

DETECÇÃO MOLECULAR DE *PAENIBACILLUS LARVAE*, *MELISSOCOCCUS PLUTONIUS* E *VAIRIMORPHA SPP.*, EM AMOSTRAS HISTÓRICAS DE MEL DO SUL DO BRASIL

IZADORA DUMMER WEBER¹; MATHEUS IURI FRÜHAUF²; LARIANE DA SILVA BARCELOS³; GEFERSON FISCHER⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – izadoradw@gmail.com

²Oklahoma State University – matheus.fruhauf@okstate.edu

³Oklahoma State University – Idasilv@okstate.edu

⁴Universidade Federal de Pelotas – geferson.fischer@gmail.com

1. DESCRIÇÃO DA INOVAÇÃO

As perdas de colônias de abelhas melíferas estão associadas a patógenos como *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*, *Vairimorpha apis* e *Vairimorpha ceranae*, conforme relatado por Castilhos et al. (2019) e Requier et al. (2024). A vigilância sanitária desses agentes enfrenta obstáculos, como a necessidade de coletas prospectivas e a escassez de registros históricos. Diante disso, a inovação apresentada propõe o aproveitamento de amostras históricas de mel arquivadas para a detecção molecular retrospectiva desses patógenos, combinando PCR convencional e sequenciamento, como demonstrado por Frühauf et al. (2026). O diferencial central está na extração de DNA de esporos, viabilizada por agitação com esferas de vidro de 0,1 mm a 3200 RPM por 40 minutos, precedida de tratamento enzimático com SDS e Proteinase K. Essa etapa permite liberar DNA de patógenos esporulados, como *P. larvae* e *Vairimorpha spp.*, que de outra forma permaneceriam protegidos pela parede do esporo, tornando inviável a detecção molecular em amostras antigas. Ao contrário das abordagens convencionais, que demandam amostras recentes e planejamento prévio, esta proposta reutiliza bancos de amostras já existentes. O mel, devido às suas propriedades físico-químicas, preserva DNA microbiano por longos períodos, conforme descrito por Cirtwill e Wirta (2025) e Soares et al. (2023). Isso possibilita reconstruir a circulação de patógenos ao longo de mais de uma década, sem a necessidade de novas coletas. O método foi validado em 125 amostras históricas de mel do Rio Grande do Sul, coletadas entre 2011 e 2022, com confirmação por sequenciamento e análise estatística. O processo compreendeu: descristalização e diluição das amostras; centrifugação e tratamento enzimático; ruptura de esporos com esferas de vidro; extração de DNA e PCR com iniciadores específicos validados por Piccini et al. (2002), Arai et al. (2014) e Martin-Hernández et al. (2007); e confirmação por sequenciamento. Os diferenciais incluem a extração de DNA de esporos, a retrospectividade, o reuso de amostras, a validação do mel como matriz de preservação, a aplicabilidade global e a integração metodológica. Enquanto métodos tradicionais dependem de notificação e coleta ativa, esta inovação viabiliza vigilância passiva e histórica, sendo aplicável a doenças de notificação obrigatória, como as loques americana e europeia, conforme BRASIL (2013). A substituição de *V. apis* por *V. ceranae*, relatada por Teixeira et al. (2013), e a persistência de *P. larvae* no ambiente, descrita por Genersch (2010), são exemplos de fenômenos que podem ser monitorados com essa abordagem. A detecção simultânea de múltiplos patógenos, observada por Cornman et al. (2012), reforça a importância de ferramentas que avaliem coinfeções. Dessa forma, a inovação se configura

como um serviço metodológico de vigilância sanitária retrospectiva, aplicável a serviços de inspeção, laboratórios e programas de biossegurança apícola.

2. ANÁLISE DE MERCADO

O público-alvo da inovação é composto por instituições e empresas que atuam na cadeia apícola e na sanidade animal, incluindo órgãos públicos de defesa agropecuária, como o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), agências estaduais de defesa sanitária e serviços de inspeção federal e estadual, que necessitam de ferramentas para vigilância de doenças de notificação obrigatória, como as loques americana e europeia, conforme estabelecido por BRASIL (2013); laboratórios de diagnóstico veterinário públicos e privados que realizam análises de sanidade apícola e precisam de métodos retrospectivos para complementar dados de monitoramento; cooperativas e associações de apicultores que buscam certificação sanitária e rastreabilidade de seus produtos, especialmente para exportação; empresas exportadoras de mel que necessitam comprovar a ausência de patógenos para atender exigências sanitárias internacionais; e instituições de pesquisa, como universidades e centros de pesquisa que estudam epidemiologia de patógenos de abelhas e necessitam de dados históricos para análises de tendência. As necessidades específicas atendidas incluem a obtenção de dados históricos sobre circulação de patógenos, redução de custos com coletas prospectivas, complementação de programas de vigilância e suporte à tomada de decisão em biossegurança apícola.

Os principais concorrentes ou soluções alternativas incluem o diagnóstico convencional com amostras frescas, método tradicional que depende de coleta ativa e planejamento prévio, com custos logísticos mais elevados e impossibilidade de análise retrospectiva; laboratórios de diagnóstico molecular especializados, que realizam PCR e sequenciamento; programas de monitoramento sanitário baseados em notificação passiva, que dependem da comunicação de casos suspeitos por apicultores; métodos culturais e microbiológicos tradicionais, que apresentam menor sensibilidade e não permitem detecção de DNA em amostras antigas.

A solução proposta se posiciona como complementar a esses concorrentes, e não como substituta. Seu diferencial está na capacidade de reaproveitar amostras arquivadas, na extração de DNA de esporos por ruptura com esferas de vidro e gerar dados retrospectivos, algo que nenhuma das soluções existentes oferece de forma estruturada. Além disso, integra PCR, sequenciamento e análise estatística em um protocolo reproduzível, validado por Frühauf et al. (2026).

3. ESTRATÉGIA DE DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO

A inovação se caracteriza como um serviço metodológico de vigilância sanitária retrospectiva, com foco na extração de DNA de esporos em amostras históricas de mel. A geração de receita pode ocorrer por meio de prestação de serviços laboratoriais, ofertando o protocolo de detecção molecular retrospectiva a órgãos de defesa agropecuária, laboratórios credenciados e cooperativas apícolas, mediante cobrança por amostra analisada ou por projeto de vigilância; consultoria técnica para implantação do método em laboratórios públicos e privados, incluindo treinamento de equipes e adaptação de protocolos; parcerias institucionais com financiamento por editais e convênios; e licenciamento do protocolo padronizado para laboratórios interessados, mediante acordo de transferência de tecnologia. As estratégias de distribuição incluem a publicação do protocolo em periódicos científicos, a apresentação em eventos técnicos e a

oferta direta a órgãos e instituições parceiras. A inovação não possui propriedade intelectual registrada até o momento. Trata-se de um método científico publicado em artigo (Frühauf et al., 2026), cuja replicabilidade é aberta. O desenvolvimento da inovação encontra-se em estágio de validação laboratorial, com as seguintes etapas concluídas: validação inicial, que demonstra a viabilidade de extração de DNA de amostras históricas de mel e detecção dos quatro patógenos-alvo; validação em escala laboratorial, com a análise de 125 amostras coletadas entre 2011 e 2022, com confirmação por sequenciamento e análise estatística; publicação científica, disseminando os resultados em periódico especializado (Frühauf et al., 2026). A inovação encontra-se em TRL 4 (Technology Readiness Level 4), nesse estágio, o método foi testado e validado em condições controladas, com resultados reproduzíveis, mas ainda não foi implantado em ambiente operacional ou de mercado. Um dos principais desafios está relacionado à interpretação dos resultados. A detecção de DNA não confirma que o patógeno esteja viável ou infeccioso, o que pode limitar conclusões epidemiológicas mais amplas. Para mitigar esse risco, os resultados podem ser associados a análises complementares e, futuramente, a métodos que avaliem a viabilidade dos agentes. Outro ponto relevante é a aceitação institucional. Órgãos de defesa sanitária e laboratórios podem resistir à adoção de métodos retrospectivos, por não estarem habituados a esse tipo de abordagem. Como forma de mitigação, propõe-se a apresentação de dados validados, a publicação do protocolo e o estabelecimento de parcerias-piloto com instituições de referência. Há também limitações relacionadas à amostragem. Bancos de amostras de mel podem ser escassos, incompletos ou mal preservados em algumas regiões, o que restringe a aplicação do método. Para reduzir esse impacto, é importante incentivar a criação e a manutenção de bancos de amostras, além de adaptar o protocolo de extração de DNA de esporos a diferentes condições de armazenamento. O custo de implantação pode ser um obstáculo para laboratórios menores, especialmente pela necessidade de equipamentos e insumos específicos. A mitigação envolve priorizar parcerias com laboratórios já equipados, oferecer treinamento para otimização de recursos e buscar financiamento por meio de editais.

4. RESULTADOS ESPERADOS E IMPACTO

A inovação fortalece a vigilância sanitária na apicultura, atividade essencial para a polinização e economia. Ao permitir a detecção retrospectiva de patógenos de notificação obrigatória, como as loques americana e europeia (BRASIL, 2013), por meio da extração de DNA de esporos em amostras históricas de mel, o método auxilia na prevenção de surtos e na redução de perdas de colônias. A preservação das colônias contribui para a biodiversidade e para a polinização de ecossistemas naturais e agrícolas. Por se tratar de um serviço metodológico em estágio de validação laboratorial (TRL 4), as projeções são qualitativas. A receita dependeria de contratos com órgãos públicos, laboratórios e cooperativas, além de convênios de pesquisa e consultorias. Em curto prazo, esperam-se projetos-piloto e parcerias institucionais; em médio prazo, a expansão para outras regiões e a adoção por serviços de defesa sanitária ampliariam o volume de amostras e a receita; em longo prazo, o licenciamento do protocolo e a oferta de treinamento diversificariam as fontes de receita. Como o método utiliza PCR convencional e kits comerciais, os custos operacionais são previsíveis. Quanto à evolução, a inovação pode ampliar a variedade de patógenos detectáveis,

incluindo vírus e fungos, automatizar parcialmente o protocolo com PCR em tempo real ou plataformas portáteis, e integrar-se a bancos de dados epidemiológicos para gerar mapas temporais e geográficos de circulação de patógenos. A expansão para outras matrizes, como pólen, cera e abelhas nativas, e a formação de redes de laboratórios parceiros com padronização internacional do protocolo poderiam consolidar a inovação como referência em vigilância retrospectiva de patógenos de abelhas.

5. CONCLUSÕES

A inovação utiliza amostras históricas de mel para vigilância retrospectiva de patógenos de abelhas melíferas, com destaque para a extração de DNA de esporos, integrando PCR e sequenciamento. Validada em laboratório com 125 amostras do Rio Grande do Sul, permite reconstruir a circulação de agentes infecciosos ao longo de mais de uma década sem novas coletas, contribuindo para a prevenção de surtos e a sustentabilidade da apicultura. Convidamos órgãos de defesa sanitária, laboratórios, instituições de pesquisa e cooperativas apícolas a estabelecer parcerias para validação em campo e implantação piloto do protocolo. O próximo passo é a transferência da tecnologia para serviços de vigilância, consolidando a abordagem como referência em monitoramento retrospectivo de patógenos de abelhas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTÚNEZ, K. et al. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 2284-2290, 2009. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.01953.x.

ARAI, R. et al. Development of duplex PCR assay for detection and differentiation of typical and atypical *Melissococcus plutonius* strains. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 76, n. 4, p. 491-498, 2014. DOI: 10.1292/jvms.13-0386.

CASTILHOS, D. et al. Bee colony losses in Brazil: a 5-year online survey. **Apidologie**, v. 50, n. 3, p. 263-272, 2019. DOI: 10.1007/s13592-019-00642-7.

CIRTWILL, A. R.; WIRTA, H. DNA in honey could describe the changes in flower visits and microbe encounters of honey bees over decades. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, Article 8807, 2025. DOI: 10.1038/s41598-025-93315-8.

CORNMAN, R. S. et al. Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, e43562, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0043562.

FRÜHAUF, M. I. et al. Molecular detection of *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius* and *Vairimorpha* spp., in historical honey samples from South Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 108735, 2026. DOI: 10.1016/j.jip.2026.108735

GENERSCH, E. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, n. Suppl. 1, p. S10-S19, 2010. DOI: 10.1016/j.jip.2009.06.015.