

ANEXO

PESQUISA DE BACILLUS LARVAE EM MEL

1. OBJETIVO

Estabelecer metodologia analítica para a detecção de *Bacillus larvae*, agente da enfermidade das larvas de abelhas, conhecida como Loque Americana, em mel.

2. INTRODUÇÃO

A enfermidade Loque Americana afeta o estágio larval das abelhas *Apimellifera* e outras *Apis spp.* O agente causal desta doença denomina-se *Bacillus larvae* e a forma esporulada é a infectante.

Aproximadamente 24 horas após a ingestão de esporos de *Bacillus larvae* pelas larvas, ocorre a germinação no intestino das mesmas e daí se disseminam à cavidade corporal produzindo septicemia e morte larval. O *B. larvae* produz bilhões de esporos em cada larva infectada.

Este microrganismo se caracteriza por ser Gram positivo, catalase negativa que, em esfregaços corados, se apresenta como bastonetes longos e finos (2,5 a 5,0 μm X 0,5 X 0,5 μm), dispostos em cadeias de tamanho variável.

Os esporos são termoestáveis e resistentes a produtos químicos. São ovais de dimensões aproximadas de 0,6 μm X 1,3 μm , que se caracterizam por apresentarem em movimento Browniano, quando em montagens úmidas coradas com carbol-fucsin e observadas em gota pendente

As larvas de abelhas são sensíveis à infecção até 53 horas após a eclosão dos ovos. Segundo Bucher (1958) *apud* OIE (1992), a dose infectante média (LD50) para larvas de um dia é de 35 esporos.

Os restos larvais são a principal fonte de disseminação da doença, porém a alimentação com méis que contenham esporas, a introdução de rainhas provenientes de colméias contaminadas e o apicultor ou pessoas que tratam da colméia podem também contribuir para a disseminação da Loque Americana.

Até o momento, não há registro oficial da ocorrência deste patógeno apícola no Brasil.

3. APLICAÇÃO

A metodologia para detecção de *Bacillus larvae* destina-se à verificação da presença de seus esporos em amostras de mel.

4. PRINCÍPIOS

4.1 Preparo da Amostra

Baseia-se no aquecimento da amostra a 45°C, o que visa diminuir a viscosidade do mel permitindo a distribuição homogênea dos esporos na amostra e facilitar a manipulação da mesma.

A diluição do mel com solução salina fosfatada tamponada, além de viabilizar a concentração dos esporos pela centrifugação que se segue, contribui para bloquear parcialmente a ação inibidora de crescimento bacteriano exercida por substâncias presentes no mel.

4.2 Centrifugação

Baseia-se na concentração dos esporos presentes na amostra valendo-se de procedimento de centrifugação a 3000rpm por 30 minutos.

4.3 Choque Térmico

Baseia-se no aquecimento a 80°C por 10 minutos do sedimento da amostra após centrifugação, o que objetiva a eliminação das formas vegetativas de bactérias presentes que podem interferir no crescimento de *Bacillus larvae* e dificultar a seleção das colônias deste patógeno.

4.4 Isolamento e Seleção

Baseia-se na semeadura sobre a superfície seca de ágar *Bacillus larvae*, suplementado com ácido nalidíxico e pipemídico.

No ágar *Bacillus larvae*, a ação seletiva é exercida pela associação de ácido nalidíxico e ácido pipemídico. O ácido nalidíxico atua inibindo total ou parcialmente o crescimento de *B. alvei*, *B. apiarius*, *B. megaterium*, *B. pulvifaciens*, *B. polymixa* e *B. pumilis*. O ácido pipemídico atua prevenindo o crescimento de *B. circulans*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. mycoïdes*, *B. pulvifaciens* e *B. apiarius*.

Ao ágar *Bacillus larvae* é agregada emulsão de gema de ovo que objetiva promover o crescimento do *Bacillus larvae* e a diferenciação entre *Bacillus larvae* (lecitinase negativa) e outros *Bacillus* (lecitinase positiva) que podem estar presentes na amostra em análise.

No ágar PEMBA, um dos componentes do ágar *Bacillus larvae*, a presença de 0,1 % de peptona, associada ao piruvato de sódio, evidencia a precipitação da lecitina da gema do ovo agregada ao meio por *Bacillus lecitinase* positiva.

Este meio contém manitol, carboidrato não fermentado pelo *B. larvae*. O indicador de pH presente no meio é o azul de bromotimol.

4.5 Provas confirmatórias

Baseia-se na observação das características morfológicas e tintoriais, comprovação da redução do nitrato, da incapacidade de produzir catalase e de crescer em ágar nutritivo.

5. MATERIAL

Além dos materiais obrigatórios nos laboratórios de microbiologia, como vidraria e equipamentos básicos, para a realização das análises de pesquisa de *B. larva*, é necessário o seguinte material:

Centrífuga

Tubos para centrífuga com tampa

Banho-maria a 80°C

Termômetro 100°C

5.1 Meios de Cultura

Ágar cérebro coração com tiamina (ABHIT)

Ágar cérebro coração com tiamina e NO₃, semi-sólido (ABHIT-NO₃)

Ágar nutritivo

Ágar *Bacillus larvae* segundo Schuch (ABL)

Caldo cérebro coração com tiamina (BHIT)

Caldo cérebro coração (BHI)

Solução salina fosfatada tamponada pH 7,2 (PBS)

5.2 Reagentes

Acido pipemídico
Acido nalidíxico
Cloridrato de tiamina
Emulsão de gema de ovo 50%
Peróxido de hidrogênio a 3%
Acido acético 5N
Solução de alfa-naftilanina 0,5%
Solução de ácido sulfanílico a 0,8%
Pó de zinco

5.3 Culturas Referenciais

Bacillus larvae ATCC 9545

Bacillus cereus var. *mycoides* ATCC 11778

6. PREPARO DAS CULTURAS DE REFERÊNCIA

A partir do cultivo de *Bacillus larvae* em ABL, preparar cultura em caldo BHIT, incubando por 72 horas a 36°C ± 1°C.

Preparar fase estacionária dos demais organismos referenciais em caldo BHI incubando por 18 a 24 horas a 36°C ± 1°C.

7. TÉCNICA

7.1 Preparo da amostra

Aquecer a amostra de mel, em banho-maria a 45°C para facilitar a manipulação e a homogeneização dos esporos presentes.

Transferir, assepticamente, 20mL da amostra para frasco estéril e adiciona: 40mL de solução salina fosfatada tamponada, pH 7,2 (PBS):
Homogeneizar.

7.2 Concentração por centrifugação

Transferir para tubos de centrífuga com tampa, estéreis.

Centrifugar a 3000rpm por 30 minutos.

Após centrifugação, descartar cuidadosamente o sobrenadante.

Verificar, no sedimento, a presença de esporos que apresentam movimento Browniano (movimento vibratório) por meio da técnica de gota pendente modificada por Shimanuki e Knox, após inativar as formas vegetativas de acordo com item 7.3.

7.2..1 Técnica da gota pendente modificada por Shimanuki e Knox:

Colocar sobre uma lamínula uma gota do sedimento obtido após centrifugação, conforme 7.2 e fixar/secar sob o calor de uma lâmpada, ou passando rapidamente por 2 a 3 vezes sobre uma chama de Bunsen. Os esporos de *B. larvae* não se fixam na lamínula.

Corar com solução carbol-fucsina por 10 segundos. Tirar o excesso de corante, deixando escorrer.

Cobrir uma lâmina de vidro com uma camada fina de óleo de imersão e sobre esta colocar a lamínula preparada conforme descrito acima, ainda úmida, em posição invertida.

Observar em microscópio de campo claro com objetiva de imersão. Os esporos se coram em rosa mais intenso que as células e apresentam movimento Browniano.

A presença de esporos com movimento Browniano é indicativo da presença de *B. larvae* na amostra em análise.

Resultados negativos na prova de gota pendente são obtidos quando a amostra em análise é negativa para *B. larvae* e quando o número de esporos de *B. larvae* presente no mel é muito baixo.

Por este motivo, observando-se ou não esporos com movimentos característico; de *B. larvae*, continua-se a análise através dos seguintes passos:

7.3 Inativação das forma vegetativas

Ressuspender o sedimento obtido após centrifugação, conforme item 7.2, em 1m L de PBS e transferir para tubos com tampa de rosca. Aquecer a 80°C, em banho-maria, por .10 minuto.

7.4 Isolamento

Inocular por estrias, com alça de 10 µm, sobre a superfície seca de ágar *Bacillus larvae* (ABL).

Paralelamente, inocular 0,1mL de suspensão preparada conforme item 7.3 sobre a superfície seca de ABL.

Com o auxílio de bastão tipo "hokey", espalhar cuidadosamente o inóculo sobre toda a superfície.

Incubar 35°C por até 5 dias, observando após 48h, e depois diariamente quanto à presença de colônias típicas de *Bacillus larvae*.

As colônias típicas de *Bacillus larvae* apresentam-se planas, com superfície suavemente granulada, com bordas irregulares, sem brilho, lecitinase negativa, de cor verde clara, e diâmetro de 2 a 4mm no ABL.

7.5 Seleção

Selecionar 3 a 5 colônias típicas e testar quanto à presença de catalase, conforme item 7.6.1.

Reisolar as colônias que apresentarem resultado negativo para a prova da catalase, em placas com ABL e ABHIT. Incubar 35-37°C por 48 a 72 horas.

7.6 Provas Confirmatórias

7.6.1 Prova da catalase

Confirmar a negatividade para produção de catalase, procedendo da seguinte forma:

Retirar uma alíquota do cultivo suspeito, com auxílio de um bastão de vidro ou pipeta de Pasteur, em ABHIT ou ABL (aquele que mostrar melhor crescimento e transferir para uma placa de Petri, onde previamente foram depositadas três gotas de peróxido de hidrogênio a 3%.

Sobre a primeira gota realizar a prova com a cultura referencial de *Bacillus larvae* sobre a segunda com a cultura referencial de *B. cereus* var *mycooides* e sobre a terceira com a cultura suspeita proveniente de amostra de mel, misturando o inóculo com o peróxido e observar a reação.

A não formação de borbulhas indica prova negativa para catalase.

A formação de borbulhas indica prova positiva para catalase.

O *Bacillus larvae* é catalase negativa.

O controle negativo para a prova da catalase a ser utilizado é o *B. cereus* var. *mycooides*, que apresenta reação positiva nesta prova.

7.6.2 Coloração de Gram

Das colônias suspeitas fazer esfregaço e corar pelo método de Gram

O *B. larvae* apresenta-se como bastonetes Gram positivos, longos e finos, com cadeias de tamanho variável.

As culturas que se apresentarem como bastonetes Gram positivos, longos e nos, dispostos em cadeias de tamanho variável e catalase negativa, devem ser testadas para:

7.6.3 Redução de nitrato

A partir do cultivo suspeito em ABHIT ou ABL, inocular, com agulha, tubo contendo ágar BHIT, adicionado de nitrato de potássio (ABHIT-NO₃).

Incubar por 3 a 5 dias a 35-37°C.

Após incubação adicionar aos tubos, 2 a 3 gotas de alta naftilamina a 0,5% 2 a 3 gotas de ácidosulfanílico a 0,8%.O aparecimento de coloração rosa indica positividade.

Quando não houver desenvolvimento de coloração, adicionar ao tubo alguns miligramas de pó de zinco. Nesta situação, o aparecimento de coloração rosa indica reação negativa, enquanto que o não desenvolvimento de cor indica positividade.

O *Bacillus larvae* reduz o nitrato a nitrito.

7.6.4 Crescimento em superfície de ágar nutritivo

Repicar também em tubo com ágar nutritivo inclinado e incubar a 35-37°C por 3 dias.

O *Bacillus larvae* não cresce em ágar nutritivo em até 3 dias

DIFERENCIAÇÃO DAS ESPÉCIES DE BACILLUS COMUMENTE ENCONTRADAS EM AMOSTRAS DE PRODUTOS APTCOLAS:

Espécie	Movimento Browniano (esporos)	Catalase	Red. NO ₃	Cresciment. Agar Nutritivo
<i>B. larvae</i>	POS	NEG	POS	NEG
<i>B. alvei</i>	NEG	POS	NEG	POS
<i>B. laterosporus</i>	NEG	POS	POS	POS
<i>B. pulvificiens</i>	NEG	NEG	POS	POS

8. INTERPRETAÇÃO E EXPRESSÃO DO RESULTADO

8.1 Interpretação

Considerar como *Bacillus larvae* as culturas que se apresentarem como bastonetes Gram positivos finos e longos, dispostos em cadeias de tamanho variável, catalase negativa, redutora de NO₃ e incapaz de crescer em ágar nutritivo em até 3 dias.

8.2 Expressão do Resultado

Expressar o resultado como:

Pesquisa de *Bacillus larvae*: Positiva/20mL de mel,
ou

Pesquisa de *Bacillus larvae*: Negativa/20mL de mel.

9. COMPOSIÇÃO E PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA

9.1 Meios de Cultura

Meios de cultura desidratados fornecidos por diferentes fabricantes podem apresentar pequenas diferenças em suas composições. Observar atentamente a quantidade de meio desidratado em gramas por litro de meio, o modo de preparo, o tempo e temperatura de preparação em cada caso.

9.1.1 Ágar cérebro coração com tia mina (ABHIT)

Pesar o meio ágar cérebro coração (ABHI), de acordo com o volume de meio a ser preparado. respeitando a proporção indicada pelo fabricante

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por 15 minutos.

Aquecer até dissolução completa do ágar.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir alíquotas de 100mL em frascos apropriados.

Tampar adequadamente.

Autoclavar a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos.

Identificar, datar e armazenar adequadamente.

Antes do uso, após a fusão do meio e resfriamento até 49°C , adicionar 1mL de solução aquosa de tiamina a 0,1%, esterilizada por filtração, por litro de meio

Distribuir em placas. Manter sob refrigeração.

A composição básica do ágar cérebro coração (ABHI), deverá ser a seguinte (g/L):

Infusão de cérebro de carneiro.....	12,5g
Infusão de coração de boi.....	5,0g
Proteose-peptona.....	10,0g
D (+) glicose (C_6H_{12})6. H_2O	2,0g
Cloreto de sódio (NaCl).....	5,0g
Fosfato dissódico (Na_2HPO_4).....	2,5g
Ágar.....	15,0g

9.1.2 Caldo cérebro coração com tiamina (BHIT)

Pesar o meio caldo cérebro coração (BHI), de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Homogeneizar até dissolução completa.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir 10m L em tubos com tampa de rosca.

Tampar adequadamente.

Autoclavar a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos.

Identificar, datar e armazenar adequadamente.

Antes do uso adicionar 0,1mL em tubo de solução aquosa de tiamina a 0,01% esterilizada por filtração.

A composição básica do caldo cérebro coração (BHI), deverá ser a seguinte (g/L):

Infusão de cérebro de carneiro.....	12,5g
Infusão de coração de boi.....	5,0g
Proteose-peptona.....	10,0g
D (+) glicose (C_6H_{12})6 H_2O	2,0g
Cloreto de sódio (NaCl).....	5,0g
Fosfato dissódico (Na_2HPO_4).....	2,5g

pH final 6,6 ± 0,2

9.1.3 Ágar nutritivo

Pesar o ágar nutritivo de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por 15 minutos.

Aquecer até dissolução completa do ágar.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir alíquotas de 10mL em tubos apropriados e tampar adequadamente

Autoclavar a 21°C ± 1°C, por 15 minutos.

Após autoclavação, deixar solidificar em posição inclinada de forma a obter um bisel longo.

Identificar, datar e armazenar adequadamente.

A composição básica do ágar nutritivo deverá ser a seguinte (g/L):

Peptona de carne.....	5,0g
Extrato de carne	3,0g
Cloreto de Sódio.....	5,0g
Agar.....	15,0g

pH final 7,4 ± 0,2

9.2 Meios de cultura preparados no laboratório a partir de ingredientes básicos ou por complementação de meios desidratados.

9.2.1 Solução salina fosfatada tamponada pH 7,2 (PBS)

Preparar separadamente, as soluções A e B, pesando os componentes de acordo com as quantidades necessárias para o volume a ser preparado, respeitando a proporção indicada em cada formulação.

Transferir para recipiente adequado

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente para cada caso.

Preparar a solução salina tamponada misturando:

Solução A.....	56mL
Solução B.....	144mL
Água destilada.....	qsp 1000mL

pH final 7,4 ± 0,2

Para cada litro de solução adicionar 8,5g de NaCl.

Verificar o pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir alíquotas de 100mL em frascos apropriados.

Tampar adequadamente.

Autoclavar a 121°C ± 1°C por 15 minutos.

Identificar, datar e armazenar adequadamente.

9.2.1.1 Solução A

Fosfato de potássio monobásico.....	68,04g
Água destilada.....	qsp 1000mL

9.2.1.2 Solução B

Fosfato de potássio bibásico.....87,09g
Água destilada.....qsp 1000mL

Obs.: Usar sais na forma anidra para a preparação das soluções A e B.

9.2.2 Ágar cérebro coração com tiamina e nitrato de potássio (ABHIT-NO, semi-sólido)

A composição básica do ágar cérebro coração nitrato de potássio (ABHIT-NO₃, semi-sólido), deverá ser a seguinte (g/L):

Infusão de cérebro de carneiro.....	12,5g
Infusão de coração de boi.....	5,0g
Proteose-peptona.....	10,0g
D (+) glicose.....	2,0g
Cloreto de sódio.....	5,0g
Fosfato dissódico.....	2,5g
Nitrato de Potássio.....	1,5g
Ágar.....	4,0g

pH final: 6,6 ± 0,2

Pesar o meio caldo cérebro coração (BHI), de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Adicionar, para cada litro e meio, 1,5g de nitrato de potássio e 4,0g de ágar

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por 15 minutos.

Aquecer até dissolução completa do ágar.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir alíquotas de 10mL em tubos com tampa de rosca.

Tampar adequadamente.

Autoclavar a 121°C ± 1°C por 15 minutos.

Antes de solidificar, adicionar 0,2mL de solução aquosa 0,01% de tiamina esterilizada por filtração, por tubo.

Deixar os tubos solidificarem em posição vertical.

Identificar, datar e armazenar adequadamente.

9.2.3 Ágar Bacillus larvae segundo Schuch

Preparar, separadamente, alíquotas de 100mL de ágar *cereus*-base, ágar soja-tripticase e ágar estoque. A composição básica por litro destes meios está descrita a seguir:

9.2.3.1 Ágar *cereus*-base (PEMBA) (g/L)

Peptona.....	1,0g
Manitol.....	10,0g
Cloreto de sódio(NaCl).....	2,0g
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄ .H ₂ O).....	0,1g
Fosfato de dissódio (Na ₂ HPO ₄).....	2,5g
Fosfato de monopotássio (KH ₂ PO ₄).....	0,25g
Azul de bromotimol.....	0,12g
Piruvato de sódio.....	10,0g

Agar.....14,0g

pH final: 7,2 ± 0,2

Pesar o meio desidratado de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada deionizada correspondente.

Deixar em repouso por 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 100mL em frascos adequados.

Tampar adequadamente.

Autoclavar a 121°C ± 1°C, por 15 minutos.

Após autoclavação, deixar resfriar até 49-50°C em banho-maria.

9.2.3.2 Agar tripticase soja (g/L):

Peptona de caserna.....15,0g

Peptona de farinha de soja.....5,0g

Cloreto de sódio (NaCl).....5,0g

Agar.....15,0g

pH final: 7,3 ± 0,2

Pesar o meio desidratado de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada pelo fabricante.

Transferir para recipiente adequado.

Adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por 15 minutos.

Aquecer até completar a dissolução.

Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 100mL em frascos adequados.

Tampar adequadamente.

Autoclavar a 121°C ± 1°C, por 15 minutos

Após autoclavação resfriar até 49-50°C em banho-maria.

9.2.3.3 Ágar estoque (g/L.)

Caldo nutritivo.....23,0g

Extrato de levedura.....6,0g

Extrato de carne.....3,0g

Cloreto de sódio (NaCl).....1,0g

Fosfato de sódio bibásico (Na₂HPO₄).....2,0g

Ágar.....1,5g

pH final: 7,4 ± 0,2

Pesar, separadamente, os ingredientes de acordo com o volume de meio a ser preparado, respeitando a proporção indicada em sua formulação.

Transferir para recipiente adequado e adicionar o volume de água destilada/deionizada correspondente.

Deixar em repouso por 15 minutos.

Aquecer até completa dissolução.
Verificar a necessidade de ajuste de pH, conforme norma específica do laboratório.

Distribuir volumes de 100mL em frascos adequados e tampar adequadamente.

Autoclavar a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos.

Após autoclavação, deixar resfriar até $49-50^{\circ}\text{C}$ em banho-maria.

9.2.3.4 Preparação final do ágar *Bacillus larvae*, segundo Schuch

Em um erlenmeyer estéril com capacidade mínima de 500mL, misturar:

Ágar cereus-base.....	100mL
Ágar tripticase soja.....	100mL
Ágar estoque.....	100mL
Emulsão de gema de ovo a 50% estéril.....	30mL
Solução de ácido pipemídico a 0,2% (*).....	3mL
Solução de ácido nalidíxico a 0,1% (*).....	3mL

(*) esterilizado por filtração.

Homogeneizar bem e após distribuir 10mL em tubos estéreis ou 20mL em placas estéreis, conforme a necessidade.

Deixar o meio distribuído em tubos solidificar em posição inclinada de forma formar um bisei longo.

Deixar o meio distribuído em placas solidificar em superfície plana.

Antes do uso secar as placas invertidas, semi-abertas, em estufa a $45-50^{\circ}\text{C}$ por cerca de 15 minutos.

Manter tubos e placas sob refrigeração até o momento do uso.

9.3 Reagentes

9.3.1 Solução de ácido nalidíxico a 0,1% em NaOH 0,1N

Pesar 100mg de ácido nalidíxico e dissolver em 2mL de NaOH 0,1N e após completar o volume a 100mL com tampão fosfato pH 7,2.

Distribuir em alíquotas de 10m L e manter a 20°C por até 12 meses.

Manter uma das alíquotas sob refrigeração para utilização diária.

9.3.2 Solução NaOH 0,1N

Pesar 4,0g NaOH e dissolver em balão volumétrico de 1000mL, completando volume com água destilada.

9.3.3 Solução de tiamina a 0,1%

Pesar 0,1g de tiamina e dissolver para 100m L com água destilada.

Esterilizar por filtração e manter em refrigeração em frasco escuro por até meses.

9.3.4 Solução de tiamina a 0,01%

Diluir 1mL da solução de tiamina a 0,1% estéril para 10mL de água destilada estéril.

Manter em refrigeração em frasco escuro por até 3 meses.

9.3.5 Solução de ácido pipemídico 0,2%

Pesar 0,2g de ácido pipemídico e dissolver em 2mL de NaOH 0,1N e após completar o volume a 100mL com tampão fosfato pH 7,2.

Esterilizar por filtração.
Fracionar em alíquotas de 1mL em frascos estéreis e manter a 20°C por até 12 meses.

9.3.6 Peróxido de Hidrogênio 3%

Usar Peróxido de hidrogênio IOV (= 3%), ou também se pode preparar o peróxido de hidrogênio a partir de 100V ou a partir de peróxido de hidrogênio de 20V considerando-se que:

1. Peróxido de hidrogênio 100V = 30%. Quando o peróxido de hidrogênio usado para preparar a solução a 3% for aquela a 100V, pesar 10g e diluir para 100mL.

2. Peróxido de hidrogênio 20V = 6%. Quando o peróxido de hidrogênio usado para preparar a solução a 3% for aquela a 20V, medir em proveta 50mL e com pipetar o volume a 100mL.

9.3.7 Corante carbol-fucsina

Preparar, separadamente, as soluções A e B e após misturar as duas soluções.

Solução A:

Fucsina básica.....0,3g
Álcool etílico.....10mL

Solução B:

Fenol.....5,0g
Água destilada.....95mL

9.3.8 Ácido acético 5N

Misturar 28,75 mL, de ácido acético glacial a 71,25mL de água destilada.

9.3.9 Solução Alfa-naftilamina

Dissolver 0,5g de alfa-naftilamina em 100 mL de ácido acético 5N

9.3.10 Solução de ácido sulfanílico

Dissolver 0,8g de ácido sulfanílico em 100 mL de ácido acético 5N.
Manter frasco âmbar.

10. BIBLIOGRAFIA CONSUMADA

10. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ALTPPI, A. M. 1991. A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera*, in Argentina. Journal of Apicultural Research 30(2). P. 75-HO.

ALTPPI, A,M 1995 Detection of Bacillus larvae spores in Argentinian honeys by using a semi selective medium.

Microbiologia SEM (11). P 343 – 350

GOODWIN, R.M Deterction of American Fouldbrood Using the plate culture technique – Laboratory Manual.

Ruakara Apicultural Research Unit. Cliff Van Eaton, Tauranga. P . 1 – 16.

HANSEN, H. 1984. The incidence of the foulbrood bacterium *Bacillus larvae* in honeys retaillet in Denmark

Danish Research Device for Plant and Soil Science Report
HORNITZKY, M.A.Z & KARLOVSKIS, S 1989. A culture technique for the detection of *Bacillus larvae* in honeysbee. Journal of Apicultural Research, 28 (2) p. 118-120
HORNITZKY, M.A.Z & NICHOLLS .P .L 1993 J Medium is superior to sheep blood agar and brain heart infusion agar for the isolation of *Bacillus larvae* from honeys samples . Journal of Apicultural Research (32) p 51-5
OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZZOTIES - OIE. American Foulbrood.
in: Manual of Standards for Diagnostic. Thstes and Vaccines for lists A and B diseases of mammals, birds and bees. 1992. p. 687-693.
SANFORD, M. T. More Thoughts on AFB control, APIS V.14, number 8, August 1996. Disponível em: [http://www . ifas. ufl.edu/ - mts/apishtm/apis96/apaug96/htm](http://www.ifas.ufl.edu/mts/apishtm/apis96/apaug96/htm)
SHIMANUKI, H.; KNOX, D. A. 1988, Improved method for the detection of *Bacillus larvae* spores in honey. American Bee Journal. p. 353-354.
SHIMANUKJ., H.; KNOX, D. A. American Foulbrood. in: Diagnostic of Honey Bee Diseases. Agriculture Handbook Number 690, USDA/ARS. 1991, p. 4-12.
SHIMANUKI, H.; KNOX, D. A.; FIJRGALA, B. ; CARON, D. M.; WILLIAMS, J.L Diseases and Pest of Honey Bees in: The Hive and the Honey Bee J. M . Graham (Ed)m (Ed). Dadant & Sons. Hamilton, Illinois. 1992. p, 1083-1150.