, diretamente proporcional ao aumento de produtos de amplificação durante a reação, correlacionado com a detecção inicial na fase exponencial; permitindo avaliar e quantificar o número de moléculas produzidas ciclo a ciclo.

Existem diferentes protocolos de trabalho, que utilizam sondas fluorescentes ou corantes como SyBr Green (WEHRLE et al., 2009).

SyBr Green, além de ser mais barato, não requerer o desenvolvimento de sonda específica, e os produtos de PCR podem ser diferenciados pela análise da curva de melting. Utiliza um sistema fluorescente, intercalante de dupla fita de DNA, primers que irão determinar o alvo da amplificação, e um equipamento contendo uma fonte de luz capaz de excitar o fluorocromo envolvido na reação; cuja intensidade é diretamente proporcional à quantidade de DNA amplificado (SUN, 2010).

SyBr Green é uma substância que por afinidade se liga ao DNA dupla fita, e seu sinal fluorescente é captado ao final de cada ciclo de amplificação. Esta ligação ocorre sem nenhum processo de seleção, de modo que qualquer molécula dupla fita amplificada durante a reação contribuirá para o sinal de fluorescência emitido. A fluorescência do SyBr

Green é capaz de aumentar a emissão de luz em até 20 vezes para uma mesma concentração de corante, quando está ligada ao DNA dupla fita .

Como a ligação do corante ocorre entre as cadeias de DNA, a fluorescência produzida pela amostra durante a reação de amplificação é detectada pelo sistema à medida que DNA dupla fita é gerado; e o momento da reação em que sua fluorescência é identificada inequivocamente acima do ruído de fundo (background) corresponde ao limiar de detecção, comumente denominado CT ou CP (threshold cycle ou crossing point). Isto ocorre na fase exponencial, quando a eficiência da reação de PCR está maximizada.

Oscilações na eficiência da amplificação são determinadas principalmente por alterações na pipetagem, na concentração de reagentes e no desenho dos primers; fazendo com que nos últimos ciclos a reação da PCR ocorra de modo não exponencial, ou que ao longo da reação sejam formados dímeros de primers ou amplificados produtos inespecíficos.

Para verificar se a fluorescência captada teve a participação de produtos de amplificação inespecíficos ou dímeros de primers, ao final da reação deve-se proceder à análise da curva de dissociação, onde os produtos são desnaturados.

Como cada fragmento de DNA dupla fita obtido apresenta uma temperatura específica de desnaturação, também chamada temperatura de melting (T_M), é possível avaliar o comportamento de cada amostra, pois diferentes fragmentos se dissociam em diferentes temperaturas, permitindo identificar a presença de mais de um tipo de produto de amplificação na reação e diferenciar os fragmentos de DNA obtidos (MARTINEZ-BLANCH et al., 2009).

Além disso, determinadas matrizes analíticas, tais como mel e produtos apícolas, por apresentarem em sua constituição enzimas, ceras, proteínas, minerais e ácidos orgânicos, dentre outros, podem inibir a reação e dificultar a detecção de *P. larvae*; requerendo protocolos específicos para obtenção de DNA de qualidade (RAJENDRAM et al., 2006).

A capacidade da PCR em Tempo Real determinar com acurácia o número de cópias de DNA presentes na amostra depende da linearidade e eficiência do ensaio, determinado pelo “slope” da curva de regressão linear, cujo ótimo teórico é de -3,32; valores estes que são mais facilmente obtidos utilizando-se DNA purificado ou suspensões celulares calibradas (MARTINEZ-BLANCH et al., 2009).

Em ensaios de detecção, é necessário estabelecer o limite de sensibilidade, ou Limite de Detecção Observado (LOD) para a metodologia empregada, que é a menor quantidade ou concentração do analito em uma amostra que pode ser confiavelmente detectada, mas não necessariamente quantificada, em pelo menos 95% das vezes para o LOD estabelecido, assegurando valores menores ou iguais a 5% de resultados falso-negativos (ISO 21570, 2005).

2. CAPÍTULO 2

2.1 Assessment of the presence of *Paenibacillus larvae* in Brazil

Artigo submetido à revista *Veterinary Microbiology*

Assessment of the presence of *Paenibacillus larvae* in Brazil

Sérgio Salla Chagas^{1,2}, Adriano Brandelli^{1,3,*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, Porto Alegre, Brazil.

² Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/RS), Estrada da Ponta Grossa 3036, Porto Alegre, Brazil.

³ Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970 Porto Alegre, Brazil.

* Corresponding author: A. Brandelli; fax +5551 3308 7048; e-mail: abrand@ufrgs.br

Abstract

Paenibacillus larvae is the agent of American Foulbrood disease (AFB), causing the death of the hive and greatly affecting beekeeping. The diagnosis is based on clinical signs of disease and the isolation and characterization of *P. larvae*. In Brazil, this bacterium was detected only once, in the states of Rio Grande do Sul and Paraná. The present study aimed to characterize the strains that circulated in Brazil, indicating alternative diagnosis. PCR protocols based on detection of 16S rDNA and metalloproteinase genes confirmed all strains were *P. larvae*. The 16S rDNA gene was sequenced, and phylogenetic analysis was performed. The results indicated that there is high homology among the strains that circulated in Brazil, and the combined analysis of different genes of *P. larvae* is an important alternative diagnosis.

Keywords: *Paenibacillus larvae*; diagnosis; 16S rDNA; metalloproteinase

1. Introduction

The American Foulbrood (AFB) is a notifiable disease of high economic importance and significant to international trade (OIE 2009). Its causative agent is *Paenibacillus larvae*, which is infective in spore form (Genersch 2008), and only attacks the larval stage honey bees (Genersch 2010). Infection occurs by ingestion of spores that after 24 hours germinate in the intestine and spread, producing septicemia and death (Alippi 1992; Shimanuki et al. 1992). The clinical symptoms are typical, and the larvae have affected to a dark and viscous form. Besides food with honey containing spores, the introduction of bees from hives infected and even beekeepers could help its spread. It is difficult to prevent and control AFB because not only are the bacterial spores able to survive for long periods of time and under adverse environmental conditions but 10 or less spores are also sufficient to cause this disease in very young larvae (Genersch 2010).

Detection of *P. larvae* requires microbiological culture (Schuch et al. 2001). Alternatively, molecular diagnostic methods based on comparative analysis of sequences of the 16S rDNA (Alippi et al. 2003; Govan et al. 1999; Dobbelaere et al. 2001) or the gene for metalloproteinase (Kilwinski et al. 2004) have been described.

In South America, the first isolation of *P. larvae* occurred in 1989 in Argentina (Alippi 1992). This bacterium was then isolated in Uruguay (Antunez et al. 2004). In Brazil, despite efforts to prevent its introduction from honey contaminated with *P. larvae* was found in the state of Rio Grande do Sul in 2002. The presence of *P. larvae* was initially detected in beehives without clinical signs of disease (Schuch et al. 2003). More recently it was reported an outbreak in hives in the state of Paraná (MAPA 2006), suggesting a route of disease distribution and stimulating the development of this work, aiming to characterize the strains that circulated in Brazil.

2. Materials and methods

2.1 Microbiological investigation

The study used 80 isolates of *P. larvae*, isolated from samples of honey, honeycomb and pollen collected between 2002 and 2007 by Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/RS, Ministry of Agriculture, Brazil), through the method of microbiological analysis for the detection of spores (Schuch et al., 2001), when aliquots of 20 g of the various products were diluted to 40 ml of distilled water and centrifuged at 3000 g for 30 min. The pellet obtained was suspended in 1 ml of distilled water, heated to 80°C for 10 min and seeded on selective *Paenibacillus larvae* agar plates (Schuch et al., 2001). This work, the plates were incubated at 35°C, and monitored for 5 days. The number of colony forming units (CFU) of *P. larvae* was determined. Three colonies of each plate were isolated for confirmatory evidence, based on colony morphology, Gram stain, observation of a zone of proteolysis and inability to produce catalase.

After the step of microbiological investigation, the presence of *P. larvae* in the samples was performed by molecular analysis, based on the detection of 16S rDNA gene and the gene for metalloproteinase as described below.

2.2 DNA extraction

Each isolated colony was resuspended in 100 µl of distilled water and subjected to the protocol of bacterial DNA extraction, using phenol-chloroform (Sambrook and Russel 1991). *P. larvae* ATCC 9545 was used as a positive control. *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 and *Paenibacillus alvei* isolated by LANAGRO/RS (Porto Alegre, Brazil), were used as negative controls.

The DNA was dissolved in 50 µl of buffer consisting of 10 mM Tris / HCl, pH 8.0, containing 1 mM EDTA, and quantified by UV spectrophotometer (Analytik Jena, model Specord 40) at wavelengths of 260 and 280 nm.

2.3 Detection of 16S rDNA and metalloproteinase genes

For the amplification of the 16S rDNA was used a nested PCR protocol, conducted in a thermal cycler GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems). The amplification was initially performed with external primers *Ple* (Table 1). The final concentrations of reagents were 0.2 mM of each primer, 1.25 U Taq DNA polymerase and specific buffer, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 5 µl of DNA (at concentration of 20 ng/µl) in a reaction volume of 25 µl. Reactions were performed in triplicate, using the technique of “touchdown” PCR (Don et al. 1991), with an initial step at 94°C for 30 s followed by 20 cycles of denaturation at 94°C, annealing at 60°C and extension at 72°C, each step lasting 30 s. Then, the melting temperature was 94°C, and annealing at 55°C, both for 30 s. The extension step was 72°C for 30 s, a total of 20 cycles, followed by a final extension at 72°C for 10 min, which resulted in the amplification of a product with 969 base pairs. The internal amplification was made with primers *Pli* (Table 1). The reagents used in this reaction had the same final concentrations of the above reaction. The program used 30 cycles carried out under the following conditions: 94°C for 30 s, 59°C for 30 s, 72°C for 45 s, followed by a final extension at 72°C for 5 min, resulting in amplification of a product with 572 base pairs.

Amplification of metalloproteinase gene was developed with the primers *MpPl* (Table 1), which amplify a fragment of 271 base pairs. The reaction was conducted in thermal cycler GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems). The final concentrations of reagents were 1 mM of each primer, 1 U Taq DNA polymerase and

specific buffer, 0.2 mM of dNTPs , 2.0 mM MgCl₂, 5 µl of DNA (at concentration of 20 ng/µl) in a reaction volume of 25 µl, in triplicate. The program used 20 cycles performed with annealing temperature at 60°C, denaturation at 94°C and extension at 72°C, each step lasting 30 s, and another 29 cycles under the same conditions of denaturation and extension, with annealing temperature at 55°C; each step lasting 30 s, followed by 10 min of final extension at 72°C.

The amplified DNA was subjected to electrophoresis in 1% agarose gel, stained with ethidium bromide and observed under with UV (Vilber Lourmat, model TCP-20 LC).

2.4 DNA sequencing methods

The PCR products obtained by amplification of the 16S rDNA primers for *Pli* of 5 isolates of the RS state and 5 isolates of the PR state were purified using the kit PureLink Quick Gel Extraction (Invitrogen) and sequenced. To carry out the reaction were used primers *Pli*, buffer (1M Tris HCl, pH 9.0 and 50 mM MgCl₂) and the sequencing kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions, in a final volume of 10 µl. The analysis was performed on a 16 capillary sequencer, model ABI 3130xl (Applied Biosystems).

The sequences of the 16S rDNA were determined, and the BLAST algorithm (Altschul et al., 1990) was used to find homologous sequences. The calculation of the distance and the construction of the phylogenetic tree were carried out by the neighbor-joining method, with the help of the software MegaBACE version 3.1 (Kumar et al., 2004).

3. Results

Microbiological investigation for *P. larvae* was performed in 80 isolates originated from samples of different bee products. When microbial growth was observed on selective medium, the number of CFU was established and three colonies of each plate were selected on the basis of colony morphology (hyaline aspect, flat edges and flat center) and in the presence of a zone of proteolysis for confirmatory tests for reaction to catalase and Gram stain (Table 2). The behavior of these samples in the microbiological investigation did not differ from the other isolates, originated from samples of importation.

The molecular analysis of the isolates was carried out by PCR. The established protocol allowed definitive identification of *P. larvae* by observing the specific amplification of different regions of the 16S rDNA and a fragment of the metalloproteinase gene (Fig. 1). All isolates responded to this approach, showing the presence of fragments of the expected size by PCR with primers *Ple* (969 bp), *Pli* (572 bp) and *MpPl* (271 bp). The specificity of amplicons was verified by sequencing. No amplification was observed in the samples used as negative controls.

Phylogenetic analysis was developed with the 16S rDNA sequences obtained from isolates of suspected outbreaks in Brazilian states. These sequences were aligned with sequences of the following strains: *Paenibacillus brasiliensis* (D78476), *Paenibacillus glucanolyticus* (D885140), *Paenibacillus alvei* (X60604), *Paenibacillus koreensis* (AF130254), *Paenibacillus larvae* (AY030079), *Paenibacillus alginolyticus* (D78465), *Paenibacillus azotofixans* (AJ 251192) and *Paenibacillus polymyxa* (AY 3596370), obtained from the GenBank database (accession No. in parentheses). All *P. larvae* investigated in this study had 100% identity with the partial 16S rDNA sequence of *P. larvae* (AY030079).

4. Discussion

Results from the previously microbiological investigation were confirmed, and the presence of *P. larvae* observed by grown in selective medium. The most common discrepancy was on colony morphology. In this work was observed some degree of inconclusive results from phenotypical characteristics could be expected since different *P. larvae* genotypes may present differences in morphological and physiological characteristics (Genersch 2010).

Viable aerobic counts in honey are about 30-1200 CFU/g (Iurlina and Fritz 2005), although specific counts for *P. larvae* has not been frequently described. Antunez et al. (2004) found 0-890 CFU/g in honey samples from hives without clinical symptoms of AFB in Uruguay. The levels of *P. larvae* in adult bees in commercial colonies from western United States reached values of 324 and 408 CFU/30 adult bees for samples from California and Rocky Mountains, respectively (Eischen et al. 2005). Those authors estimate that more than 28,000 colonies had at least 1 disease equivalent number of *P. larvae* CFU (about 399 CFU/30 adult bees). Differences in infective threshold among lineages and queens have been reported, suggesting a genetic variance for larvae resistance against AFB (Behrens et al. 2007).

Molecular diagnosis may permit an early detection of the pathogen, before the clinical signs of the disease, in time to implement proper control measures. In addition, some samples showed inconclusive results in microbiological testing, thus molecular verification may provide security to the diagnosis (Bakonyi et al., 2003). As an example, PCR allowed to identify *P. larvae* in 91% of the honey samples, against 57% observed by cultural methods (Lauro et al. 2003).

Some methodologies for molecular diagnosis of *P. larvae* have been described. They are often based on PCR protocols associated to amplification of specific 16S rDNA sequences (Govan et al. 1999; Piccini et al. 2002; Ryba et al. 2009). The nested-PCR protocol was able to detect less than 6 CFU/ml when working with pure cultures of *P. larvae* (Lauro et al. 2003). In this work, the selected primers produced fragments of the expected sizes when tested with samples of *P. larvae*, while negative amplification was observed when tested with other bacterial species. The specificity of amplicons was also verified by sequencing, confirming that specific sequences of *P. larvae* genes were amplified. The PCR methods describe here proved to be consistent and relatively easy. The specific amplification of 16S rDNA or metalloproteinase genes is an alternative technique for a rapid and reliable detection of *P. larvae* spores and AFB diagnosis.

The strains tested, originated from the states of Rio Grande do Sul (RS) and Paraná (PR) showed 100% identity on the partial sequence of the 16S rDNA. These results are the first sequencing of strains of *P. larvae* that circulated in Brazil and show that these are highly correlated. The determination of partial nucleotide sequence of the 16S rDNA of the Brazilian isolates, and comparison with sequences deposited in GenBank database helps to ensure the specificity of the assay, confirming the identification of *P. larvae* in the country (MAPA 2006).

The high phenotypic and genotypic similarity among isolates of *P. larvae*, together with the fact that until now there was only one record of the presence of *P. larvae* in the state of Rio Grande do Sul and one outbreak notification in the state of Paraná, may indicate that this pathogen was recently introduced in Brazil and that bacterium was quickly controlled and extinguished in the country. Phenotypic and genotypic characterization of *P. larvae* isolated in the neighbor country Uruguay revealed high similarity (Antunez et al.

2007), while samples from Austria and Germany show higher genetic diversity (Loncaric et al. 2009, Peters et al. 2006).

This paper describes the utilization of conventional PCR reactions, based on the detection of 16S rDNA and metalloproteinase genes, to confirm the microbiological diagnosis of *P. larvae*. The phylogenetic analysis indicates that there is high homology among the strains that circulated in the country and shows that efficacy the strong control health deployed to prevent the introduction of the pathogen and its spread in the Brazilian territory, despite the evolution of the disease in South America in recent years (Alippi 1992; Antunez et al. 2004; MAPA 2006) indicates the need to detailed examination of the current situation of the presence of *P. larvae* in Brazil.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq, Brazil.

References

- Alippi, A.M., 1992. A comparison techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera*, in Argentina. J. Apicult. Res. 30, 75-80.
- Allipi, A.M., López A.C., Aguilar, M., 2002. Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American Foulbrood in honeybees, by using PCR and restriction fragment analysis of genes encoding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 68, 3655-3660.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman D.J., 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403-410.
- Antunez, K., D'Alessandro, B., Piccini, C., Corbella, E., Zunino, P., 2004. *Paenibacillus larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey. J. Invertebr. Pathol. 86, 56-58.
- Antunez, K., Piccini, C., Castro-Sowinski, S., Rosado, A.S., Seldin, L., Zunino, P., 2007. Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus larvae* isolates. Vet. Microbiol. 124, 178-183.
- Bakonyi, T., Derakhshifar, I., Grabensteiner, E., Nowotny, N., 2003. Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: comparison with isolation and biochemical characterization. Appl. Environ. Microbiol. 69, 1504-1510.
- Behrens, D., Forsgren, E., Fries, I., Moritz, R.F.A., 2007. Infection of drone larvae (*Apis mellifera*) with American foulbrood. Apidologie 38, 281-288.
- Dobbelaere, W., de Graf, D.C., Peeters, J.E., Jacobs, F.J., 2001. Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR. Apidologie 32, 363-370.

- Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K., Mattick J.S., 1991. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19, 4008.
- Eischen, F.A., Graham, R.H., Cox, R., 2005. Regional distribution of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae*, the causative organism of American Foulbrood, in honey bee colonies of the western United States. *J. Econ. Entomol.* 98, 1087-1093.
- Genersch, E., 2008. *Paenibacillus larvae* and American Foulbrood - long since known and still surprising. *J. Verbr. Lebensm.* 3, 429-434.
- Genersch, E., 2010. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S10-S19.
- Govan, V.A., Allsop, M.H., Davidson, S.A., 1999. PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2243-2245.
- Iurlina, M.O., Fritz, R., 2005. Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 297-304.
- Kilwinski, J., Peters, M., Ashiralieva, A., Genersch, E., 2004. Proposal to reclassify *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* DSM 3615 (ATCC 49843) as *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Results of a comparative biochemical and genetic study. *Vet. Microbiol.* 104, 31-42.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei M., 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5, 150-163.
- Lauro, F.M., Favaretto, M., Covolo, L., Rassa, M., Bertoloni, G., 2003. Rapid detection of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *Int. J. Food Microbiol.* 81, 195-201.

- Longaric, I., Derakhshifar, I., Oberlerchner, J.T., Köglberger, H., Moosbeckhofer, R., 2009. Genetic diversity among isolates of *Paenibacillus larvae* from Austria. *J. Invertebr. Pathol.* 100, 44-46.
- MAPA, 2006. Nota técnica DSA nº52/2006. Ocorrência de “Cria Pútrida Americana” no município de Quatro Barra, estado do Paraná-Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, Brasília, Brazil.
- OIE, 2009. American Foulbrood. In: Manual of standards for diagnostic tests and vaccines for lists A and B diseases of mammals, birds and bees. Office International des Epizooties, Paris, pp. 687-693.
- Peters, M., Kilwinski, J., Beringhoff, A., Reckling, D., Genersch, E., 2006. American Foulbrood of the honey bee: occurrence and distribution of different genotypes of *Paenibacillus larvae* in the administrative district of Arnsberg (North Rhine-Westphalia). *J. Vet. Med. B* 53, 100-104.
- Piccini, C., D’Alessandro, B., Antunez, K., Zunino, P., 2002. Detection of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae* spores in infected bee larvae and artificially contaminated honey samples by PCR. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 761-765.
- Ryba, S., Titera, D., Haklova, M., Stopka, P., 2009. A PCR method of detecting American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in winter beehive wax debris. *Vet. Microbiol.* 139, 193-196.
- Sambrook, J., Russel, D.W., 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schuch, D.M.T., Madden, R.H., Sattler A., 2001. An improved method for the detection and presumptive identification of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in honey. *J. Apicult. Res.* 40, 59-64.

- Schuch, D.M.T., Tochetto, L.G., Sattler, A., 2003. Relato do primeiro isolamento oficial de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* no Brasil em colméia sem sinais clínicos de Cria Pútrida Americana. *Pesq. Agropec. Bras.* 38, 441- 444.
- Shimanuki, H., Knox, D.A., Furgala B., Caron, D.M., Williams, J.L., 1992. Diseases and Pests of Honey Bees. In: Graham, J.M. (Ed.), *The hive and the honey bee*, Dadant & Sons Inc., Illinois, pp.1083-1151.

Table 1. Primers used for amplification of 16S rDNA and metalloproteinase genes.

Primer	Sequence (5'→3')	Reference
<i>Ple</i> (F)	TCGAGCGGACCTTGTGT	Lauro et al. 2003
<i>Ple</i> (R)	CTATCTCAAACCGCTCAGAG	Lauro et al. 2003
<i>Pli</i> (F)	CTTCGCATGAAGAAGTCATC	Lauro et al. 2003
<i>Pli</i> (R)	TCAGTTATAGGCCAGAAAGC	Lauro et al. 2003
<i>MpPl</i> (F)	CGGGCAGCAAATCGTATTCAG	Kilwinski et al. 2004
<i>MpPl</i> (R)	CCATAAAGTGTTGGGTCCTCTAAG	Kilwinski et al. 2004

Table 2. Microbiological reevaluation of *Paenibacillus larvae* isolated from honey, honeycomb and pollen samples.

Sample	n	Colony morphology		Catalase reaction		Mean	Result	%
		Typical	Atypical	Negative	Positive	CFU/g		
Honey	37	37	-	37	-	9	Positive	46.25
Honeycomb	35	33	-	33	-	4.5	Positive	41.25
		-	2	2	-	2.5	Inconclusive	2.50
Pollen	8	7	-	7	-	9.5	Positive	8.75
		-	1	-	1	13	Inconclusive	1.25
Total	80	77	3	79	1			100

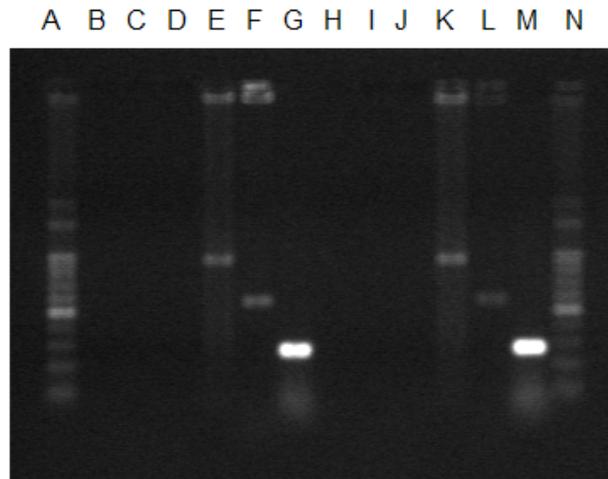


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products of *Ple*, *Pli* (16S rDNA) and *MpPl* primers. *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 (B,C, 16S rDNA; D, metalloproteinase); *Paenibacillus larvae* ATCC 9545 (E,F, 16S rDNA; G, metalloproteinase), *Paenibacillus alvei* (H, I, 16S rDNA; J, metalloproteinase); *Paenibacillus larvae* (K,L, 16S rDNA; M, metalloproteinase); A,N, 100 bp ladder.

3. CAPÍTULO 3

3.1 Detection of *Paenibacillus larvae* by real-time PCR

Artigo aceito para publicação na Revista Acta Scientia Veterinariae

Detection of *Paenibacillus larvae* by real-time PCR

Detecção de *Paenibacillus larvae* por PCR em tempo real

Sérgio Salla Chagas^{1,2}, Rodrigo Almeida Vaucher³, Adriano Brandelli^{1,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970 Porto Alegre, Brasil; ²Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/RS), Estrada da Ponta Grossa 3036, Porto Alegre, Brasil; ³Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, Brasil. CORRESPONDÊNCIA: A. Brandelli [abrand@ufrgs.br; fax: (51) 3308 7048].

ABSTRACT

Background: *Paenibacillus larvae* is the agent of the American Foulbrood disease (AFB), which may determine the death of the hive. The detection strategy for its diagnosis is based on clinical signs of disease and isolation and identification of *P. larvae*, which usually employ microbiological and biochemical methods. Recently, molecular methods based on analysis of 16S rDNA by conventional PCR have been adopted, providing greater security and analytical speed. The rapid diagnosis is important to minimize economic losses and assess routes of spread of the pathogen. Despite the strong existing sanitary control, *P. larvae* was recently identified in the Brazilian states of Rio Grande do Sul and Paraná, after that outbreaks have been reported in neighboring countries. This investigation was

conducted to develop a protocol for detection of *P. larvae* by real-time PCR, allowing the reduction in the time of diagnosis, without loss of robustness found in the conventional PCR methods.

Materials, Methods & Results: Twenty-nine (29) *P. larvae* strains were evaluated by real-time PCR using SYBR Green. The primers *Pltr*-F/R were designed according to the sequence X60619 of 16S rDNA gene published in GenBank, to amplify a fragment of 74 base pairs. The target gene is highly conserved and specific to *P. larvae*. The amplification conditions consisted of 1 cycle of 50°C for 2 minutes and 1 cycle of 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. The best results of sensitivity and specificity in the reaction with SYBR Green were obtained with primer concentration set as 100 µM. The different concentrations of MgCl₂ tested did not affect the performance of the reaction. No amplification was observed with DNA obtained from *Paenibacillus alvei* or *Bacillus* species. The limit of detection was set as 6 pg of DNA template. The regression analysis of the C_T values of the PCR products showed a linear relationship between the initial amounts of DNA template and the values of C_T ($R^2 = 0.9982$).

Discussion: The protocol developed allowed the unequivocal identification of *P. larvae*, as all strains were detected by this approach. The amplification of the expected 16S rDNA gene fragment was verified by amplification with the primers *Pltr* F/R. In addition, the amplicon specificity was verified by sequencing and no amplification was observed when the primers were tested with DNA from other bacterial species, indicating that the test is highly precise. The protocol developed in this study proved to be sensitive and specific, providing a rapid and accurate diagnostic tool. The results showed that the analysis by real-time PCR of partial 16S rDNA gene of *P. larvae* represents an important alternative for

rapid diagnosis of AFB disease. The use of this methodology may represent an advance for rapid confirmation of the presence of this bacterium, what will allow the adopting of control measures against AFB, that on avoid its spreading in Brazilian territory.

Keywords: *Paenibacillus larvae*, diagnosis, 16S rDNA, real-time PCR.

Descritores: *Paenibacillus larvae*, diagnóstico, 16S rDNA, PCR em tempo real.

INTRODUCTION

The "American Foulbrood" (AFB) is a notifiable disease of high economic importance. His causative agent called *Paenibacillus larvae* only attacks the larval stage of the bee *Apis mellifera* and other *Apis* spp [6,21]. Infection occurs by ingestion of honey contaminated with spores [2,14], that after 24 hours germinate in the intestine and spread, producing septicemia and death [6]. The clinical symptoms of the disease are typical, and the affected larvae have dark and viscous aspect [6,20]. Bees from infected hives and even beekeepers can contribute to the spread of the disease. The detection of *P. larvae* is performed using microbiological culture [18], phenotypical characteristics [9,13], or molecular diagnostic methods based on comparative analysis of sequences of the 16S rDNA gene [5,7,10].

In South America, the first isolation of *P. larvae* occurred in 1989 in Argentina [1], and afterwards in Uruguay [4]. In Brazil, despite efforts to prevent its introduction, *P. larvae* was detected in 2002 in the State of Rio Grande do Sul, in beehives without clinical signs of disease [19]. Recently it was reported an outbreak in hives in the State of Paraná [12], suggesting a route of disease distribution and motivating the development of alternative detection methods. Molecular methods based on the detection of *P. larvae* by

PCR have been described [7,10], including a real-time PCR procedure [8]. Real-time PCR is characterized by its high accuracy and reproducibility, and precision in data collection depends on factors such as the PCR conditions, sample preparation and quality of DNA [22]. In contrast to conventional PCR, which is based on amplification of DNA with subsequent electrophoresis and visualization, real-time PCR is automated, highly sensitive, robust and does not require procedures for post-PCR identification [11].

This study aimed to develop a protocol for detection of *P. larvae* by real-time PCR to allow the reduction in the time of diagnosis, without loss of robustness found in the reactions by conventional PCR.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

In this study, 28 samples of *Paenibacillus larvae* from the collection of National Agricultural Laboratory (LANAGRO/RS) were used. *P. larvae* ATCC 9545 was used as positive control, and *Paenibacillus alvei*, *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778, and *Bacillus anthracis* Sterne were used as negative controls. Samples of *P. larvae* and *P. alvei* were grown on *P. larvae* agar plates [18], incubated at 35°C and monitored for 5 days. *B. cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 was cultivated in BHI, incubated at 37°C and monitored for 5 days.

Primers

The forward primer (*Pltr*-F 5'GGAGTGACGGTACTTGAGAAGAAAG3') and reverse (*Pltr*-R 5'CGCTTGCCCCCTACGTATTA3') were selected according to the sequence X60619 of 16S rDNA gene published in GenBank, with the help of the software

Primer Express¹. The target gene is highly conserved and specific to *P. larvae*. The primers amplified a fragment of 74 base pairs.

The specificity of the primers was also verified by comparing the partial sequence of the 16S rDNA of *P. larvae* with the sequences of other organisms listed in Table 1 using the BLAST algorithm [3], and by reaction with DNA extracted from the other bacterial species used as controls.

Preparation of DNA

A colony was isolated from each sample was suspended in 100 µL of distilled water and subjected to the DNA extraction protocol for bacteria by using phenol-chloroform [17]. The DNA was resuspended in 50 µL of buffer consisting of 10 mM Tris/HCl pH 8.0, containing 1 mM EDTA, and quantified using a UV spectrophotometer² at wavelengths of 260 and 280 nm.

Real-time PCR

Twenty-nine (29) *P. larvae* strains were used to evaluate the performance of real-time PCR using SYBR Green¹. The amplification conditions consisted of 1 cycle of 50°C for 2 minutes and 1 cycle of 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. The fluorescence was monitored during the annealing at 60°C. The reactions were conducted in an equipment 7500 Real Time PCR System using SYBR Green PCR master mix¹ containing 2X Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG. The concentrations of primers tested were 1, 10 and 100 µM, and different concentrations of MgCl₂ (0, 1.0, 2.0 and 3.0 mM) in a final volume of 50 µL, 25 µL and 15 µL, containing 5 µL of sample, were tested.

The analysis of the *melting* curve (T_M) was made based on a 95°C for 15 seconds and 60°C for 20 seconds and one cycle with temperature ranging between 60°C and 95°C for 20 minutes.

To determine the sensitivity of the reaction, *P. larvae*, in the concentration of 10^5 CFU/mL, had their DNA extracted, sequentially diluted to the quantity of 0.6 pg and subjected to analysis by real-time PCR in the same conditions of the other samples.

RESULTS

In the evaluation of different amounts of primers *Pltr* F/R, the best results of sensitivity and specificity in the reaction with SYBR Green were obtained with 100 μ M. The reaction was optimized and the reaction mix was composed of 1.5 μ L of DNA, 7.5 μ L of SYBR Green Platinum qPCR Supermix-UDG (2X), 0.03 mL of Rox, 100 μ M of each forward and reverse primer, a final volume of 15 μ L. The different concentrations of $MgCl_2$ tested did not affect the performance of the reaction. The detection of 16S rDNA gene was proven by amplification of fragments of expected sizes when the primers *Pltr* F/R were tested with samples of *P. larvae*. The specificity was verified by sequencing.

Amplification occurred only for samples of *P. larvae*. In the other species tested, no amplification was observed.

The reaction was optimized using 60 ng of purified DNA per reaction. In the 29 samples that were amplified by this approach, detection of the product resulting from amplification of partial 16S rDNA gene occurred in the C_T 20 (mean 19.5 ± 0.4). In establishing the limit of detection (LOD), initial quantities of *P. larvae* chromosomal DNA template were serially diluted 10-fold from 60 ng until 0.6 pg. DNA at a concentration of 60 ng was detected in 18 C_T . Consecutive dilutions resulted readings of fluorescence in C_T

21, 24, 27 and 30, showing a linear relationship with the DNA amount in the range of 60 ng to 6 pg (Figure 1). LOD was established as 6 pg.

After amplification, the analysis of dissociation products PCR was performed. The specificity of the primers and the absence of nonspecific products can be observed in the analysis of the melting curve. The values of the melting temperature were between 83.2°C and 83.9°C. No amplification ($C_T \geq 40$) was observed with DNA obtained from *Paenibacillus alvei* or from other *Bacillus* species. It was found that the melting temperature was $83.3^\circ\text{C} \pm 0.5$ for the gene fragment 16S rDNA, confirming the specificity of the reaction (Table 2). The results confirm that the test developed with SYBR Green is 100% specific, detecting only strains of *P. larvae*.

DISCUSSION

In the present study, a real-time PCR protocol was developed, allowing the unequivocal identification of *P. larvae*. The results of PCR reactions also demonstrated the high sensitivity of the protocol developed for detection of *P. larvae*, since amplification of chromosomal DNA was observed in all dilutions tested.

The results agreed with those observed by conventional diagnosis, confirming the expected observations for *P. larvae* [19]. The real-time PCR protocol developed for the detection of *P. larvae*, adjusted to allow its maximum performance, indicates that the time for diagnosis of AFB could be reduced as compared with conventional PCR methodologies (Table 3). In addition, real-time PCR is about 100 times more sensitive than conventional PCR methods [16,22], which need post-PCR steps for product evaluation. Some conventional PCR protocols for identification of *P. larvae* have been described in the past decade. Those methods are often based on detection of 16S rDNA sequences, using *P.*

larvae from pure cultures, larvae, adult bees and inoculated honey [2,5]. Some protocols shown elevated specificity and allow detection of *P. larvae* below pathogenic levels [10]. The PCR protocol using the primers *Pl4* and *Pl5*, which amplify a 700 bp sequence of 16S rDNA, allows the detection of the PCR product at a 10^{-2} dilution of template DNA obtained from 32 spores [15]. However, no similar study to detect *P. larvae* by real-time PCR was conducted to date. Recently, a microchip-based real-time PCR technique, using a thermal cycler specially designed to withstand microvolume reaction and conducted in glass and silicon microchips, was effectively used to detect *P. larvae* [8] in 8 minutes in a volume of 6.0 μ L. These are some fundamental differences in comparison with the protocol presented in this work, which used standard real-time PCR equipment.

The ability to test real-time PCR to determine the precise number of copies of DNA present in the sample depends on the linearity and efficiency of the test. The values of $R^2 = 0.9982$ obtained with SYBR Green indicates that the test is highly linear. In addition, the estimated value of the slope of the linear regression (slope -3.2509) is similar to the theoretical optimum of -3.32 using purified DNA and calibrated cell suspensions [11].

The regression analysis of the C_T values from the products of real-time PCR shows a linear relationship between the initial amounts of template and the values of C_T ($R^2 = 0.9982$), which increased as the DNA concentration decreased. All products are considered identical, as can be evidenced by analysis of melting temperature, because the temperature variation between them is small and there are no particular products [22]. The lowest amount of analyte that can be detected (LOD), but not necessarily quantified, was set as 6 pg of DNA template. Since the infected larvae usually die from the AFB disease with about 10^9 bacterial spores/ml [6], this LOD value might be acceptable for the application on

environmental honeybee larva samples and the methodology might be capable to detect the pathogen in the early stage of the infection.

CONCLUSIONS

The real-time PCR protocol developed in this study proved to be sensitive and specific, providing a rapid and accurate diagnostic tool. The primers *Pltr* F/R enable the specific amplification of a 16S rDNA sequence of *P. larvae* in 54 minutes, with a detection limit of 6 pg of chromosomal DNA per reaction. This methodology may be useful to a rapid confirmation of the presence of *P. larvae*, allowing the adoption of prophylactic control measures against AFB, that can avoid its dissemination in Brazilian territory.

INFORMATIVE NOTES

¹Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.

²Specord 40, Analytik Jena, Jena, Germany.

REFERENCES

- 1 **Allipi A.M. 1992.** A comparison techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera*, in Argentina. *Journal of Apicultural Research*. 30:75-80.
- 2 **Allipi A.M., López A.C. & Aguilar, M. 2002.** Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp.*larvae*, the cause of American Foulbrood in honeybees, by using PCR and restriction fragment analysis of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:3655-3660.
- 3 **Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J. 1990.** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215:403-410.
- 4 **Antunez K., D'Alessandro B., Piccini C., Corbella E. & Zunino P. 2004.** *Paenibacillus larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey. *Journal of Invertebrate Pathology*. 86:56-58.
- 5 **Bakonyi T., Derakhshifar I., Grabensteiner E. & Nowotny, N. 2003.** Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: comparison with isolation and biochemical characterization. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:1504-1510.
- 6 **Genersch E. 2010.** American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103:S10-S19.
- 7 **Govan V.A., Allsop M.H. & Davidson S.A. 1999.** PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:2243-2245.
- 8 **Han S.H., Lee D.W., Kim E.H. & Yoon B.S. 2008.** Ultra-rapid real-time PCR for the detection *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood (AFB). *Journal of Invertebrate Pathology*. 99:8-13.

- 9 Kilwinski J., Peters M., Ashiralieva A. & Genersch, E. 2004.** Proposal to reclassify *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* DSM 3615 (ATCC 49843) as *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Results of a comparative biochemical and genetic study. *Veterinary Microbiology*. 104:31-42.
- 10 Lauro F.M., Favaretto M., Covolo L., Rassu M. & Bertoloni G. 2003.** Rapid detection of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *International Journal of Food Microbiology*. 81:195-201.
- 11 Martínez-Blanch J.F., Sánchez G., Garay E. & Aznar R. 2009.** Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. *International Journal of Food Microbiology*. 135:15-21.
- 12 Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. 2006.** Nota técnica DSA nº52/2006. Ocorrência de “Cria Pútrida Americana” no Município de Quatro Barras, Estado do Paraná, Brasil.
- 13 Nuendorf S., Hedtke K., Tangen G. & Genersch E. 2004.** Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen. *Microbiology*. 150:2381-2390.
- 14 Office International des Epizooties. 2009.** American Foulbrood. In: *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for lists A and B diseases of mammals, birds and bees*. Paris: OIE. pp. 687-693.
- 15 Piccini C., D’Alessandro B., Antunez K. & Zunino P. 2002.** Detection of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae* spores in naturally infected bee larvae and artificially contaminated honey by PCR. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 8:761-765.

- 16 Rebrikov D.V. & Trofinov D.Y. 2006.** Real-time PCR: a review of approaches to data analysis. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 42:455-463.
- 17 Sambrook J. & Russel, D.W. 2001.** Molecular Cloning: *a laboratory manual*. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 18 Schuch D.M.T., Madden R.H. & Sattler A. 2001.** An improved method for the detection and presumptive identification of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores in honey. *Journal of Apicultural Research*, 40:59-64.
- 19 Schuch D.M.T., Tochetto, L.G. & Sattler A. 2003.** Relato do primeiro isolamento oficial de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* no Brasil em colméia sem sinais clínicos de Cria Pútrida Americana. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 38:441-444.
- 20 Shimanuki H. & Knox, D.A. 1991.** American Foulbrood. In: *Diagnostic of Honey Bee Diseases*. Beltsville:USDA/ARS. (Agriculture Handbook Number 690). pp.4-12.
- 21 Shimanuki H., Knox, D.A., Furgala B., Caron D.M. & Williams J.L. 1992.** Diseases and Pests of Honey Bees. In: J.M.Graham (Ed). *The Hive and the Honey Bee*. Illinois. Dadant & Sons Inc. pp.1083-1151.
- 22 Sun F., Wu D., Qui A., Jin M., Wang X. & Li J. 2010.** Development of real-time PCR systems basead of SYBR Green for the specific detection and quantification of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula. *Food Control*. 21:487-491.

Table 1. Sequences of 16S rDNA used to confirm the specificity of primers *Pltr* F/R by means of BLAST algorithm.

Organism	GenBank accession number	16S rDNA length (bp)
<i>Paenibacillus larvae</i>	AY030079	1389
<i>Paenibacillus peoriae</i>	D78476	1437
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	D88514	1414
<i>Paenibacillus alvei</i>	X60604	1434
<i>Paenibacillus koreensis</i>	AF130254	1536
<i>Paenibacillus aliginolyticus</i>	D78465	1424
<i>Paenibacillus azotofixans</i>	AJ251192	1484
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	AY359637	1440

Table 2. Sensitivity of the primers *Pltr* F/R for detection of *Paenibacillus larvae* by real-time PCR.

DNA amount (ng)	C _T (cycle) ^a	T _m (°C) ^b
60	18	83.3
6	21	83.6
0.6	24	83.6
0.06	27	83.2
0.006	30	83.9

^a The threshold cycle.

^b The melting temperature of amplicon.

Table 3. Comparison of detection of *Paenibacillus larvae* by conventional PCR and real-time PCR based on amplification of 16S rDNA sequences.

Primer ^a	Sequence 5'→3'	Amplicon	PCR type	Running time (min)	Reference
<i>Prim1,2F</i>	AAGTCGAGCGGACCTTGTGTTTC	973	Conventional ^b	86	[7]
<i>Prim1,2R</i>	GGAGACTGGCCAAAACCTCTATCT				
<i>PleF</i>	TCGAGCGGACCTTGTGT	969	Nested-PCR ^c	160	[10]
<i>PleR</i>	CTATCTCAAAACCGCTCAGAG				
<i>PliF</i>	CTTCGCATGAAGAAGTCATC	572			
<i>PliR</i>	TCAGTTATAGGCCAGAAAGC				
<i>PltrF</i>	GGAGTGACGGTACTTGAGAAGAAAG	74	Real-time ^d	54	Present
<i>PltrR</i>	CGCTTGCCCCCTACGTATTA				article

^a F and R correspond to the forward and reverse primers, respectively.

^b The PCR conditions were 95°C (1 min), 30 cycles 93°C (1 min), 55°C (30 s), 72°C (1 min), and 72°C (5 min).

^c For the amplification of external primers *Ple* the annealing temperature was lowered 0.5°C/cycle, from 69 to 59°C, with each annealing step lasting 30 s. Denaturation and extension steps were all executed at 94°C (30 s) and 72°C (45 s), respectively. Cycling conditions for internal primers *Pli* were 94°C (30 s), 59°C (30 s), 72°C (45 s) for 30 cycles followed by 5 min at 72°C.

^d The PCR conditions were 50°C (2 min), 95°C (2 min), 40 cycles 95°C (15 s), 60°C (1 min).

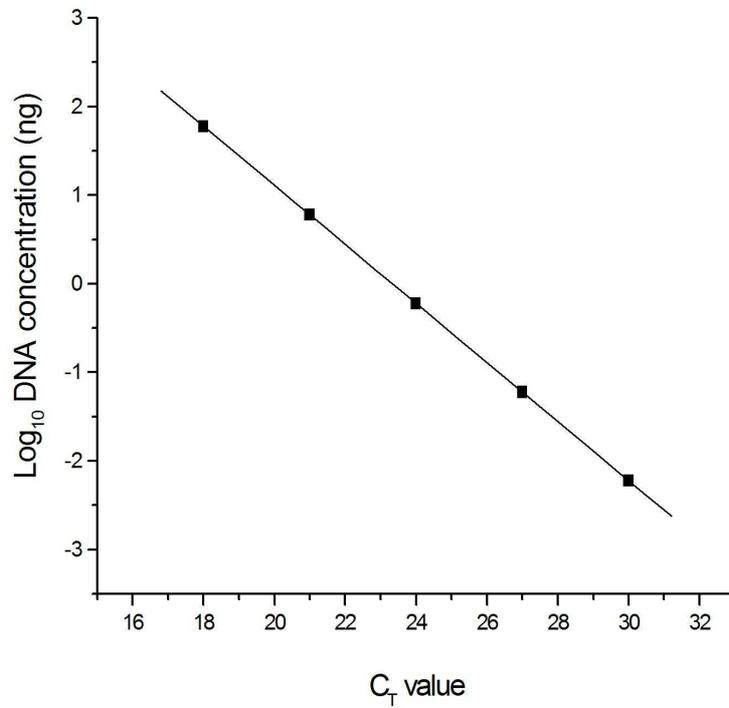


Figure 1. Relationship between serial dilutions of chromosomal DNA from *Paenibacillus larvae* ATCC 9545 and the threshold cycle. The C_T values increased in proportion to initial DNA template quantities in the range of 60 ng - 6 pg. Data were subjected to linear regression analysis. The correlation coefficient (R^2) was 0.9982.

4. DISCUSSÃO

Devido à escassa informação sobre a presença de *P. larvae* no Brasil (MAPA, 2006); uma vez que os dados existentes estavam restritos a relatos de suspeita de focos de CPA e a avaliação de produtos apícolas (SATTLER et al., 1993; SCHUCH et al., 2002), e pela impossibilidade de obter novos isolamentos; o estudo foi concentrado em amostras coletadas anteriormente e com resultado confirmado.

Neste trabalho foram reavaliadas as características morfológicas e fisiológicas de *P. larvae*, e estudadas algumas características genotípicas dos isolados disponíveis.

Análises microbiológicas e por PCR

As características evidenciadas pela coloração de Gram estão de acordo com o estabelecido por Bailey (1984) e Gordon et al. (1973). Todas as amostras apresentaram-se como bastonetes Gram-positivos, com esporos sub-terminais deformando o corpo bacilar, com escassos esporos livres, corados fracamente. Alguns isolados produziram catalase, degradando o peróxido de hidrogênio, e confundindo o diagnóstico. Tal fato concorda com o que foi referido por Ash et al. (1993) e Kilvinskyi (2004), ao solicitar a reclassificação de *P. larvae*. No presente estudo, 1,2% das amostras manifestaram esta característica, apresentando atividade da catalase em diferentes intensidades (de forte a muito fraca).

Também foram observadas colônias com morfologia atípica, o que sugere variabilidade, uma vez que diferentes genótipos de *P. larvae* podem apresentar diferenças em suas características fenotípicas (GENERSCH, 2010). Todos os isolados apresentaram halo de proteólise em agar leite suplementado com tiamina, concordando com o estabelecido por Neuendorf et al. (2004).

Normalmente isolados de *P. larvae* levam pelo menos 48 horas para degradar a caseína, mas alguns isolados já apresentavam halo de proteólise a partir de 18 h de

incubação, o que pode indicar uma maior capacidade de agressão por parte destas linhagens.

No Brasil não houve novas ocorrências de CPA além dos dois casos reportados: um caso de presença de esporos em colméias com sinais clínicos da doença (MAPA, 2006) e outro caso de presença de esporos em colméias sem sinais clínicos da doença (SCHUCH, 2003). Diferentes fatores, como as linhagens das abelhas rainhas brasileiras podem estar envolvidos na resistência ao patógeno. Faltam estudos para confirmar esta possibilidade, apesar de claros indícios de que um dos fatores de resistência contra CPA é a variabilidade genética da larva (BEHRENS et al., 2007).

Já foi demonstrado que produtos apícolas com baixas contagens de esporos não conferem segurança quanto ao controle da bactéria. Del Hoyo (1996), Genersch (2005) e Godwin & Haine (1998) indicam que pode levar anos entre a introdução de esporos de *P. larvae* na colméia e a identificação dos primeiros sinais clínicos (SANFORD, 1996), e que a relação entre carga bacteriana e expressão da doença deve-se principalmente a fatores como virulência da linhagem de *P. larvae* e resistência da colméia, dentre outros (EVANS & ARMSTRONG, 2006; HANSEN, 1986).

A identificação microbiológica é o padrão recomendado pela OIE (2009) para a detecção de *P. larvae*. Como o critério de aceitação brasileiro para mel e produtos apícolas é a ausência de *P. larvae* na amostra, e os resultados são expressos em termos qualitativos, existe pouca informação disponível sobre este aspecto. Neste trabalho, as amostras estudadas apresentavam resultado positivo para a presença de esporos de *P. larvae*, e foram reavaliadas, sendo determinado o número de UFC de *P. larvae* por grama de amostra.

Em estudos conduzidos por Iurlina & Fritz (2005), e Lauro et al. (2003), havia a indicação de que apenas em aproximadamente 60% das vezes *P. larvae* era detectado por métodos microbiológicos. Estas observações são totalmente divergentes do observado neste trabalho, provavelmente em função da metodologia utilizada (NORDSTRON & FRIES, 1995) por eles, e da maior sensibilidade do método utilizado neste estudo, capaz de detectar 5,5 esporos por grama de mel.

Neste estudo, após a realização da etapa de avaliação microbiológica, todas as amostras foram submetidas a análises moleculares pela técnica da PCR. A indicação das vantagens na utilização da PCR convencional, em comparação com os métodos microbiológicos e bioquímicos clássicos, foram confirmadas. Sua precisão e sensibilidade confere segurança ao diagnóstico; concordando com as observações de Korimbocus (2002) e Munford (2000).

No protocolo utilizado na PCR convencional, um dos genes alvo era o da metaloprotease. Todas as linhagens brasileiras responderam a amplificação deste gene, com a produção de um fragmento com 271 pares de bases, concordando com o tamanho do fragmento descrito por Kilwinski (2004). Num estudo recente, Antunez et al. (2009), descrevem diferentes proteínas secretadas por *P. larvae*, e entre elas a presença de metaloproteases, que é uma protease relacionada com a virulência da bactéria e a infecção da larva, sugerindo a existência de um complexo mecanismo de interação patógeno-hospedeiro na instalação da doença CPA.

Como segunda parte deste trabalho, foi desenvolvido um protocolo de diagnóstico de *P. larvae* baseado na detecção do gene 16S rDNA por PCR em Tempo Real.

Utilizando um equipamento standard de PCR em Tempo Real obtivemos uma redução de 66,25% no tempo de diagnóstico, em comparação com as metodologias para PCR convencional propostas por Govan et al. (1999) e Lauro et al. (2003); enquanto a sensibilidade da reação pode ser até 100 vezes maior, segundo Rebrikov & Trofinov (2006) e Sun et al. (2010).

Os resultados obtidos foram comparados com o protocolo apresentado por Han et al. (2008), que utilizou técnicas de microship para PCR em Tempo Real num termociclador especialmente desenvolvido para microvolumes de reação, obtendo a detecção de *P. larvae* em 8 minutos; e indicando que a otimização do protocolo, o volume da reação e o equipamento utilizado são alguns dos fatores que determinam o tempo de corrida e a detecção de *P. larvae*, concordando com trabalhos de Wherle et al. (2009).

Após a amplificação pela PCR em tempo real, a análise de dissociação (T_M) dos produtos obtidos foi realizada, confirmando a especificidade da reação.

Os valores da temperatura de “melting” estiveram entre 83,2°C e 83,9°C. Como todos os fragmentos do gene 16S rDNA dissociaram-se na mesma faixa de temperatura, comprovou-se que não há produtos inespecíficos e todos os fragmentos podem ser considerados idênticos, concordando com os trabalhos de Martinez-Blanch et al. (2009) e Sun et al. (2010).

Análise filogenética

A análise filogenética foi realizada com as seqüências 16S rDNA obtidas de isolados brasileiros, e estas apresentaram 100% de identidade com a seqüência parcial 16S rDNA de *P. larvae* depositada no banco de dados GenBank (nº de acesso AY030079) (BAKONYI et al., 2003).

Os resultados, que confirmam a identificação de *P. larvae* no país (MAPA, 2006; SCHUCH et al., 2003), são o primeiro seqüenciamento das linhagens que circularam no Brasil, e demonstram que estas são altamente correlacionadas.

Ao contrário do observado neste trabalho, estudos realizados por autores como Genersch (2005) tem evidenciado a diversidade das linhagens européias, as quais apresentam diferentes virulências; informando que ao se estabelecer a doença existe a tendência de que a linhagem mais virulenta acabe predominando sobre as demais. Recentemente, Longaric et al. (2009) relataram a presença de diferentes genótipos em colméias doentes, contrariando as observações anteriores.

Para completar este estudo, e aumentar as informações referentes a genotipificação das linhagens brasileiras, foi avaliado o perfil do gene 16S rDNA submetido a diferentes enzimas de restrição, que é uma ferramenta de fácil execução e baixo custo operacional, apresentando satisfatório índice de discriminação.

Avaliação de *P. larvae* utilizando enzimas de restrição

Como os isolados de *P. larvae* apresentaram grande similaridade nos ensaios anteriores, diferentes enzimas de restrição foram utilizadas para prospectar um possível polimorfismo dos fragmentos resultantes da amplificação do gene parcial 16S rDNA, e realizar a discriminação necessária.

Entretanto, pouca diversidade foi encontrada, uma vez que um número reduzido de fragmentos de restrição foi verificado (APÊNDICE), sugerindo que provavelmente uma única linhagem clonal de *P. larvae* tenha circulado no país. Torpdahl & Ahrens (2004), alertam para o fato de que a observação de resultados semelhantes, contendo um número reduzido de fragmentos de restrição, apesar de facilitar a análise pode equivocadamente sugerir a presença de linhagens clonais.

Os estudos realizados com diferentes enzimas de restrição, e a comparação com o gene 16S rDNA sugerem que os isolados são fortemente relacionados, e que houve a circulação de um genótipo predominante de *P. larvae* no Brasil.

Ao contrário de trabalhos anteriores (ALIPPI et al., 2002; ANTUNEZ et al., 2004; NEUENDORF et al., 2004) que estudaram um fragmento de 969 pares de bases (GOVAN et al., 1999), neste estudo avaliou-se o perfil de restrição sobre o produto de 572 pares de bases, localizado internamente ao fragmento estudado por aqueles pesquisadores.

O uso das enzimas de restrição *XbaI*, *HindIII*, *EcoRI*, *NcoI*, *BanHI*, *BglI*, *PstI*, *SalI* (Invitrogen), gerou fragmentos semelhantes, com 400 pares de bases (APÊNDICE). Estes diferem dos obtidos com as enzimas *SmaI* e *EcoRV*, as quais diferem entre si. A restrição com a enzima *SmaI* gerou um fragmento com 260 pares de bases, e com a enzima *EcoRV*, um fragmento com 320 pares de bases.

Os fragmentos gerados pelas enzimas *HindIII* (ALIPPI et al., 2002) e *EcoRI* apresentam concordância com resultados anteriores (DON et al., 1991). A região do gene 16S rDNA, digerida separadamente com as 10 diferentes enzimas, gerou apenas um fragmento; sendo que oito enzimas de restrição geraram fragmentos idênticos, ao contrário

do demonstrado por Neuendorf et al. (2004). Estas observações não são suficientes para indicar a presença de polimorfismo, pois todas as amostras apresentaram o mesmo perfil considerando cada enzima de restrição utilizada. Uma alternativa seria utilizar técnicas como ERIC-, REP- e BOX-PCR, ou avaliar uma região maior do gene parcial 16S rDNA. O uso de outras enzimas de restrição pode colaborar na diferenciação entre as linhagens de *P. larvae* (ALIPPI, 1992).

Considerações finais

Por ser um patógeno amplamente distribuído, é difícil identificar a fonte de contaminação por *P. larvae*. A aplicação de técnicas fenotípicas e genotípicas pode permitir acompanhar a disseminação da bactéria, caracterizar linhagens virulentas e buscar possíveis reservatórios naturais. Indicações da rota de disseminação da doença no Cone Sul, a partir do Rio da Prata, foram apontadas por Antunez et al. (2004).

A escassa circulação de *P. larvae* no Brasil, a grande similaridade observada entre as características dos isolados estudados, a alta homologia na região do gene 16S rDNA e a ausência de novas notificações sugerem que a doença foi recentemente introduzida e rapidamente controlada, e que a bactéria foi extinta no país.

5. CONCLUSÕES

- Nas condições avaliadas neste trabalho verificou-se grande similaridade fenotípica e genotípica entre as linhagens de *P. larvae* que circularam no Brasil.
- A técnica de PCR em Tempo Real possibilita a detecção de *P. larvae* a partir de 6,0 ng de DNA cromossomal, reduzindo em 66,25% o tempo de reação, em comparação com a PCR convencional.
- A capacidade de detecção de *P. larvae* por PCR em Tempo Real foi superior as técnicas de PCR convencional e caracterização microbiológica.
- A presença de um genótipo predominante, provavelmente originado de uma linhagem clonal, sugere pontos comuns na cadeia de transmissão de *P. larvae*.

REFERÊNCIAS

ALIPPI, A.M. Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium. **Microbiología SEM**. v.11, p.343-350, 1995.

ALIPPI, A.M. A comparison techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera*, in Argentina. **Journal of Apicultural Research**. v.30, n.2, p.75-80, 1992.

ALIPPI, A.M.; LÓPEZ A.C.; AGUILAR, M. Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp.*larvae*, the cause of American Foulbrood in 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.

ALTSCHUL S.F.; GISH W.; MILLER W.; MYERS E.W.; LIPPMAN D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. v.215, p.403-410, 1990.

ANTUNEZ, K.; ANIDO, M.; SCHLAPP, G.; EVANS, J.D.; ZUNINO, P. Characterization of secreted proteases of *Paenibacillus larvae*, potential virulence factors involved in honeybee larval infection. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.102, p.129-132, 2009.

ANTUNEZ K.; D'ALESSANDRO B.; PICCINI C.; CORBELLA E.; ZUNINO P. *Paenibacillus larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.86, n.2, p.56-58, 2004.

ANTUNEZ, K.; PICCINI, C.; CASTRO-SOWINSKI, S.; ROSADO, A.S.; SELDIN, L.; ZUNINO, P. Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus larvae* isolates. **Veterinary Microbiology**. v.124, p.178-183, 2007.

ASH, C.; PRIEST, F.G.; COLLINS, M.D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrows, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. **Antoine van Leeuwenhoek**. v.64, p.253-260, 1993.

BACH, H.J.; HARTMANN, A.; SCHLOTTER, M. & MUNCH, J.C. PCR primers and functional probes for amplification and detection of bacterial genes for extracellular peptidases in single strains and in soil. **Journal of Microbiological Methods**. v.44, p.173-182, 2001.

- BAILEY, L. **Loque Americano**. In: Patologia de las Abejas. Ed. Acribia, Zaragoza. p.29-34, 1984.
- BAKONYI T.; DERAKHSHIFAR I.; GRABENSTEINER E.; NOWOTNY, N. Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: comparison with isolation and biochemical characterization. **Applied Environmental Microbiology**. v.69, n.3, p.1504-1510, 2003.
- BEHRENS, D.; FORSGREN, E.; FRIES, I.; MORITZ, R.F.A. Infection of drone larvae (*Apis mellifera*) with American foulbrood. **Apidologie**. v.38, p.281-288, 2007.
- CAMARGO, J.M.F. **Patologia Apícola**. In: Manual de apicultura. São Paulo, ed. Agrônômica Ceres Ltda. p.215-223, 1972.
- DE GRAAF, D.C.; ALIPPI, A.; BROWN, M.; EVANS, J.; FELDLAUFER, M.; GREGORC, A.; HORNITZKY, M.; PERNAL, S.; SCHUCH, D.; TITÉRA, D.; TOMKIES, V.; RITTER, W. Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. **Letters in Applied Microbiology**. v.43, p.583-590, 2006.
- DEL HOYO, M.L. **Recuperacion de colonias afectadas por Loque Americana en Argentina**. Proceedings. V Congreso Ibero Americano de apicultura. Mercedes, Uruguay, p.55-58, 1996.
- DE JONG, D. Dissertação de Mestrado em Entomologia, UFV, Viçosa/MG. 74p. **Loque Americana - Um perigo para o futuro da Apicultura Brasileira**. XI Congresso Brasileiro de Apicultura. Anais. Terezina, Piauí. p.249-253, 1996.
- DOBBELAERE, W.; DE GRAAF, D.C.; PEETERS, J.E.; JACOBS, F.J. Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR. **Apidologie**. v.32, p.363-370, 2001.
- DON R.H.; COX P.T.; WAINWRIGHT B.J.; BAKER K.; MATTICK J.S. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acid Research**. v.19, n.14, p.4008, 1991.
- EISCHEN, F.A.; GRAHAM, R.H.; COX, R. Regional distribution of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae*, the causative organism of American Foulbrood, in honey bee colonies of the western United States. **J. Econ. Entomol.** v.98, p.1087-1093, 2005.

EVANS, J.D; ARMSTRONG, T. Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. **BMC Ecology**. v.6, p.4, 2006.

GENERSCH, E. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. **J. Invertebr. Pathol.** v.103, p.S10-S19, 2010.

GENERSCH, E. *Paenibacillus larvae* and American Foulbrood - long since known and still surprising. **J. Verbr. Lebensm.** v.3, p.429-434, 2008.

GENERSCH, E.; ASHIRALIEVA, A.; FRIES, I. Strain- and Genotipe-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp.*larvae*, a bacterial pathogen causing American Foulbrood Disease in honeybees. **Applied and Environmental Microbiology**. v.71, n.11, p.7551-7555, 2005.

GILLARD, M.; CHARRIERE, J.D.; BELLOY, L. Distribution of *Paenibacillus larvae* spores inside honey bee colonies and its relevance for diagnosis. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.99, p.92-95, 2008.

GOCHNAUER, T.A. The distribution of *Bacillus larvae* spores in the environs of colonies infected with American foulbrood disease. **American Bee Journal**. Hamilton. v.121. p. 332-335, 1981.

GOCHNAUER, T.A.; CORNER, J. Detection and identification of *Bacillus larvae* in a commercial sample of bee-collected pollen. **Journal of Apicultural Research**. London, v.13, p.265-267, 1974.

GONÇALVES, L.S. **O estado atual da apicultura brasileira e suas perspectivas face ao desenvolvimento da apicultura mundial**. 2º SEMINÁRIO SUL-BRASILEIRO DE APICULTORES. Anais. Balneário Pinhal. Porto Alegre: EVANGRAF, v.5, p.29-40, 2000.

GOODWIN, R.M. **Detection of American Foulbrood Using the plate culture technique - Laboratory Manual**. Ruakura Apicultural Research Unit. Cliff Van Eaton, Tauranga. p.1-16, 1993.

GOODWIN, R.M.; HAINE, H.M. Sterilising beekeeping equipment infected with American Foulbrood disease spores. **New Zealand Beekeeper** v.5, n.90, p.13, 1998.

GORDON, R.E.; HAYNES, W.C.; PANG, C.H. **The genus *Bacillus***. Agriculture Handbook, USDA. Washington. 283p., 1973.

GOVAN V.A.; ALLSOP M.H.; DAVIDSON S.A. PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.65, p.2243-2245, 1999.

HAN S.H.; LEE D.W.; KIM E.H.; YOON B.S. Ultra-rapid real-time PCR for the detection *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood (AFB). **Journal of Invertebrate Pathology**. v.99, p.8-13, 2008.

HASEMAN L. How long can spores of American Foulbrood live? **American Bee Journal**. v.101, p.298-299, 1990.

HANSEN, H. **Methods for determining the presence of the foulbrood bacterium *Bacillus larvae* in honey**. Danish Research Service for Plant and Soil Science. Report N° 1724, Tidsskr. Planteavl. v.88, p.325-328, 1986.

HANSEN, H. **The incidence of the foulbrood bacterium *Bacillus larvae* in honeys retailed in Denmark**. Danish Research Service for Plant and Soil Science. Report. 1984.

HEYNDRICKX, H.; VANDEMEULEBROECKE, K.; HOSTE, B.; JANSSEN, P.; KERSTERS, K.; DE VOS, P.; LOGAN, N.A.; ALI, N.; BERKELEY, R.C.W. Reclassification of *Paenibacillus* formely *Bacillus pulvifaciens*, Nakamura (1984), Ash et al. (1994). A later subjective synonym of *Paenibacillus* formely *Bacillus larvae* White (1906), Ash et al. (1994) as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. **Int. J. Syst. Bacteriol**. v.46, p.270-279, 1996.

HORNITZKI, 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**, London. 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 the isolation of *Bacillus larvae* from honey samples. **Journal of Apicultural Research**. v.32, p.51- 52, 1993.

INTERNATIONAL STANDARD ISO 21570. 2005. Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Quantitative nucleic acid based methods. **ISO 21570:2005(E)**.Switzerland

IURLINA, M.O.; FRITZ, R. Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. **Int. J. Food Microbiol.** v.105, p.297-304, 2005.

KILWINSKI, J.; PETERS M.; ASHIRALIEVA A.; GENERSCH, E. Proposal to reclassify *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* DSM 3615 (ATCC 49843) as *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Results of a comparative biochemical and genetic study. **Veterinary Microbiology.** v.104, p.31-42, 2004.

KORIMBOCUS, J.; COATES, D.; BARKER, I.; BOONHAN, N. Improved detection of *Sugarcane yellow leaf virus* using a real-time fluorescent (TaqMan) RT-PCR assay. **Journal of Virology Methods.** v.103, p.109-120, 2002.

KUMAR, S.; TAMURA K.; NEI M. **MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment.** 2004. disponível em <http://bib.oxfordjournals.org/cgi/content/short/5/2/150>. Acesso em 22 de abril de 2010.

LAURO, F.M.; FAVARETTO M.; COVOLO L.; RASSU M.; BERTOLONI G. Rapid detection of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. **International Journal of Microbiology.** v.81, p.195-201, 2003.

LONGARIC, I.; DERAKHSHIFAR, I.; OBERLERCHNER, J.T.; KÖGLBERGER, H.; MOOSBECKHOFER, R. Genetic diversity among isolates of *Paenibacillus larvae* from Austria. **J. Invertebr. Pathol.** v.100, p.44-46, 2009.

MARTINEZ-BLANCH J.F.; SÁNCHEZ G.; GARAY E.; AZNAR R. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples. **International Journal of Food Microbiology.** v.135, p.15-21, 2009.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Nota técnica DSA n°52/2006.** Ocorrência de “Cria Pútrida Americana” no município de Quatro Barra, estado do Paraná-Brasil, 2006.

MAPA - Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Brasil. **Portaria 248**, de 28/12/1998. Diário Oficial da União ,05/01/99, 1998.

MUMFORD, R.A.; WALSH, K., BARKER, I.; BOONHAM, N. Detecction of *Potato mop top virus* and *Tobacco rattle virus* using a multiplex Real-time fluorescent reverse-transcription polymerase chain reaction assay. **Phitopatology**. v.90, n.5, p.448-453, 2000.

NEUENDORF, S.; HEDTKE, K.; TANGEN, G.; GENERSCH, E. Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen. **Microbiology**. v.150, n.9, p.2381-2390, 2004.

NORDSTRÖM, 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, 1995.

OIE - Office International des Epizooties. American Foulbrood. In: **Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for lists A and B diseases of mammals, birds and bees**. p.687-693, 2009.

OIE - Office International des Epizooties. American Foulbrood. In: **Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for lists A and B diseases of mammals, birds and bees**. p.687-693, 2000.

OIE - Office International des Epizooties. American Foulbrood. In: **Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for lists A and B diseases of mammals, birds and bees**. p.687-693, 1992.

PEREIRA, F.M. **Doenças e inimigos naturais das abelhas**. Boletim técnico, Embrapa Meio-Norte, Piauí, Brasil. 2003.

PETERS, M.; KILWINSKI, J.; BERINGHOFF, A.; RECKLING, D.; GENERSCH, E. American Foulbrood of the honey bee: occurrence and distribution of different genotypes of *Paenibacillus larvae* in the administrative district of Arnsberg (North Rhine-Westphalia). **J. Vet. Med.** v.53, p.100-104, 2006.

PICCINI, C.; D'ALESSANDRO, B.; ANTUNEZ, K.; ZUNINO, P. Detection of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae* spores in infected bee larvae and artificially contaminated honey samples by PCR. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v.18, p.761-765, 2002.

RAJENDRAM, D.; AYENZA, R.; HOLDER, F. M.; MORAN, B.; LONG, T.; SHAH, H. N. Long-term storage and safe retrieval of DNA from microorganisms for molecular analysis using FTA matrix cards. **Journal of Microbiological Methods**, v.67, p.582-592, 2006.

REBRIKOV D.V.; TROFINOV D.Y. Real-time PCR: a review of approaches to data analysis. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v.42, p.455-463, 2006.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologists programmers. In: Krawetz, S., Misener, S. (Eds.), **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Human Press, Totowa, NJ, p.365-386, 2000.

RYBA, S.; TITERA, D.; HAKLOVA, M.; STOPKA, P. A PCR method of detecting American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in winter beehive wax debris. **Vet. Microbiol.** v.139, p.193-196, 2009.

SAMBROOK J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANFORD, M.T. More Thoughts on AFB control. **APIS** V.14, number 8, 1996.. Disponível em: <http://www.ifas.ufl.edu/~mts/apishtm/apis96/apaug96/htm> Acesso em 22 de abril de 2010.

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**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Outubro. 84p, 1993.

SATTLER, A; LELL, C.; BASSI, E.A.; MASSAO, H. **Diagnóstico patológico da apicultura no Estado do Paraná - CITPAR-SIDEE/FEPA (GTZ)**. XI Simpósio Estadual de Apicultura do Paraná e VIII Exposição de Equipamentos e Materiais Apícolas. Anais. Pato Branco, PR. p.50-53, 1996.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3rd Edition, APS Press, Minnesota, 2001.

SCHAECHTER, M.; EISENSTEIN, B.I. **Genetics of Bacteria**. In: Mechanisms of Microbial Disease, 2nd. ed. M. Schaechter; G. Meddoff; B.I. Eisenstein. Williams & Wilkins. Baltimore, USA. p.57-76, 1993.

SCHUCH D.M.T. **Barreiras sanitárias na apicultura. Ações do governo brasileiro para o controle da entrada da Cria Pútrida Americana.** 2º SEMINÁRIO SUL-BRASILEIRO DE APICULTORES. Anais. Balneário Pinhal. Porto Alegre: EVANGRAF. v.5, p.47-52, 2000.

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**, v.40, p.59-64, 2001.

SCHUCH D.M.T.; TOCHETTO, L.G.; SATTLER A. Relato do primeiro isolamento oficial de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* no Brasil em colméia sem sinais clínicos de Cria Pútrida Americana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.38, n.3, p.441- 444, 2003.

SILVEIRA, A.B. **Isolamento e caracterização das linhagens de *Bacillus* e *Paenibacillus* promotores de crescimento vegetal em lavouras de arroz e trigo do Rio Grande do Sul.** Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS, 2008.

SHIMANUKI H.; KNOX, D.A. **American Foulbrood.** In: Diagnostic of Honey Bee Diseases. Beltsville:USDA/ARS. (Agriculture Handbook Number 690). p.4-12, 1991.

SHIMANUKI H.; KNOX, D.A. Improved method for the detection of *Bacillus larvae* spores in honey. **American Bee Journal**. p.353-354, 1988.

SHIMANUKI H.; KNOX, D.A., FURGALA B., CARON D.M.; WILLIAMS J.L. Diseases and Pests of Honey Bees. In: J.M.Graham(Ed). **The Hive and the Honey Bee**. Illinois. Dadant & Sons Inc. p.1083-1151, 1992.

SUN F.; WU D.; QUI A.; JIN M.; WANG X.; LI J. Development of real-time PCR systems based of SYBR Green for the specific detection and quantification of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula. **Food Control**. v.21, p.487-491, 2010.

TORPDHAL, M.; AHRENS, P. Population structure of *Salmonella* investigated amplified fragment length polymorphism. **Journal of Applied Microbiology**. v.97, p.566-573, . 2004.

WEHRLE E.; DIDIER A.; MORAVEK M.; DIETRICH R.; MARTLBAUER E. Detection of *Bacillus cereus* with enteropathogenic potential by multiplex real-time PCR based on

SYBR Green I. **Molecular and Cellular Probes**. (2009):1-7 article in press, doi:10.1016/j.mcp.2009.11.004, 2009.

ZOU, Z.; LOPEZ, D.L.; KANOST, M.R.; EVANS, J.D.; JIANG, H. Comparative analysis of serine protease-related genes in the honey bee genome: possible involvement in embryonic development and innate immunity. **Insect Molecular Biology** v.15, n.5, p.603-614, 2006.

APÊNDICE

APÊNDICE - AVALIAÇÃO DE *P. larvae* UTILIZANDO ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

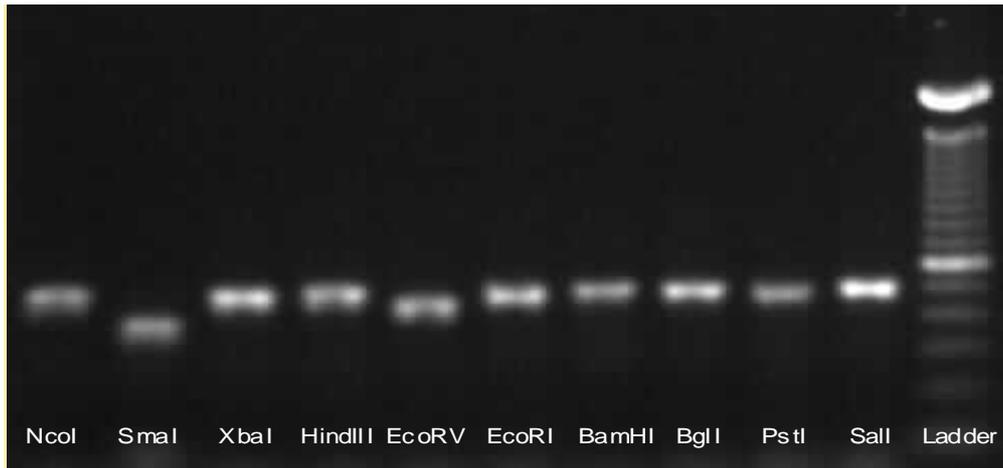


Figura 1: Fragmentos gerados com as diferentes enzimas de restrição

Obtenção do produto de PCR para análise de restrição

Para amplificação do gene 16S rDNA foi utilizado um protocolo de nested PCR (LAURO et. al., 2003), conduzido num termociclador Gene-Amp PCR System 2400 (APPLIED BIOSYSTEMS).

Uma primeira amplificação foi realizada utilizando os primers *Ple* F5'TCGAGCGGACCTTGTGT3' e *Ple* R5'CTATCTCAAACCGCTCAGAG3' e DNA cromossomal. Utilizando como molde o produto resultante desta amplificação, uma segunda reação foi realizada, com os primers *Pli* F5'CTTCGCATGAAGAAGTCATC3' e *Pli* R5'TCAGTTATAGGCCAGAAAGC3'. As concentrações de reagentes utilizados nas duas reações foram as mesmas: 0,2 mM de cada primer; 1,25 U de TAQ DNA polimerase e tampão específico; 0,2 µM de dNTPs; 1,5 mM de MgCl₂ e 5 µL de DNA (na concentração de 20 ng/µL), num volume de reação de 25 µL.

Ao término da segunda reação, 10 μL de cada produto de PCR foi usado para a análise de restrição. A reação de restrição foi realizada em triplicata, num volume final de 20 μL , contendo 5 U das enzimas *XbaI*, *HindIII*, *EcoRI*, *EcoRV*, *SmaI*, *NcoI*, *BanHI*, *BglI*, *PstI* e *SalI* (INVITROGEN), com o correspondente tampão de reação e incubadas individualmente a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, 5 μL de cada reação, e um marcador de peso molecular de 100 pares de bases foram empregados na eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz UV; utilizando-se um transluminador marca Vilber Lourmat, modelo TCP-20 LC.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)