

ANDERSON PUKER

**PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE PATÓGENOS DE *Apis mellifera*
L. (HYMENOPTERA, APIDAE) EM MEL**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

T

P979p
2011

Puker, Anderson, 1986-

PCR multiplex para detecção de patógenos de
Apis mellifera L. (Hymenoptera, Apidae) em mel / Anderson
Puker. – Viçosa, MG, 2011.

xv, 69f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Dejour Message.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 41-59

1. Abelha - Doenças - Diagnóstico. 2. Diagnóstico
molecular. 3. Abelha africanizada. 4. Biologia molecular.
5. Abelha - Produtos. 6. Patologia. 7. Diagnóstico.
8. *Ascospaera apis*. 9. *Nosema apis*. 10. *Nosema ceranae*.
11. *Paenibacillus larvae*. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22. ed. 595.799

ANDERSON PUKER

**PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DE PATÓGENOS DE *Apis mellifera*
L. (HYMENOPTERA, APIDAE) EM MEL**

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

APROVADA: 22 de fevereiro de 2011.

Érica Weinstein Teixeira
(Coorientadora)

Sérgio Oliveira De Paula
(Coorientador)

Maria Aparecida Scatamburlo Moreira

Dejair Message
(Orientador)

De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando.

A certeza de que precisamos continuar.

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar.

Portanto devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo.

Da queda, um passo de dança.

Do medo, uma escada.

Do sonho, uma ponte.

Da procura, um encontro.

Fernando Sabino

Aos meus pais, Ramão Marcondes Puker e Maria L. da Silva Puker com amor e carinho...

DEDICO

A sociedade apícola...

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agora que paro para redigir as frases que comporão esta parte da dissertação é gratificante lembrar que mais uma etapa de minha vida foi cumprida, mas seria injusto e egoísmo de minha parte não lembrar das pessoas e instituições que contribuíram para que eu chegasse até aqui:

Antes de tudo e de todos a DEUS por mais esta benção ao proporcionar-me esta tão sonhada conquista. Obrigado *Pai* pela presença constante e pelos inúmeros diálogos que tivemos.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), assim como ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e seus docentes, pela oportunidade de realização do curso de mestrado, acolhimento e conhecimentos adquiridos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida, sem a qual nem sonharia em realizar esse curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo aporte financeiro para execução dessa pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Dejair Message, pela sinceridade desde o início de nosso convívio, pelos ensinamentos mesmo que à distância, pela grande amizade estabelecida, orientação e paciência. Com certeza os próximos anos de minha vida terão muito dos últimos vivido sob sua orientação, principalmente, “*o amar aquilo que faz*”.

Dizer que chegar até aqui sem ter usufruído da sabedoria e presteza da Dra. Érica Weinstein Teixeira, do Prof. Dr. Sérgio Oliveira De Paula e do Prof. Dr. Weyder Cristiano Santana seria impossível, por isso, e muito mais, que sou bastante

grato aos meus coorientadores, não apenas por esse trabalho, mas também pela amizade estabelecida.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (LANAGRO/MAPA, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil) pelo fornecimento da solução de esporos da bactéria *Paenibacillus larvae*.

À Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), pertencente à Secretaria de Agricultura e Abastecimento do estado de São Paulo, pela disponibilização de infraestrutura do Pólo Regional do Vale do Paraíba (Pindamonhangaba, São Paulo, Brasil) para preparo das amostras e análises iniciais.

Aos Professores Doutores Cristiano Lopes Andrade, Simon Luke Elliot e Terezinha Maria Castro Della Lucia pelo empréstimo de equipamentos e/ou espaço em seus laboratórios, sem os quais esse trabalho tornar-se-ia muito mais difícil.

À Dra. Karina Rosa Guidugli Lazzarini (Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil) pelos primeiros ensinamentos sobre o diagnóstico molecular dos patógenos de *Apis mellifera*, bem como por sempre tão gentilmente responder meus e-mails esclarecendo minhas dúvidas.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Scatamburlo Moreira por ter aceitado gentilmente o convite de ser membro da banca avaliadora deste trabalho mesmo com todas as circunstâncias envolvidas.

Ao Prof. Dr. Lúcio Antonio de Oliveira Campos e Prof. MSc. Alfredo A. Goicochea Huertas, bem como aos amigos do apiário da UFV pelos auxílios concedidos e que por muitas vezes foram meu espelho de amor pelas abelhas e o mundo que as circunda.

A todos os pesquisadores e cientistas pela gentileza de enviarem suas publicações que contribuíram para melhor redigir o texto dessa dissertação, para os

quais mencionarei apenas seus países de origem: Alemanha, Argentina, Austrália, Brasil, Canadá, Costa Rica, Eslovênia, Espanha, Estados Unidos, França, Itália, República Tcheca, Suécia, Suíça, Tailândia, Turquia e Uruguai.

Aos meus pais, Marcondes e Maria pelo amor e carinho e, especialmente, pela motivação traduzida sempre em poucas, mas sábias palavras. - *Pai, mãe, só vocês e Deus são testemunhas do esforço e perseverança para que este momento se concretizasse. Assim, essa dissertação é uma singela homenagem a vocês como forma de gratidão pelos sacrifícios que sem pestanejar fizeram por mim. Amo vocês!*

Aos meus queridos irmãos, Regina, Regiane, Jean, Rozeane, Maykon e Maria Gisele pelo apoio e incentivo. - *Manas e manos, como é bom lembrar de minha caminhada e saber que vocês sempre me acompanharam nessa estrada, e durante esse percurso até aqui foram tantos os obstáculos desviados e superados que sem o auxílio de vocês jamais teriam sido transpostos... Obrigado queridos irmãos, amo vocês demais!*

À “*vidinha*”, Silma Leite Rocha, pelo complemento que deu a minha vida, e não menos meu coração, pelos longos e lúcidos diálogos, sejam eles, entomológicos ou pessoais. A comunhão estabelecida tornou a caminhada até aqui, menos árdua e mais bela. - *Obrigado, te amo muito!*

Ao Eng. Florestal Júlio César Melo Poderoso (“*Cotista SE*”) por ser mais que um colega de curso, mas pela valiosa amizade, apoio e incentivos. Júlio, obrigado pelo companheirismo, pelos auxílios nos momentos de dificuldade, e por agora a família Puker ganhar mais um membro, *valeu irmão!*

À MSc. Myriam Marques Ramos Ribeiro não apenas pelos auxílios nos momentos de dificuldade, mas também pelo convívio harmonioso e enriquecedor.

Durante esse período de convívio, saiba que por trás de cada bate-papo que muitas vezes era apenas pra passar o tempo eu aprendi algo contigo.

À toda turma do Laboratório de Imunovirologia Molecular e Glicobiologia, especialmente à MSc. Monique Renon Eller pelos conhecimentos e técnicas de biologia molecular que, com paciência me foram transmitidos, além do acolhimento e companheirismo marcante durante todo esse período.

Aos funcionários da APTA pelo constante auxílio em laboratório e coleta de amostras. Na companhia de vocês minha estada em “Pinda” tornou-se mais agradável.

À MSc. Izabel Christina da Silva e Lubiane Guimarães dos Santos pelos conhecimentos transmitidos sobre alguns patógenos de *Apis mellifera*, bem como pelo imenso auxílio em laboratório durante o período que passei em “Pinda”. Cabe nesse momento um agradecimento especial ao Prof. Dejair e a Christina que me receberam de portas abertas em sua “residência” em “Pinda”, bem como pelos inúmeros diálogos relacionados à sanidade apícola e outros tantos mais que tivemos durante esse convívio.

Ao amigo e colega de orientação Fábio de Assis Pinto pela ajuda durante a execução desse trabalho, pelas correções e sugestões realizadas no texto dessa dissertação, e não menos pela grande amizade que foi estabelecida mesmo que em curto período de convívio.

Aos funcionários do apiário da UFV, Antônio Alves da Silva, Antônio Araújo Magalhães (“Toninho Alves e Gaiola”, respectivamente), Gecelmino Correa (“Lulu”, o moço do “é isto aí!”), Geraldo Neri Ferreira (“Sr. Ferreira”), Geraldo Paiva (“Cabritinho”), Iris Raimundo Stanciola e Osmar dos Anjos Costa não apenas pelo auxílio que sempre tão gentilmente realizaram, mas também pelos tantos

conhecimentos adquiridos que estavam sempre embutidos em nossas prosas descontraídas. A amizade que foi estabelecida durante esse período será muito bem guardada e cultivada, pois seres humanos e companheiros iguais a vocês são raríssimos.

As secretárias do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Dona Maria Paula Aparecida da Costa e Miriam Magalhães (atual e ex-secretária, respectivamente), e neste momento não cabe apenas enaltecer vossas competências já tão conhecida de todos, mas é justo dizer que profissionais que empenham a alma ao ofício, e prezam a satisfação não são tantos. Neste sentido, que agradeço a vocês, pois minha vida durante esse período tornou-se menos difícil com vossos auxílios.

Aos companheiros da “República Federativa Fundu do Poço”, André Mendes Pinto e Marcos de Oliveira Pinto que além da amizade refletida no convívio harmonioso sempre me auxiliaram quando os solicitei.

À todas as pessoas que se dedicam e amam as abelhas que sou muito grato, especialmente aos apicultores que foram sempre gentis e me cederam não apenas amostras, mas um pouco de seu precioso tempo e muito conhecimento.

Aqueles aqui não mencionados e que contribuíram de maneira marcante para execução dessa pesquisa, saibam que sou muito grato a vocês.

BIOGRAFIA

Nasceu em 27 de novembro de 1986 no município de Amambai, Mato Grosso do Sul, Brasil, o sétimo filho do casal Ramão Marcondes Puker e Maria L. da Silva Puker. Em 2004 ingressou no Curso de Agronomia da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS), campus de Aquidauana, obtendo o título de Engenheiro Agrônomo em 2008. Na graduação teve em sua vida a presença marcante como orientador o Prof. Dr. Sérgio Roberto Rodrigues. Durante o período da graduação foi monitor bolsista da disciplina de Entomologia Geral e de iniciação científica do PIBIC/UEMS. Ao concluir seu curso de graduação foi homenageado pelos colegas formandos e também recebeu o prêmio de melhor aluno da IV Turma de Formandos em Agronomia da UEMS de Aquidauana. Ingressou em março de 2009 no Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, submetendo a dissertação para defesa em fevereiro de 2011.

SUMÁRIO

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Importância das abelhas	1
1.2. Impacto dos patógenos sobre as abelhas melíferas no mundo	2
1.3. Principais doenças que acometem as abelhas melíferas no Brasil	4
1.3.1. Cria ensacada brasileira.....	5
1.3.2. Cria giz	6
1.3.3. Cria pútrida americana	7
1.3.4. Nosemose	8
1.3.5. Viroses.....	10
1.4. Diagnóstico dos principais patógenos de abelhas <i>Apis mellifera</i>	11
1.4.1. <i>Ascosphaera apis</i>	11
1.4.2. <i>Paenibacillus larvae</i>	12
1.4.3. <i>Nosema apis</i> e <i>Nosema ceranae</i>	13
1.5. O mel como veículo de disseminação dos patógenos de <i>Apis mellifera</i>	14
1.6. Objetivos	16
2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1. Obtenção de esporos dos patógenos alvo.....	17
2.2. Preparação das amostras positivas de mel para os patógenos alvo e extração de DNA.....	21
2.3. Otimização e sensibilidade da PCR monoespecífica e multiplex	22

2.4. Coleta e análise de amostras de mel.....	25
3. RESULTADOS.....	28
3.1. Sensibilidade da PCR monoespecífica e multiplex na detecção de esporos em mel.....	28
3.2. Análises das amostras de mel com PCR multiplex.....	30
4. DISCUSSÃO.....	31
4.1. Sensibilidade da PCR monoespecífica e multiplex na detecção de esporos em mel.....	31
4.2. Diagnóstico molecular da presença de patógenos de <i>Apis mellifera</i> em amostras de mel.....	34
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	40
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
7. APÊNDICE.....	60

RESUMO

PUKER, Anderson. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **PCR multiplex para detecção de patógenos de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) em mel.** Orientador: Dejair Message. Coorientadores: Érica Weinstein Teixeira, Sérgio Oliveira De Paula e Weyder Cristiano Santana.

Recentemente, o declínio global dos polinizadores, especialmente das abelhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), tem acometido a atividade apícola e agrícola de alguns países causando prejuízos econômicos e ambientais, notadamente para os ecossistemas, ainda não efetivamente contabilizados. Dentre as causas elencadas para esse inexplicável fenômeno os patógenos estão entre os principais possíveis responsáveis. Vários são os patógenos que acometem as abelhas *A. mellifera* pelo mundo, entre eles a bactéria *Paenibacillus larvae* (White), e os fungos *Ascosphaera apis* (Maassen ex Claussen) Olive e Spiltoir, *Nosema apis* Zander e *Nosema ceranae* Fries et al. Suas distribuições em algumas partes do mundo, como o Brasil, são pouco conhecidas, não apenas pela dificuldade de coleta de amostras em um país com tamanha dimensão, mas também em virtude da morosidade e custo dos diagnósticos envolvidos. Diante disso, torna-se importante a padronização de técnicas para o diagnóstico rápido e seguro que facilite a realização de levantamentos epidemiológicos e que, conseqüentemente, auxilie no controle da disseminação desses micro-organismos. O objetivo desse trabalho foi padronizar uma técnica de PCR multiplex para detecção simultânea da presença de *A. apis*, *N. ceranae* e *P. larvae* em mel, bem como empregá-la na análise de amostras de mel provenientes de algumas regiões brasileiras. A PCR multiplex foi padronizada com primers específicos e DNA dos micro-organismos obtidos de amostras de mel positivas para cada um dos patógenos. Utilizou-se as recomendações da legislação nacional vigente para o preparo das soluções de mel a serem submetidas à técnica desenvolvida. A técnica padronizada neste estudo foi eficiente para diagnosticar simultaneamente três patógenos de *A. mellifera* em mel: *A. apis*, *N. ceranae* e *P. larvae*. O limiar de detecção da PCR monoespecífica foi 10 UFC/mL de mel para *P. larvae* e de 10 e 100 esporos/mL de mel para *A. apis* e *N. ceranae*, respectivamente. A sensibilidade de detecção da PCR multiplex foi de 10 UFC/mL de mel para *P. larvae* e 100

esporos/mL de mel para *A. apis* e *N. ceranae*. Não foram encontrados nenhum dos referidos patógenos nas 120 amostras de mel que foram analisadas com a PCR multiplex padronizada. A PCR multiplex foi adequada para detecção simultânea de patógenos de *A. mellifera* em mel, mas, provavelmente, poderá ser utilizada em outros produtos apícolas com pequenas modificações.

ABSTRACT

PUKER, Anderson. M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Multiplex PCR for detection of pathogens of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) in honey.** Adviser: Dejair Message. Co-advisers: Érica Weinstein Teixeira, Sérgio Oliveira De Paula and Weyder Cristiano Santana.

Recently, a decline of pollinators, especially the bees *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), has affected beekeeping and consequently agricultural harvests in some countries, although the damage to ecosystems has not been effectively accounted. Among the causes listed for this unexplained phenomenon, pathogens are among the possible factors responsible. There are several pathogens that attack the bees *A. mellifera* around the world, as bacteria *Paenibacillus larvae* (White) and the fungi *Ascosphaera apis* (Maassen ex Claussen) Olive & Spiltoir, *Nosema apis* Zander and *Nosema ceranae* Fries et al. Their distributions in some parts of the world, such as Brazil, are not exactly known, not only because of the difficulty of collecting samples in such a large country, and also because of the time and cost of diagnoses involved. At this point, it is important to standardize techniques for rapid diagnosis and to facilitate the safe conduct of epidemiological surveys, and therefore assist in controlling the spread of these microorganisms. The aim of this work was standardize a multiplex PCR for simultaneous detection of the spores of *A. apis*, *N. ceranae* and *P. larvae* present in honey and use it in the analysis of honey samples from some regions. The multiplex PCR was standardized using specific primers and DNA was extracted from honey samples positive for each of the pathogens. The recommendations of existing national legislation were used for the preparation of the solutions of honey to be submitted to the technique developed. The standard technique in this study was effective for diagnosing three pathogens to *A. mellifera* in honey, *A. apis*, *N. ceranae* and *P. larvae*. The detection threshold of monospecific PCR was of 10 CFU/mL of honey, and of 10 and 100 spores/mL of honey for *A. apis* and *N. ceranae*, respectively. The detection sensitivity of multiplex PCR was of 10 CFU/mL of honey for *P. larvae*, and of 100 spores/mL of honey for *A. apis* and for *N. ceranae*. Did not match any of those pathogens in 120 honey samples analyzed with standardized multiplex PCR. Thus this method was suitable

for simultaneous detection of pathogens to *A. mellifera* in honey, but can probably be used in other bee products with minor modifications.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Importância das abelhas

Estimativa realizada recentemente aponta que 87 das principais culturas alimentares do mundo dependem da polinização por animais (Klein *et al.* 2007). Em termos monetários, os serviços dos polinizadores geram uma receita de aproximadamente 117 bilhões de dólares ao ano considerando apenas os cultivos agrícolas (Costanza *et al.* 1997). Neste contexto, vale destacar que as abelhas, principalmente *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), são os principais polinizadores de monoculturas em todo o mundo (Watanabe 1994). Estima-se que em países como Estados Unidos (EUA), essas abelhas sejam responsáveis por um incremento da ordem de 14,6 bilhões de dólares na produção de alimentos através da polinização de culturas de interesse econômico (Morse e Calderone 2000; Stokstad 2007). Além disso, as abelhas *A. mellifera* desempenham papel crucial na manutenção da biodiversidade, uma vez que polinizam inúmeras plantas que requerem obrigatoriamente a polinização cruzada para sua reprodução (Allen-Wardell *et al.* 1998).

Além de polinizadoras de inúmeras plantas, as abelhas *A. mellifera* conhecidas comumente como “abelhas melíferas” são criadas em praticamente todo o mundo para obtenção de inúmeros produtos de interesse econômico. A prática apícola gera divisas para os apicultores não apenas com a comercialização dos produtos diretos das abelhas, como a apitoxina, cera, geléia real, mel, pólen e a própolis, mas também com o aluguel de colônias para polinização de culturas

agrícolas que dependem ou são beneficiadas pela ação desses insetos.

Atualmente, o papel ecológico e econômico que as abelhas representam está ficando comprometido pela diminuição desses polinizadores no mundo. Tal redução pode ser explicada, parcialmente, pela ação antrópica, mas inúmeros fatores ainda permanecem desconhecidos.

1.2. Impacto dos patógenos sobre as abelhas melíferas no mundo

O recente declínio da população de abelhas observado em algumas regiões do mundo tem gerado prejuízos tanto ecológicos como econômicos. Para se explicar as causas muitas pesquisas vêm sendo realizadas e a maioria dos resultados apontando para o efeito isolado ou sinérgico de patógenos.

Como esses insetos vivem em sociedade, isso de certa maneira, facilita a infecção, sobrevivência e disseminação de parasitas (Fries e Camazine 2001). De maneira geral, o interior dos ninhos de insetos sociais além de oferecerem abrigo proporciona a manutenção de um microclima com temperaturas e umidade controladas propícias aos micro-organismos e parasitas (Fries e Camazine 2001); além disso, a alta densidade de indivíduos dentro do ninho e as frequentes interações entre eles, por exemplo, a alimentação larval, comunicação, limpeza e trofalaxia em indivíduos proporcionam condições propícias para sobrevivência e disseminação desses organismos (Fries e Camazine 2001; Invernizzi *et al.* 2009).

As colônias das abelhas melíferas são compostas por adultos e imaturos distribuídos em distintas castas, operárias e rainha e sexo (zangões). Os indivíduos de cada casta e sexo apresentam características morfológicas, fisiológicas e comportamentais diferentes, o que favorece o aparecimento de parasitas

especializados em atacar um subgrupo dentro da colônia (Invernizzi *et al.* 2009). No caso de abelhas melíferas, os patógenos podem infectar tanto imaturos (larvas e pupas) como os adultos (Bailey e Ball 1991; Fries e Camazine 2001; Ellis e Munn 2005). Os níveis de infecção normalmente são atenuados com resistências comportamentais (Rothenbuler 1964; Spivak e Reuter 2001; Palacio *et al.* 2010), mas insuficiente para impedir, em muitos casos, a perda de toda a colônia.

Diante do fenômeno do desaparecimento das abelhas melíferas conhecido nos EUA como “*Colony Collapse Disorder*” (CCD) (Stokstad 2007) um verdadeiro monitoramento da população desses insetos tem sido realizado, principalmente, nos EUA (vanEngelsdorp *et al.* 2008, 2010). Esse fenômeno, reportado pela primeira nos EUA, é caracterizado pelo sumiço repentino das abelhas operárias da colônia (Oldroyd 2007; Stokstad 2007), ausência de abelhas mortas dentro e próximo das colônias, presença de alimento estocado e de crias operculadas; nos estágios finais da CCD, a rainha é acompanhada por indivíduos recém-emergidos (Cox-Foster *et al.* 2007; Pettis *et al.* 2007).

Apesar da ausência de consenso sobre as origens da CCD, pesquisas ainda que não conclusivas demonstram que os patógenos podem estar no topo da lista das possíveis causas (Cox-Foster *et al.* 2007), atuando possivelmente de maneira sinérgica à outros fatores, tais como exposição crônica a pesticidas, nutrição inadequada de ambos, imaturos e adultos, regulação inadequada da temperatura do interior da colônia, dentre outros (veja Oldroyd 2007).

Semelhante ao que foi documentado para os EUA em 2006 e 2007, anos antes foi reportado no continente europeu um fenômeno parecido. Primeiramente registrado por pesquisadores espanhóis, o fenômeno recebeu o nome de “*Síndrome de Despoblamiento de las Colmenas*” (Higes *et al.* 2005), cujos sintomas são

similares aos da CCD. As causas do fenômeno europeu ainda permanecem não esclarecidas, embora haja fortes indícios da participação de patógenos (Higes *et al.* 2009c; Higes *et al.* 2010). Neste contexto, vale mencionar que uma gama de organismos tais como ácaros, bactérias, fungos e vírus (Bailey e Ball 1991; Ellis e Munn 2005) acometem as abelhas melíferas por todo o mundo.

As preocupantes notícias sobre o declínio da população de *A. mellifera* em praticamente todo o mundo trazem à discussão os problemas causados direta ou indiretamente por patógenos que acometem esses insetos, os quais refletem também na produção de produtos apícolas e agrícolas. Com as consideráveis perdas do número de colônias, não só os apicultores contabilizaram sérios prejuízos com a queda de produção, mas também os agricultores foram prejudicados devido à necessidade de polinização em suas lavouras. Embora mundialmente o número de colônias disponíveis para a polinização tenha aumentado ao longo dos últimos 50 anos, esse aumento não acompanhou a quantidade de área plantada com culturas agrícolas que são dependentes de polinizadores (Aizen e Harder 2009).

1.3. Principais doenças que acometem as abelhas melíferas no Brasil

No Brasil, embora a atividade apícola não tenha dimensões equivalentes a de outros países como, Argentina, China e EUA, ela vem a cada ano desenvolvendo-se e aumentando, mesmo que não linearmente, sua participação no mercado internacional com o incremento de suas exportações, principalmente, com o incremento da produção de mel no nordeste do país. Em função do aumento de sua importância econômica, os aspectos sanitários também tomam uma grande importância, principalmente, por conta das possibilidades de uso inadequado de

medicamentos que podem além de contaminar, comprometer a comercialização dos produtos apícolas.

Semelhante ao que tem sido registrado em outros países que se pratica apicultura, também há registros esparsos sobre o desaparecimento de abelhas em nosso país, principalmente na região sudeste (Teixeira *et al.* 2008a). A apicultura nacional não está isenta da ação de parasitas, sendo que nos últimos cinco anos vários patógenos foram reportados pela primeira vez no nosso país. Embora a atividade apícola seja realizada utilizando um polihíbrido de diferentes raças de abelhas melíferas introduzidas no país, conhecida como “abelha africanizada”, a qual é reconhecidamente mais resistente aos patógenos que as raças européias puras, isso não impede a atuação e os prejuízos causados por estes.

1.3.1. Cria ensacada brasileira

Várias doenças em crias e abelhas adultas de *A. mellifera* ocorrem no Brasil (Message 1997). Hoje, algumas têm aumentado a sua disseminação ou apresentado um risco maior para a apicultura brasileira, entre elas, a cria ensacada brasileira, cujo agente causador parece estar relacionado com substâncias tóxicas presentes no pólen do barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum* Mart.; Fabaceae) (Carvalho e Message 2004). Essa enfermidade que afeta principalmente a apicultura do sudeste brasileiro recebeu esse nome por apresentar sintomas similares ao causado pelo vírus SBV (Sacbrood Virus).

1.3.2. Cria giz

A “cria giz”, cujo agente etiológico é o fungo entomopatogênico *Ascosphaera apis* (Maassen ex Claussen) Olive e Spiltoir, foi detectada inicialmente nos estados de São Paulo (Rocha *et al.* 1998) e Rio Grande do Sul (Sattler *et al.* 1998) e desde então vem aumentando sua disseminação pelo território brasileiro sendo recentemente reportada também para Minas Gerais (Castagnino *et al.* 2006a).

Vinte e uma espécies são descritas para *Ascosphaera* (Spiltoir e Olive 1955), sendo que quatro delas estão associadas com abelhas (Albo e Reynaldi 2010), mas somente *A. apis* é considerado patogênico para *A. mellifera* (Heath 1982; Aronstein e Murray 2010). Crias infectadas com *A. apis* apresentam aspecto “mumificado” e cobertas por um micélio branco compacto, assemelhando-se a giz, o que designa o nome da doença como “cria giz” (Bailey e Ball 1991).

As operárias removem as larvas “mumificadas” (mortas) dos favos e as descartam na entrada do ninho formando um reservatório primário de esporos para novas infecções (Rehner e Evans 2009). Na sua forma vegetativa, *A. apis* não infecta os imaturos (Bailey e Ball 1991). Entretanto, na fase esporofítica são facilmente disseminados para as crias, quando são alimentadas pelas operárias nutrizes (Bailey e Ball 1991). Esporos do fungo podem chegar até a colônia pelo forrageamento de pólen contaminado (Koenig *et al.* 1987), e sua disseminação ocorrer através desse produto apícola e também de mel (Anderson *et al.* 1997). O pólen desempenha importante papel não apenas na transmissão do agente dessa enfermidade, mas também como uma predisposição para infecção quando está ausente na dieta das abelhas (Flores *et al.* 2005a).

1.3.3. Cria pútrida americana

A Cria Pútrida Americana (CPA) é uma patologia de abelhas melíferas causada pela bactéria Gram Positiva *Paenibacillus larvae* (White) (Genersch *et al.* 2006). No Brasil, essa bactéria foi detectada inicialmente em mel importado comercializado no país (Costa 1995). Oito anos mais tarde de ter sua presença confirmada em território nacional, em mel, a bactéria foi reportada pela primeira vez em mel armazenado no favo e em abelhas adultas de colônias do estado do Rio Grande do Sul (Schuch *et al.* 2003). Neste primeiro relato da bactéria no Brasil, sintomas característicos da doença não haviam sido evidenciados, porém, recentemente tal fato foi constatado em Curitiba (Paraná, Brasil) com as crias apresentando sintomas típicos da doença CPA (Sattler 2010).

A CPA é considerada a mais grave das patologias de crias de abelhas devido à sua ação rápida (Hansen e Brødsgaard 1999), alta resistência às condições ambientais (Haseman 1961) e por ser amplamente distribuída pelo mundo (Ellis e Munn 2005). As larvas são infectadas com a ingestão de alimento contaminado, sendo a DL₅₀ de 8,49 esporos (Brødsgaard *et al.* 1998). Aparentemente as larvas de operárias jovens (com menos de 30 horas de vida) são mais susceptíveis à infecção (Brødsgaard *et al.* 1998), enquanto que as de zangões parecem ser mais resistentes à doença, provavelmente pelo maior tamanho corporal ou uma própria especialização do patógeno em atacar determinados subgrupos dentro da colônia (Behrens *et al.* 2010).

A contaminação por *P. larvae* ocorre quando os apicultores transferem favos com crias contaminadas entre colônias, ou quando as abelhas saqueiam mel de colônias mais fracas e contaminadas (Lindström *et al.* 2008) e, certamente, também

devido ao uso comum de utensílios (formão, luvas etc.) entre colônias. Entre apiários e até mesmo entre países, a transmissão ocorre, frequentemente, através do uso de mel contaminado para alimentação das colônias no campo (Hansen e Brødsgaard 1999) ou da importação de colônias e rainhas. Dessa forma, a importação de produtos apícolas sem as devidas inspeções sanitárias, principalmente, para verificação da presença de patógenos pode ser considerado um grande risco para a apicultura.

1.3.4. Nosemose

A noseemose é outra patologia que acomete as abelhas africanizadas no Brasil (Van Emmelen 1952; Nascimento 1970), cujos agentes etiológicos causadores são os microsporídeos *Nosema apis* Zander, detectada desde o início do século passado no país e *Nosema ceranae* Fries et al. detectada recentemente em Altinópolis (São Paulo, Brasil) (Klee et al. 2007). As espécies de Microsporidia (Fungi) infectam uma grande variedade de táxons de vertebrados e invertebrados. Somente para *Nosema* Nägeli, 12 ordens de insetos são conhecidas como hospedeiros desse grupo de parasitas (Higes et al. 2007).

A contaminação ocorre com a ingestão de esporos presentes na água ou no alimento, além disso, as operárias contaminam-se quando realizam a limpeza das fezes contendo esporos (Bailey e Ball 1991). A transmissão de ambas espécies de *Nosema* é horizontal (Webster et al. 2008; Higes et al. 2009a). Esporos de *N. ceranae* são transmitidos para rainha através da trofalaxia (Higes et al. 2009a), e estudo conduzido por Webster et al. (2008) comprovou a transmissão horizontal do agente etiológico da noseemose, já que não encontraram esporos do patógeno (*N.*

apis) nos ovariolos, ovos, larvas e pupas filhas da rainha infectada. Ambas espécies danificam as células epiteliais do intestino de abelhas adultas (De Graaf *et al.* 1994; García-Palencia *et al.* 2010), afetando severamente as funções digestivas desses insetos.

Esporos dos microsporídios chegam até as colônias através do forrageamento de pólen contaminado (Higes *et al.* 2008; Nascimento 1970). Recentemente, Higes *et al.* (2008) reportaram que o pólen pode ser contaminado com esporos de *N. ceranae*. Entretanto, os autores foram cautelosos e mencionaram que a origem do pólen contaminado era da própria abelha que o forrageava, ou seja, ocorre uma autocontaminação durante o processo de coleta do pólen na flor. Quase 40 anos antes da documentação realizada por Higes *et al.* (2008), foi documentado a presença de esporos de *N. apis* tanto no pólen forrageado quanto nas flores de milho visitadas (Nascimento 1970). Diante dessas informações fica evidenciada a importância dos pólenes na disseminação do agente dessa doença, que se constituem então em perigosa fonte de contaminação das abelhas.

Até 2005, acreditava-se que *N. ceranae* ocorria apenas nos países da Ásia e tinha como hospedeiro a abelha melífera asiática, *Apis cerana* F. (Hymenoptera: Apidae) (Fries *et al.* 1996). Desde então esse microsporídio saltou de hospedeiro e foi registrado recentemente infectando *A. mellifera* na Europa (Higes *et al.* 2005). Acreditava-se, portanto, que se tratava de uma associação nova, contudo, Paxton *et al.* (2007) demonstraram que esse patógeno já infectava as abelhas *A. mellifera* na Europa desde 1998. Semelhante a esse estudo, Chen *et al.* (2008) demonstraram que *N. ceranae* já infectava as abelhas européias nos EUA desde 1995.

Atualmente, *N. ceranae* encontra-se em diversos países do mundo (Chauzat *et al.* 2007; Klee *et al.* 2007; Calderón *et al.* 2008; Williams *et al.* 2008; Higes *et al.*

2009b), inclusive tendo sido reportada em novo hospedeiro, *Bombus* spp. (Hymenoptera: Apidae), na Argentina (Plischuk *et al.* 2009). O declínio da população de abelhas registrado recentemente em alguns países foi atribuído, com fortes evidências, à presença desse patógeno (Cox-Foster *et al.* 2007; Higes *et al.* 2009c; Borneck *et al.* 2010; Higes *et al.* 2010; Muz *et al.* 2010) constituindo-se em uma importante ameaça para atividade apícola.

Paxton *et al.* (2007) compararam a virulência de *N. apis* e de *N. ceranae* e verificaram que a segunda espécie provoca maior mortalidade nas abelhas em relação à primeira, embora, Forsgren e Fries (2010) ao compararem as taxas de multiplicação entre as duas espécies tenham observado pequenas diferenças. Além disso, a mortalidade causada por *N. ceranae* não foi significativamente superior à causada por *N. apis* (Forsgren e Fries 2010).

1.3.5. Viroses

Além de alimento tóxico (pólen de barbatimão), bactéria e fungos causadores de patologias em abelhas no Brasil, seis, dentre os 18 vírus que acometem esses insetos já reportados na literatura, foram encontrados em imaturos e adultos no país, quais sejam: *Acute Bee Paralysis Virus* (ABPV), *Black Queen Cell Virus* (BQCV), *Cloudy Wing Virus* (CWV), *Deformed Wing Virus* (DWV), *Israeli Acute Paralysis Virus* (IAPV), *Filamentous Virus* (FV) (Message 1997; Teixeira *et al.* 2008a,b).

Normalmente, os sintomas causados pela infecção viral são confundidos com tantos outros, como por exemplo, deficiência nutricional e efeito de sub dosagens de pesticidas. Esses sintomas anômalos apresentados pelas abelhas tem dificultado o diagnóstico rápido e preciso do agente causador. Ferramentas moleculares têm

auxiliado no diagnóstico desses vírus, principalmente em amostras de abelhas adultas (Teixeira *et al.* 2008a,b).

1.4. Diagnóstico dos principais patógenos de abelhas *Apis mellifera*

1.4.1. *Ascosphaera apis*

Normalmente o diagnóstico da “cria giz” é feito quando os sintomas já são evidentes na colônia. Para o diagnóstico, amostras de crias com aspecto de giz são conduzidas ao laboratório e acondicionadas em meio de cultura específico (Heath 1982) para estimular a produção de esporos (Calderón *et al.* 2004; Castagnino *et al.* 2006a,b; Borum e Ulgen 2008).

As estruturas produzidas são observadas com frequência em microscopia de luz (Castagnino *et al.* 2006b; Borum e Ulgen 2008) com a identificação sendo realizada através de chaves taxonômicas (Calderón *et al.* 2004). De maneira geral, a identificação de *Ascosphaera* Olive & Spiltoir é considerada difícil, principalmente devido à falta de características distintivas entre as espécies do gênero (James e Skinner 2005). Além disso, algumas espécies são difíceis para se cultivar e necessitam de condições especializadas de crescimento (James e Skinner 2005), provavelmente devido a sua especificidade com o hospedeiro.

Para o diagnóstico antecipado da doença, Anderson *et al.* (1997) desenvolveram um protocolo microbiológico para detecção de esporos viáveis de *A. apis* em mel. Embora o método de Anderson *et al.* (1997) tenha sido considerado eficiente, principalmente para purificação dos esporos em mel, esse protocolo

demanda o cultivo do fungo em meio específico com a confirmação final da espécie somente após o décimo dia de cultivo.

Atualmente, as técnicas de biologia molecular passaram a integrar as outras ferramentas que são utilizadas na detecção de *A. apis*. A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) fornece um rápido e confiável diagnóstico para infecções com *A. apis* (James e Skinner 2005). Com essa técnica tem sido possível detectar o fungo no mel (Reynaldi *et al.* 2003) e, possivelmente, em outros produtos apícolas (James e Skinner 2005). Murray *et al.* (2005) padronizaram um método molecular para distinguir com PCR quatro espécies de *Ascosphaera* que são associadas com abelhas, além de apresentarem um novo, rápido e confiável método para preparar DNA de fungos adequados para amplificação.

Embora as ferramentas de biologia de molecular possam ser utilizadas na prevenção ou confirmação da enfermidade causada por *A. apis*, sua acurácia não foi aferida em nenhum dos estudos já realizados. Considerando a importância desse fungo na sanidade apícola, torna-se necessário aferir a eficiência das técnicas de biologia molecular (especialmente a PCR), aplicando-as em produtos apícolas como o mel, visando com isso um diagnóstico prematuro da doença.

1.4.2. *Paenibacillus larvae*

A CPA pode ser frequentemente diagnosticada no campo por inspeção visual, porém, o diagnóstico deve sempre vir acompanhado por exames laboratoriais (De Graaf *et al.* 2006). A detecção confiável da CPA é um papel cada vez mais importante na prevenção da perda de colônias (Hansen e BrØdsgaard 1999; Ryba *et al.* 2009). Basta uma pequena quantidade de esporos para infectar as crias saudáveis,

e em pouco tempo, um surto da doença pode levar a consequências fatais para a colônia e até mesmo inviabilizar a exploração comercial (Hansen e BrØdsgaard 1999; Ryba *et al.* 2009).

Testes bioquímicos são frequentemente utilizados para diagnosticar *P. larvae*, contudo esse processo normalmente é demorado (duas a três semanas) por requerer, principalmente, o cultivo prévio da bactéria (De Graaf *et al.* 2006). Desse ponto de vista, padronizar um rápido e confiável método para detecção antecipada de esporos infecciosos e/ou formas vegetativas pode ser uma ferramenta importante para reduzir a incidência da doença (Ryba *et al.* 2009). Atualmente, as técnicas de biologia molecular, particularmente a PCR tem se tornado cada vez mais precisas e sensíveis na detecção de *P. larvae* em abelhas e produtos apícolas (Govan *et al.* 1999; Piccini *et al.* 2002; Bakonyi *et al.* 2003; Lauro *et al.* 2003; Alippi *et al.* 2004; Ryba *et al.* 2009).

1.4.3. *Nosema apis* e *Nosema ceranae*

As características morfológicas dos esporos das duas espécies de *Nosema*, quando observadas por meio de microscopia ótica, são muito semelhantes (Martín-Hernández *et al.* 2007; Calderón *et al.* 2008; Chen *et al.* 2009), o que dificulta a distinção e o diagnóstico diferencial. Atualmente, essa tarefa é realizada empregando-se ferramentas moleculares como a PCR, a qual foi utilizada pela primeira vez para distinguir as duas espécies de *Nosema* em uma única reação (duplex) por Higes *et al.* (2006).

1.5. O mel como veículo de disseminação dos patógenos de *Apis mellifera*

Entre as doenças já citadas, aquelas cujos agentes etiológicos apresentam no seu ciclo de vida a fase de esporos, caracterizada por ser altamente resistentes às diferentes condições ambientais (por exemplo, Haseman 1961; Hale *et al.* 1980) e antibióticos, constituem um motivo de grande preocupação. Esporos de *A. apis*, *N. ceranae* e *P. larvae* têm sido detectados em amostras de mel (Hansen e Rasmussen 1986; Reynaldi *et al.* 2003; Giersch *et al.* 2009) constituindo-se em uma forma de disseminação eficaz para esses patógenos, principalmente, pela ampla comercialização desse produto no mundo.

Por serem agentes etiológicos já detectados no Brasil e por apresentarem vasta distribuição causando severos prejuízos econômicos não apenas para apicultura, mas indiretamente afetando a produção agrícola mundial, estes microorganismos e esse meio de disseminação (mel) foram escolhidos para serem objetos desse estudo. Esse produto apícola foi escolhido por pelo menos três motivos: (i) porque as abelhas melíferas, tanto na sua fase imatura quanto adulta (com exceção da rainha), o utilizam juntamente com o pólen na sua dieta alimentar, ou seja, dependem dele para sua sobrevivência; (ii) porque patógenos de abelhas já foram detectados no mel, consistindo possivelmente em uma adaptação para infecção e disseminação do patógeno; e (iii) porque é o produto apícola mais amplamente comercializado e consumido no mundo, constituindo assim em um extraordinário veículo para disseminação de patógenos.

Atualmente, o emprego da técnica de PCR já não é mais novidade na detecção dos agentes etiológicos causadores de doenças em abelhas (Govan *et al.* 1999; Piccini *et al.* 2002; Bakonyi *et al.* 2003; Lauro *et al.* 2003; Alippi *et al.* 2004;

De Graaf *et al.* 2006; Ryba *et al.* 2009). Essa ferramenta é particularmente útil devido ao curto tempo necessário para realização do diagnóstico e à confiabilidade nos resultados obtidos (Govan *et al.* 1999). A PCR monoespecífica é amplamente utilizada em diagnósticos microbiológicos para detecção de ácidos nucleicos específicos em materiais biológicos (Bakonyi *et al.* 2003), porém, quando trata-se da detecção simultânea de múltiplos materiais genômicos essa técnica convencional mostra-se inapropriada, principalmente por demandar a realização de inúmeras reações.

Uma alternativa seria padronizar e lançar mão de uma técnica de PCR multiplex que oferece uma melhoria significativa para a técnica convencional, integrando múltiplos primers que amplificam simultaneamente regiões de DNA específicas de materiais biológicos em uma única reação (Martín-Hernández *et al.* 2007). Além da rapidez no diagnóstico, a PCR multiplex gera uma grande economia quando se tem um elevado número de amostras para serem analisadas (Grabensteiner *et al.* 2007). PCR multiplex tem sido utilizada para detecção simultânea de múltiplos vírus causadores de doenças em abelhas (Topley *et al.* 2005; Grabensteiner *et al.* 2007; Teixeira *et al.* 2008b) e na detecção simultânea de *N. apis* e *N. ceranae* (Martín-Hernández *et al.* 2007; Hamiduzzaman *et al.* 2010).

Para a diagnose molecular de patógenos em abelhas, tem-se utilizado como fonte de materiais biológicos larvas e/ou indivíduos adultos. Salienta-se que a disseminação de vários patógenos ocorre através dos produtos apícolas (Hansen e Rasmussen 1986; Reynaldi *et al.* 2003; Flores *et al.* 2005; Giersch *et al.* 2009) e o diagnóstico a partir dos sintomas clínicos aparentes podem limitar o controle da doença, devido à dispersão de esporos infectivos já ter ocorrido. Além deste problema, os sintomas clínicos de determinada doença podem demorar anos para

aparecer na colônia e a transmissão dos agentes etiológicos já ter ocorrido. Exemplo disso é a CPA que é uma doença que se instala lentamente e de maneira progressiva na colônia levando anos entre a detecção dos esporos no mel até a manifestação dos sintomas (Hansen 1984).

A apicultura migratória e o fluxo contínuo de colônias e produtos apícolas contribuem para disseminação de patógenos entre apiários ou até mesmo entre países. Neste sentido, torna-se importante padronizar técnicas moleculares que possam detectar a presença de patógenos em produtos apícolas, principalmente como forma de antever a infecção da colônia e controlar sua disseminação. Visto que os principais patógenos causadores de graves enfermidades nas abelhas já foram registrados no Brasil, torna-se de extrema importância testar e padronizar técnicas que possam realizar um rápido e seguro método de detecção desses agentes, bem como conhecer a sua distribuição no território brasileiro, com a finalidade de permitir o uso de eficientes e adequadas medidas de controle sanitário.

1.6. Objetivos

Esse estudo foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

- Padronizar uma técnica de PCR multiplex para detecção simultânea de *A. apis*, *N. ceranae* e *P. larvae* em mel de abelhas *A. mellifera*;
- Realizar um levantamento da presença desses patógenos em amostras de mel colhidas diretamente de colônias em apiários comerciais, obtidas de apicultores e ainda adquiridas no comércio de alguns estados do Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção de esporos dos patógenos alvo

Ascospaera apis

Crias mumificadas com sintomas característicos de *A. apis* (Fig. 1A) foram coletadas de várias colônias no município de Faria Lemos, Minas Gerais, Brasil. Em laboratório, pequenos pedaços de crias infectadas foram transferidos para placas de Petri com meio de cultura BCA (batata, cenoura e ágar bacteriológico) contendo antibiótico (Rifamicina SV Sódica) (para detalhes da preparação do meio de cultura ver apêndice *a*) (Fig. 1B). Sete dias após esse procedimento, nova repicagem foi realizada para purificação do fungo. Durante o período de cultivo, as placas de Petri foram mantidas em câmara climatizada (± 26 °C; $\pm 70\%$ de UR).

Estruturas contendo esporos de *A. apis* foram retiradas do meio de cultura com alça de plástico descartável estéril e, transferidas para tubos cônicos estéreis (15 mL) contendo 1,5 mL de água destilada estéril. Para obtenção dos ascósporos (= esporos), os quais se encontram contidos em estruturas denominadas esporocistos e ascocistos (Spiltoir e Olive 1955; Fig. 1C), foi realizada uma maceração com bastão de vidro pontiagudo por dois minutos à temperatura ambiente. Em seguida, essa solução foi filtrada em papel de filtro (poros de 14 μm) para purificação dos esporos (Fig. 1D). Somente após esse procedimento foi feita a contagem do número de esporos em Câmara de Neubauer, por meio de microscopia de luz (aumento de 400 x).

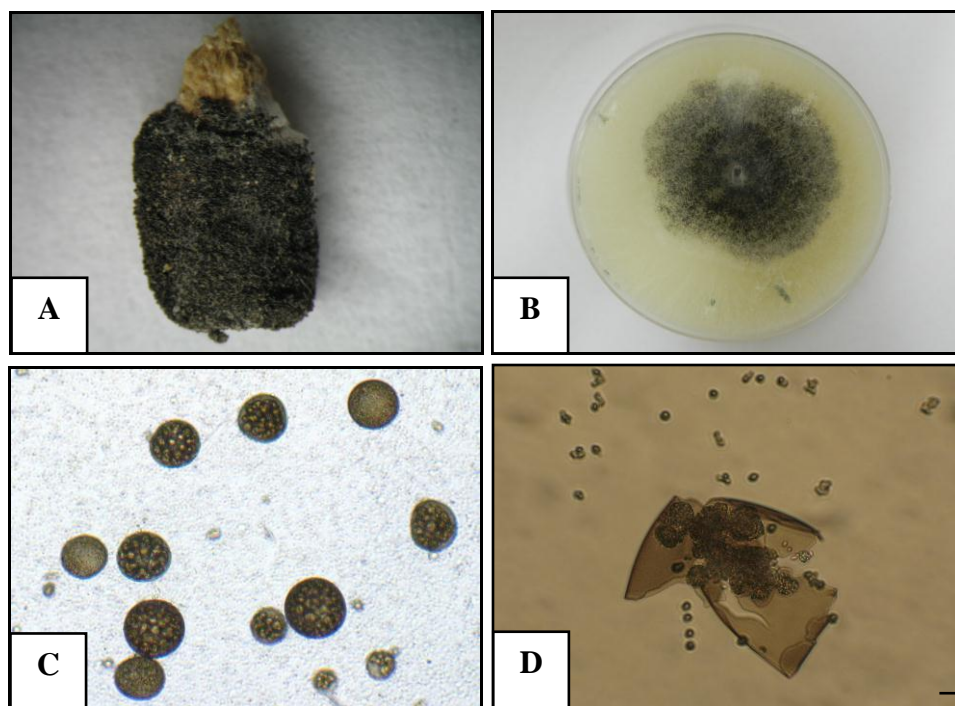


FIG. 1. Cria de *Apis mellifera* africanizada “mumificada” pela ação do fungo *A. apis*, cultivo do fungo em meio de cultura específico e detalhe de esporocistos íntegros e macerados visualizados em microscopia de luz. A - Cria de *Apis mellifera* africanizada coberta por esporocistos (preto) e micélios (branco). B - *Ascospaera apis* cultivado em meio BCA. C - Esporocistos íntegros. D - Detalhe do aspecto dos esporos liberados do esporocisto após maceração. Barra = 14 μ m.

Nosema ceranae

Para obtenção dos esporos de *N. ceranae*, dez colônias (Langstroth) do apiário da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA - Pólo Regional do Vale do Paraíba, Pindamonhangaba, São Paulo, Brasil) foram selecionadas para coleta de amostras de abelhas, por terem apresentado, em avaliação prévia por microscopia, elevado número de esporos do patógeno alvo poucos dias antes da realização da coleta.

Para coleta de amostras, inicialmente tomou-se o cuidado de fechar o alvado das colônias com espuma, o que permitiu a coleta apenas de operárias campeiras. Foi

utilizado um sugador portátil especialmente desenvolvido (modelo de D. Message e L. Magrini) para captura das abelhas (Fig. 2A), ao qual foi acoplado um frasco de plástico contendo álcool 70%, em volume suficiente para que cerca de 5 mm de álcool cobrisse as abelhas coletadas (Fig. B) (Teixeira e Message 2010). Foram coletadas no mínimo 30 operárias campeiras por colônia. As abelhas forrageadoras foram coletadas para obtenção dos esporos de *N. ceranae*, por serem mais velhas, apresentando, provavelmente, maior número de esporos que os demais membros da colônia (Meana *et al.* 2010).

Em laboratório, os abdomens das abelhas foram separados do restante do corpo, com o intuito de reduzir contaminações ou futuros problemas com a extração de DNA e reação de PCR e, posteriormente, macerados (Fig. 2C). Em seguida o material foi filtrado em camadas de algodão para remoção de partículas grosseiras e, posteriormente, filtrado em papel de filtro (poros de 14 μm) para obtenção dos esporos. A solução contendo os esporos foi recebida em tubos cônicos de 50 mL estéreis. A contagem do número de esporos do microsporídeo foi realizada imediatamente após a obtenção dos esporos, adotando-se o procedimento de agitação vigorosa em vórtex, imediatamente antes da contagem. Transferiu-se uma alíquota dessa solução devidamente homogeneizada para Câmara de Neubauer com micropipeta. A contagem foi efetuada em microscopia de luz (aumento de 400 x) (Fig. 2D) (Cantwell 1970).



FIG. 2. Obtenção de esporos do microsporídio *Nosema ceranae*. A - Coleta de abelhas *Apis mellifera* africanizadas campeiras com sugador portátil em colônia Langstroth. B - Recipiente de plástico com álcool 70% contendo no mínimo 30 abelhas coletadas. C - Abdomens de abelhas *Apis mellifera* africanizadas macerados com bastão de vidro. D - Detalhe dos esporos de *Nosema ceranae* liberados após maceração e filtragem visualizados em microscopia de luz (aumento de 400 x).

Paenibacillus larvae

Uma solução de esporos da bactéria *P. larvae* foi fornecida pelo Laboratório Nacional Agropecuário do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (LANAGRO/MAPA, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil). Meio de cultura específico *Paenibacillus larvae larvae* ágar (PLA) (Schuch *et al.* 2001; Brasil 2003) foi utilizado para quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC) (Fig. 3).

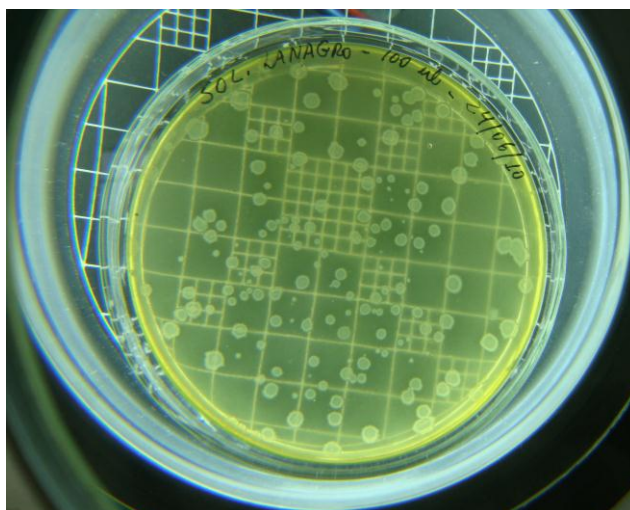


FIG. 3. Contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) da bactéria *Paenibacillus larvae* após cultivo em meio de cultura *Paenibacillus larvae larvae* ágar (PLA).

2.2. Preparação das amostras de mel positivas para os patógenos alvo e extração de DNA

Amostras de mel utilizadas foram esterilizadas em bomba de cobalto no Departamento de Genética, da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Os recipientes contendo o mel estéril foram mantidos em banho maria (45 °C) por tempo necessário para reduzir a viscosidade e permitir uma melhor homogeneização do mel (Schuch *et al.* 2001; Brasil 2003). Em seguida, alíquotas de 20 mL de mel foram transferidas para tubos cônicos estéreis de 50 mL. Posteriormente, alíquotas com diferentes concentrações (ver abaixo no *item* 2.3) de cada um dos patógenos foram inoculadas no mel estéril (Piccini *et al.* 2002; Martínez *et al.* 2010, modificados). A cada tubo com mel contaminado adicionou-se 30 mL de água destilada estéril (adaptado de Schuch *et al.* 2001; Brasil 2003). Após esse

procedimento, a mistura formada de água com mel contaminado foi cuidadosamente homogeneizada.

Para concentrar os esporos dos patógenos alvo, a mistura homogeneizada foi centrifugada a $10.000 \times g$ por 40 minutos à $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente, em recipiente específico, para posterior autoclavagem e o “*pellet*” foi suspenso para volume final de 1,5 mL com água destilada estéril (adaptado de Schuch *et al.* 2001; Brasil 2003).

Os “*pellets*” contendo esporos foram congelados em nitrogênio líquido e macerados com ponteira de micropipeta fechada estéril, visando quebrar a parede dos esporos (Klee *et al.* 2007). O DNA foi extraído usando o DNeasy® Plant Mini Extraction Kit (Qiagen) seguindo as orientações do fabricante e mantidos em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso nos ensaios de PCR.

2.3. Otimização e sensibilidade da PCR monoespecífica e multiplex

Para aferir a sensibilidade qualitativa da PCR monoespecífica e multiplex em detectar concentrações mínimas de esporos presentes no mel, inoculou-se esse produto apícola com diferentes concentrações de esporos (de *A. apis* e de *N. ceranae*) ou de UFC (de *P. larvae*). As concentrações testadas foram: 0, 0,1, 1, 10, 100 e 1.000 esporos ou UFC por mL de mel. Quando a análise foi realizada por meio da PCR multiplex todos os patógenos em suas respectivas concentrações encontravam-se presentes em uma única alíquota de mel estéril, totalizando volume final de 20 mL. Análise de PCR também foi realizada individualmente para cada um dos patógenos em suas respectivas concentrações. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os primers utilizados nas reações de PCR encontram-se apresentados na Tabela 1. A reação de 15 μ L da PCR monoespecífica contou com 7,5 μ L de master-mix (Promega), 5,5 μ L de água (Promega), 1,0 μ L de DNA template e 0,5 μ L de cada primer (10 μ M). A reação de 30 μ L da PCR multiplex, contou com 15 μ L de master-mix (Promega), 7 μ L de água, 5,0 μ L de DNA template extraído simultaneamente a partir de mel contaminado e 0,5 μ L de cada primer (10 μ M).

O programa utilizado para amplificação foi composto inicialmente de uma etapa de desnaturação a 94 °C por 2 min. Em seguida, 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 58 °C por 30 seg e 72 °C por 1 min, além de uma extensão final a 72 °C por 5 min. Controles negativos consistiam da extração feita a partir de mel estéril (submetidos à bomba de cobalto) sem adição dos patógenos.

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio. Marcador de 100 pb (Promega) foi utilizado para identificar os produtos gerados pela PCR.

TABELA 1. Primers utilizados nas reações de PCR mono específica e multiplex.

Patógeno	Primer	Sequência do primer (5' – 3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
<i>Ascospaera apis</i>				
Forward	AscoF3	GCACTCCCACCCTTGTCTA	485	Murray <i>et al.</i> (2005)
Reverse	AapisR3	CCCCTAGAAAGTAAATGATGGTTA		
<i>Nosema ceranae</i>				
Forward	218MITOC	CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA	218	Martín-Hernández <i>et al.</i> (2007)
Reverse	218MITOC	CCCGGTCATTCTCAAACAAAAAACCG		
<i>Paenibacillus larvae</i>				
Forward	P15	CGAGCGGACCTTGTGTTTCC	700	Piccini <i>et al.</i> (2002)
Reverse	P14	TCAGTTATAGGCCAGAAAGC		

2.4. Coleta e análise das amostras de mel

Amostras de mel oriundas de alguns estados do Brasil foram utilizadas para validar a PCR multiplex, bem como para realizar uma avaliação preliminar da distribuição dos patógenos (*A. apis*, *N. ceranae* e *P. larvae*) nas áreas onde ocorreram as coletas.

De um total de 120 amostras, três grupos (apiário, apicultor e comércio) foram formados de acordo com sua procedência. O número de amostras, bem como as características de cada grupo encontram-se descritas a seguir:

Apiário

Entre 2008 e 2010 amostras de mel foram coletadas diretamente de colônias em apiários pertencentes a apicultores voluntários que tinham interesse em colaborar com a pesquisa. Em cada apiário, colônias (1 a 18) foram selecionadas arbitrariamente sem critérios pré-definidos, como por exemplo, número de colônias/apiário e aspecto sanitário das colônias. De cada colônia, um quadro de ninho com crias e preferencialmente mel operculado foi selecionado para retirada de um pedaço do favo de aproximadamente 30 cm² contendo mel (Fig. 4AB). Os pedaços de favo com mel foram acondicionados em frascos de plástico (500 mL) identificados e colocados em seguida em sacos de plástico (Teixeira e Message 2010).

Amostras compostas foram preparadas quando duas ou mais colônias foram amostradas em um mesmo apiário. Na formação desses “*pools*”, foram contempladas

para cada apiário, todas as colônias em partes iguais. As amostras de mel assim obtidas foram homogêneas, não sendo considerado, neste caso, o fator colônias.

Ao longo dos dois anos, 40 amostras foram formadas, as quais foram provenientes de 24 municípios e três estados do Brasil (apêndice *c*). Para catalogação dessas amostras, utilizou-se formulário, cujo modelo é utilizado pela APTA (Teixeira e Message 2010, modificado), apresentado no apêndice *b*.

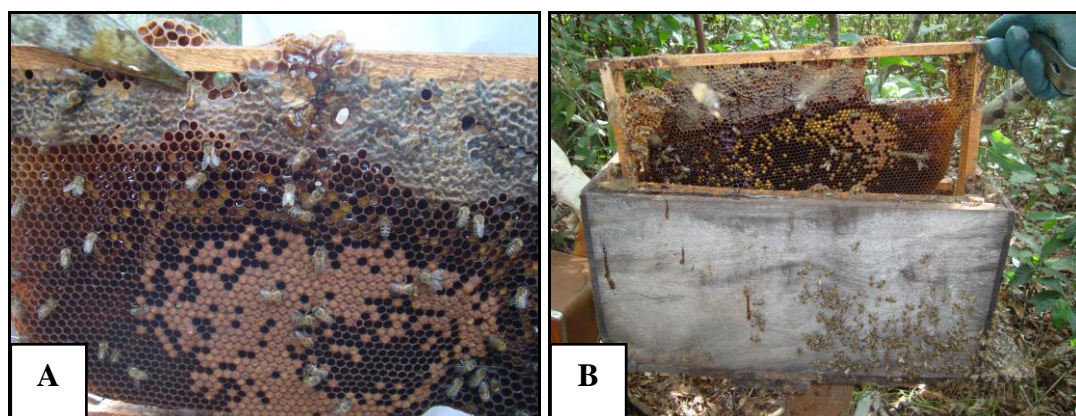


FIG. 4. Quadro de ninho de colônia racional (Langstroth) de abelhas *Apis mellifera* africanizadas selecionado para coleta de amostras (A) e pedaço de favo com mel operculado retirado da parte superior do quadro (B).

Apicultor

Entre 2001 e 2010, 40 amostras foram obtidas de doações de apicultores ou adquiridas em pontos de comércio. Essas amostras foram alocadas neste grupo por serem desprovidas de marca comercial registrada. Para a catalogação das amostras sob essas condições, todas as informações que constavam na embalagem ou que foram fornecidas pelo apicultor foram devidamente registradas. As amostras foram obtidas de 34 municípios distribuídos em 12 estados brasileiros (apêndice *d*).

Comércio

Obtidas entre 2007 e 2010, essas amostras foram assim caracterizadas por terem sido adquiridas no comércio e serem provenientes de entrepostos submetidos a algum tipo de inspeção. A catalogação das amostras foi realizada compilando-se todas as informações que constavam no rótulo do produto. As 40 amostras deste grupo são provenientes de 38 municípios pertencentes a quatro estados do Brasil (apêndice *e*).

A retirada de alíquotas das amostras, bem como a extração de DNA foi realizada conforme descrito no item 2.2. Um mapa com a representação da distribuição geográfica destes municípios (Fig. 4) foi elaborado com o Programa DIVA-GIS utilizando-se coordenadas geográficas de cada município (IBGE 2010).

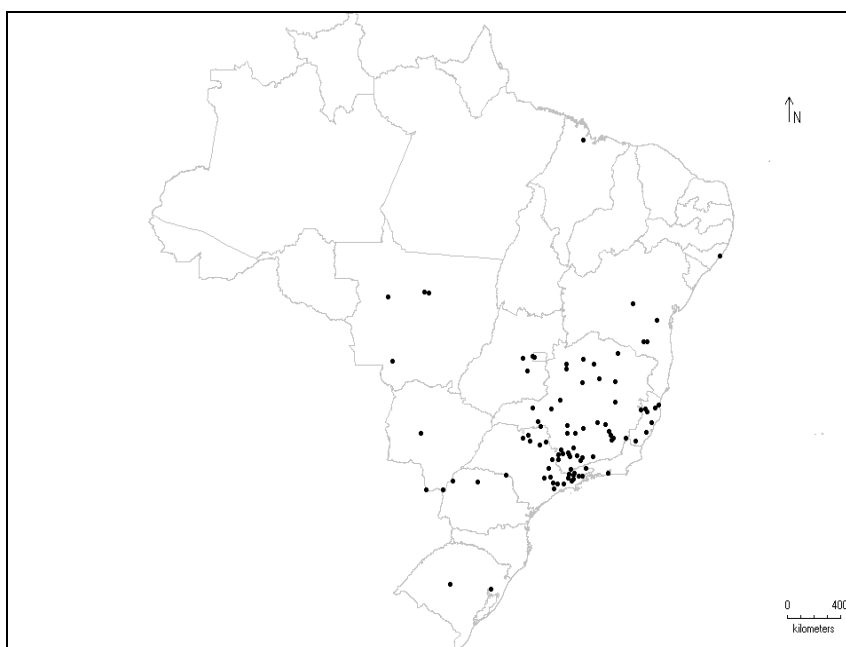


FIG. 4. Distribuição geográfica dos 94 municípios brasileiros de origem das amostras de mel.

3. RESULTADOS

3.1. Sensibilidade da PCR mono específica e multiplex na detecção de esporos em mel

Os primers utilizados em ambas as reações de PCR (mono específica e multiplex) para amplificação de material genômico dos patógenos alvo mostraram-se eficientes gerando tamanhos de fragmentos esperados, sendo respectivamente 218, 485 e 700 pb para *N. ceranae*, *A. apis* e *P. larvae* (Fig. 5). Para a PCR multiplex não foi observado fragmentos inespecíficos quando os inúmeros primers estavam presentes em uma única reação.

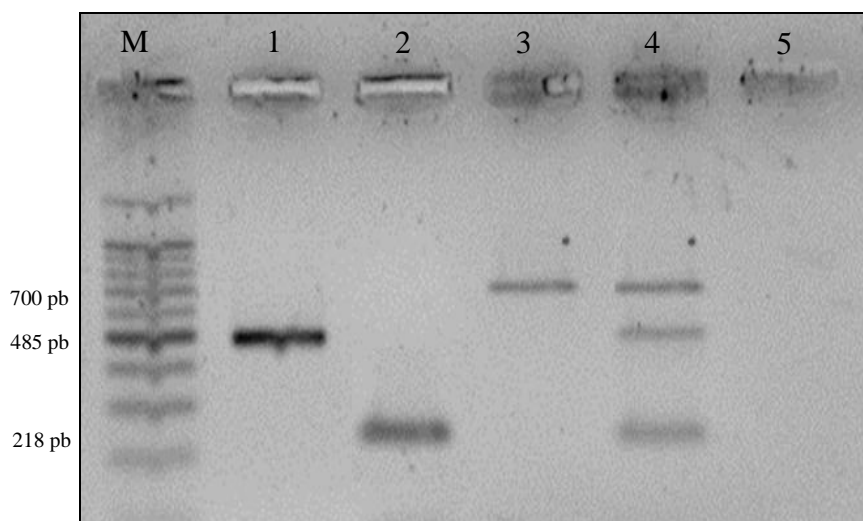


FIG. 5. Produtos da PCR mono específica e multiplex visualizados em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio, obtidos a partir de DNA extraído dos esporos dos patógenos. M - DNA tamanho padrão (Ladder 100 pb); 1 - *Ascospaera apis*; 2 - *Nosema ceranae*; 3 - *Paenibacillus larvae*; 4 - multiplex; 5 - controle negativo.

Ambas as PCR's (monoespecífica e multiplex) não detectaram as concentrações de 0,1 e 1 esporo ou UFC/mL de mel. Contudo, o limiar de detecção da PCR monoespecífica foi de 10 esporos para *A. apis* e de 10 UFC para *P. larvae*. O limiar de detecção da PCR multiplex foi de 10 UFC/mL de mel para *P. larvae* e de 100 esporos/mL de mel para *A. apis* e *N. ceranae* (Fig. 6A–C).

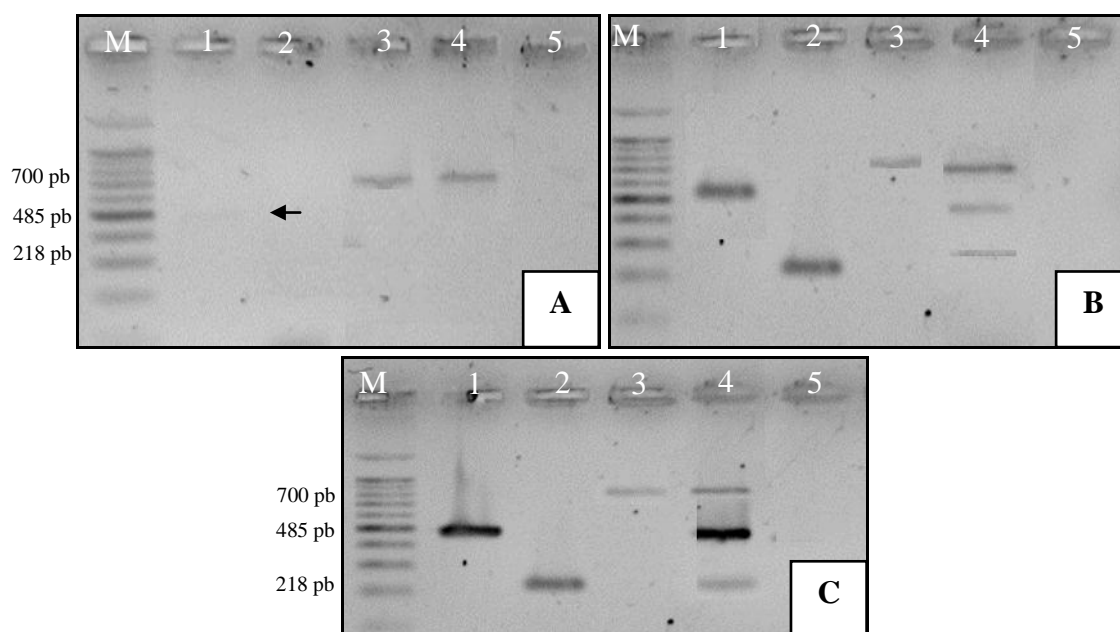


FIG. 6. Produtos da PCR monoespecífica e multiplex visualizados em gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio, obtidos a partir de DNA extraído de mel contaminado com 10 (A), 100 (B) e 1000 (C) esporos ou UFC dos patógenos. M - DNA tamanho padrão (Ladder 100 pb); 1 - *Ascosphaera apis*; 2 - *Nosema ceranae*; 3 - *Paenibacillus larvae*; 4 - multiplex; 5 - controle negativo. A seta aponta para o fragmento gerado pela amplificação de DNA obtido de 10 esporos de *A. apis*/mL de mel.

3.2. Análises das amostras de mel com PCR multiplex

Nesse estudo foram analisadas com a PCR multiplex padronizada 120 amostras de mel provenientes de 94 municípios distribuídos em 13 estados brasileiros (apêndices *c*, *d* e *e*). Nenhum dos referidos patógenos foi diagnosticado nas amostras analisadas. Entretanto, isso não exclui suas possíveis presenças em concentrações mínimas que a técnica padronizada foi capaz de detectar.

4. DISCUSSÃO

4.1. Sensibilidade da PCR mono-específica e multiplex na detecção de esporos em mel

Nesse trabalho foi padronizado um método para diagnosticar simultaneamente três importantes patógenos (*A. apis*, *N. ceranae* e *P. larvae*) de abelhas *A. mellifera* em mel. A PCR multiplex padronizada para o diagnóstico destes patógenos foi validada por ser precisa e sensível, obtendo produtos de tamanho esperado. Além da padronização do método, outro fator de grande importância foi a ausência da geração de primer-dimers na reação de PCR multiplex.

A principal vantagem da técnica adotada é a amplificação simultânea de vários ácidos nucleicos em uma única reação. Isso sem dúvida contribui de maneira marcante quando se tem um grande volume de amostras para serem analisadas.

Levando em consideração que os patógenos podem estar dentre as principais possíveis causas do inexplicável desaparecimento e/ou declínio das abelhas melíferas em diversos países do mundo, técnicas como a PCR multiplex constitui-se em uma importante ferramenta que poderia auxiliar na elucidação das causas envolvidas.

Em se tratando de protocolos PCR multiplex para detecção de patógenos de abelhas melíferas, até o momento, todos os que foram padronizados utilizam somente abelhas como fonte de material biológico. Neste sentido, há PCR multiplex para detecção simultânea dos vírus ABPV, BQCV e SBV (Topley *et al.* 2005; Grabensteiner *et al.* 2007), ABPV, BQCV e DWV (Teixeira *et al.* 2008a) e também

para *N. apis* e *N. ceranae* (Martín-Hernández *et al.* 2007; Hamiduzzaman *et al.* 2010).

Nesse trabalho é apresentado pela primeira vez o protocolo de uma técnica rápida e sensível para o diagnóstico molecular de *A. apis* em mel. Para o diagnóstico desse fungo em mel, havia apenas o método microbiológico desenvolvido por Anderson *et al.* (1997). A PCR havia sido utilizada para detectar a presença desse fungo em amostras de mel da Argentina, mas sem ter sua sensibilidade aferida (Reynaldi *et al.* 2003). A PCR multiplex padronizada mostrou-se sensível no diagnóstico de *A. apis* em mel, constituindo-se como uma importante ferramenta para auxiliar no controle da disseminação desta enfermidade.

O limiar de detecção da PCR monoespecífica para *A. apis* foi 10 esporos/mL de mel, entretanto, o limiar da PCR multiplex foi de 100 esporos. Provavelmente essa redução da sensibilidade ocorre por haver uma “competição” entre primers quando inúmeros deles estão presentes em única reação.

O mel é um importante meio para disseminação do agente etiológico da nosemose pelo mundo (Malone *et al.* 2001; Giersch *et al.* 2009), porém não haviam técnicas padronizadas que detectassem a presença de *N. ceranae* nesse produto. Este trabalho é pioneiro quanto à padronização de técnicas para o diagnóstico molecular de *N. ceranae* em mel. Previamente a esse estudo, havia um duplex-PCR padronizado por Martín-Hernández *et al.* (2007), cuja sensibilidade é de 2000 esporos/100 µL de reação para *N. ceranae* a partir de DNA obtido de macerado de abelhas. Recentemente, Hamiduzzaman *et al.* (2010) publicaram uma melhoria para a técnica de Martín-Hernández *et al.* (2007), sendo que a sensibilidade do protocolo padronizado por esses autores foi de 50.000 esporos/abelha, sem discriminar as espécies de *Nosema*.

A rápida expansão de *N. ceranae* pelo mundo ocorreu provavelmente com a comercialização de mel. Portanto, técnicas como a que é apresentada neste trabalho, constitui-se como uma excelente ferramenta, rápida e sensível na detecção deste patógeno em mel.

Inúmeros são os protocolos disponíveis para o diagnóstico de *P. larvae* em produtos apícolas (uma lista é fornecida por De Graaf *et al.* 2006). Em mel, o primeiro protocolo molecular foi fornecido por Bakonyi *et al.* (2003). A sensibilidade da PCR usando inúmeros primers foi determinada por diluições de DNA isolado diretamente das colônias da bactéria. Alguns primers mostraram-se altamente sensíveis amplificando ácidos nucleicos oriundos de 0,05 UFC (Bakonyi *et al.* (2003).

O protocolo proposto por Martínez *et al.* (2010) foi altamente sensível na detecção de *P. larvae* em mel artificialmente contaminado. O RT-PCR foi sensível para formas vegetativas da bactéria, e valores superiores a 0,07 UFC/g de mel.

Em mel contaminado artificialmente, Bassi *et al.* (2010) compararam método microbiológico e molecular para o diagnóstico de *P. larvae*. Ambos os métodos foram sensíveis para valores superiores a 8 UFC/mL de mel contaminado. Os autores destacam que a PCR proporciona além da ausência de falsos-positivos uma rapidez para obtenção do resultado da análise (< 24 horas) quando comparado com o método microbiológico (oito dias).

Em nosso estudo, a PCR monoespecífica e a PCR multiplex detectaram praticamente o mesmo número de UFC daquela utilizada por Bassi *et al.* (2010), porém inferior à de Martínez *et al.* (2010) que utilizaram outro tipo de PCR. A eficiência de detecção não foi reduzida quando além de DNA de *P. larvae* estava presente DNA de outros patógenos em uma mesma reação de PCR multiplex.

Provavelmente pela grande especificidade dos *primers* utilizados para amplificação do DNA desse patógeno.

Possivelmente a PCR multiplex padronizada neste trabalho pode ser aplicada na detecção destes patógenos em abelhas adultas e/ou outros produtos apícolas, com pequenas modificações. A padronização de tais técnicas analíticas pode significar importante contribuição na prevenção e no controle da disseminação dessas patologias de abelhas.

4.2. Diagnóstico molecular da presença de patógenos de *Apis mellifera* em amostras de mel

Esse estudo foi desenvolvido visando detectar a presença e conhecer a distribuição de três patógenos de abelhas *A. mellifera* em algumas regiões do Brasil. Este é o mais amplo estudo já conduzido no país com esse escopo. Todos os estudos já conduzidos no país foram realizados com o objetivo de detectar a presença e conhecer a distribuição da CPA. Notadamente que o fator que limitava um levantamento mais amplo se restringia aos métodos de diagnóstico baseados, principalmente, em testes bioquímicos e/ou microscópicos.

Em anos recentes o Brasil era considerado isento dos principais patógenos de abelhas melíferas. Entretanto, nas duas últimas décadas pelo menos três novos patógenos (*A. apis*, *P. larvae* e *N. ceranae*) foram reportados para o país. Provavelmente esses patógenos adentraram em território brasileiro em produtos apícolas fracionados, haja vista a fragilidade das barreiras sanitárias e os métodos de diagnóstico empregados. Nesse contexto, vale reforçar a importância de um diagnóstico rápido e seguro de patógenos em produtos apícolas. Com o método que

foi padronizado e é proposto nesse trabalho, a presença de patógenos em amostras de mel poderá ser detectada com rapidez e segurança, contribuindo para atenuar a disseminação desses agentes patogênicos.

Nesse estudo, não foi detectado a presença do fungo *A. apis* nas amostras analisadas. No Brasil, a presença desse agente etiológico causador da “cria giz” era reportada apenas para os estados de Minas Gerais (Castagnino *et al.* 2006a,b), Rio Grande do Sul (Sattler *et al.* 1998) e São Paulo (Rocha *et al.* 1998). Entretanto, o registro desse fungo no Brasil foi realizado somente a partir de amostras de abelhas doentes (sintomas típicos da “cria giz”) (Rocha *et al.* 1998; Sattler *et al.* 1998; Castagnino *et al.* 2006a,b). Provavelmente a introdução e disseminação de *A. apis* pelo território nacional ocorreram através de apicultura migratória e/ou da entrada de produtos contaminados, especialmente mel.

Embora não detectado nas amostras analisadas no presente trabalho, na Argentina esse fungo já foi detectado nesse produto apícola. Em 394 amostras de mel provenientes de inúmeros municípios daquele país, 51 (13%) delas foram positivas para o fungo *A. apis* (Reynaldi *et al.* 2003). A disseminação da enfermidade em território argentino ocorreu provavelmente através da apicultura migratória com o intuito de aumentar a produção de mel e/ou polinização de culturas agrícolas (Albo e Reynaldi 2010).

Diante da constatação da presença de *A. apis* em mel fica comprovado que este produto apícola pode ser um excelente veículo para disseminação da doença. Além do mel, a cera (Flores *et al.* 2005) e o pólen são outros produtos apícolas que pode abrigar esporos e se tornarem fonte de inóculo do parasita.

Apesar de sua ampla distribuição pelo mundo, problemas sanitários relacionando principalmente *A. apis* não têm sido reportados, embora um possível efeito sinérgico com outros parasitas ainda não tenha sido avaliado.

Esse estudo é o segundo no mundo que objetivou analisar a presença e conhecer a distribuição do microsporídeo *N. ceranae* utilizando o mel como possível fonte de inóculo. O primeiro foi desenvolvido recentemente na Austrália por Giersch *et al.* (2009) que analisaram com PCR amostras importadas e provenientes daquele país. Das 37 amostras que foram analisadas, três (8,1%) foram positivas para *N. ceranae* sendo que todas elas eram provenientes da Austrália. Os autores comentam que o patógeno que é de origem asiática foi provavelmente introduzido pelas importações de mel ou pólen. Nesse contexto, é oportuno mencionar que esporos de *N. apis* são viáveis dependendo do tempo de armazenamento e do tipo de mel (Malone *et al.* 2001). Assim, fica comprovado que o mel pode ter sido um importante veículo da rápida disseminação do parasita pelo mundo.

Apesar do avassalador número de publicações sobre a relação *N. ceranae* e *A. mellifera* que tem sido veiculado ultimamente, a epidemiologia do patógeno ainda é pouco conhecida. Recentemente foi documentado que o pólen pode ser contaminado com esporos de *N. ceranae* podendo ser mais uma fonte de inóculo para infecção e disseminação do patógeno (Higes *et al.* 2008). Na Europa, alguns estudos apontam que a disseminação do parasita pelo continente foi auxiliada por *Merops apiaster* (Coraciiformes: Meropidae), uma ave que se alimenta de abelhas melíferas (Higes *et al.* 2009d; Valera *et al.* 2010).

Este é o primeiro estudo amplo realizado no Brasil que versou a detecção de *N. ceranae* em amostras de mel, mas não foram detectados esporos com a mPCR padronizada. Em *A. mellifera* africanizadas, *N. ceranae* foi registrada previamente no

Brasil (Klee *et al.* 2007) e posteriormente na Costa Rica (Calderón *et al.* 2008). Neste último país, os autores argumentam que o patógeno provavelmente adentrou através de rainhas contaminadas que são comumente importadas. No Brasil, as melhores hipóteses que podem explicar a introdução de *N. ceranae* em território brasileiro são apicultura migratória comumente realizada entre o Brasil e países vizinhos como Argentina e Uruguai e a importação de produtos apícolas (cera, geléia real, mel, pólen etc.) de outros países com registro da doença. A presença de *N. ceranae* já foi registrada na Argentina e Uruguai (Invernizzi *et al.* 2009; Plischuk *et al.* 2009) e esporos desse patógeno têm sido detectado em mel (Giersch *et al.* 2009) e pólen (Higes *et al.* 2008), o que reforça a hipótese da forma como esse patógeno foi introduzido no Brasil.

Paenibacillus larvae é uma bactéria que apresenta ampla distribuição, sendo encontrada em praticamente todas as regiões que se pratica apicultura no mundo (Ellis e Munn 2005). Nesse estudo, utilizando de PCR multiplex não foi detectada a presença de *P. larvae*. Embora não tenha sido detectada em amostras de mel oriundas de algumas regiões brasileiras no presente trabalho por meio da técnica de PCR multiplex, sua presença em território nacional não é novidade. O primeiro registro em abelhas adultas e favo de mel ocorreu no estado do Rio Grande do Sul (Schuch *et al.* 2003), quando os autores detectaram através de método microbiológico a presença da bactéria também em mel e pólen importados.

Em anos anteriores ao primeiro registro da doença no Brasil, alguns trabalhos já reportavam a presença de esporos de *P. larvae* em amostras de mel importadas. Costa (1995) analisou por meio de técnicas microbiológicas 16 amostras de mel importadas de diferentes países (Argentina, Espanha, Estados Unidos e Uruguai) e outras 355 provenientes de inúmeros estados brasileiros. Todas as amostras nacionais

foram negativas quanto à presença de *P. larvae*, porém, quatro daquelas importadas foram positivas para esse patógeno. Schuch *et al.* (2001) analisaram com método microbiológico 437 amostras de mel provenientes do Brasil e do exterior. Das 137 importadas em 24 (17,5%) delas foi detectada a presença de *P. larvae*.

Após ter sido documentada a presença de *P. larvae* em colônia de *A. mellifera* no Brasil (Schuch *et al.* 2003) alguns trabalhos foram desenvolvidos visando verificar a presença e distribuição da doença em apiários brasileiros. Gonçalves (2004) realizou um amplo estudo pelo estado do Piauí onde coletou amostras de 61 apiários. Utilizando método microbiológico no diagnóstico o autor não detectou a presença de *P. larvae* nas amostras analisadas. Em seu trabalho conduzido recentemente e restrito ao Sudeste brasileiro, Gonçalves (2008) não detectou *P. larvae* nas 14 amostras de mel que analisou.

No trabalho de Schuch *et al.* (2003) onde foi feito o primeiro registro da presença de *P. larvae* no Brasil, não foi constatado sintomas típicos da CPA na colônia amostrada. Recentemente foi reportado pela primeira vez colônias apresentando sintomas típicos da doença causada por *P. larvae* no estado do Paraná (Sattler 2010). Neste caso isolado, vale destacar que medidas foram tomadas para tentar conter o surto de disseminação da doença (Sattler 2010).

Neste contexto de conter a disseminação do patógeno, cabe mencionar que medidas preventivas poderiam ter sido tomadas para evitar a disseminação dessa doença, haja vista que a bactéria *P. larvae* já havia sido encontrada em mel importado comercializado no Brasil (Costa 1995).

No estudo conduzido por Costa (1995) as amostras positivas para *P. larvae* eram provenientes da Espanha e Uruguai, o que reforça a hipótese de que a doença pode ter adentrado no Brasil por meio de produtos apícolas contaminados ou através

da apicultura migratória realizada com países vizinhos ao nosso como Argentina e Uruguai. A epidemiologia de *P. larvae* em território argentino foi estudada por Alippi *et al.* (2004) que colheram amostras de mel ao longo de três anos consecutivos (1999–2001). Das 394 amostras analisadas, 219 (55,6%) apresentaram esporos viáveis da bactéria. Com esse mesmo propósito, Antúnez *et al.* (2004) conduziram investigação versando conhecer a distribuição de *P. larvae* em território uruguaio. Para tanto, combinaram métodos microbiológicos e moleculares para um diagnóstico eficiente, sendo que das 101 amostras de mel analisadas, 52 (51,5%) foram positivas para o patógeno.

Conhecer a epidemiologia de *P. larvae* é extremamente importante, pois a colônia pode demorar alguns anos para manifestar os sintomas típicos da doença, muito embora o número de esporos esteja continuamente aumentando durante esse período (Hansen e Hasmussen 1986). Com a doença permanecendo praticamente inerte na colônia, a comercialização do mel e as práticas de manejo empregadas pelo apicultor tornam-se potenciais riscos para disseminação da bactéria (Lindström *et al.* 2008).

Nos últimos cinco anos a apicultura nacional vem sofrendo perdas com o desaparecimento incomum de abelhas e quedas na produção. Desde então inúmeros estudos relacionados à sanidade apícola brasileira passaram a ser desenvolvidos, cujo escopo é contribuir para o esclarecimento das possíveis causas. Assim, nesse período de bruscas perdas econômicas com a produção apícola detectou-se novos patógenos nas abelhas melíferas do Brasil: *N. ceranae* (Klee *et al.* 2007) e os vírus ABPV, BQCV e DWV (Teixeira *et al.* 2008a), mas suas relações com o desaparecimento das abelhas ainda não são conclusivas.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- A PCR multiplex padronizada para o diagnóstico de múltiplos patógenos de *A. mellifera* foi eficaz na detecção simultânea de *A. apis*, *N. ceranae* e *P. larvae* em mel.
- O limiar de detecção da PCR monoespecífica foi de 10 UFC/mL de mel para *P. larvae* e de 10 e 100 esporos/mL de mel para *A. apis* e *N. ceranae*, respectivamente.
- O limiar de detecção da PCR multiplex foi de 10 UFC/mL de mel para *P. larvae*, e de 100 esporos/mL de mel para *A. apis* e *N. ceranae*.
- O emprego da PCR multiplex é uma alternativa eficaz, prática e rápida para estudos epidemiológicos dos referidos patógenos de *A. mellifera*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aizen, M. A., and L. D. Harder. 2009. The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Curr. Biol.* **19**:915–918.

Albo, G. N., and F. J. Reynaldi. 2010. *Ascosphaera apis*, agente etiológico de la cría yesificada de las abejas. *Rev. Argent. Microbiol.* **42**:80.

Alippi, A. M., A. C. López, and O. M. Aguilar. 2004. A PCR-based method that permits specific detection of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of American Foulbrood of honey bees, at the subspecies level. *Lett. Appl. Microbiol.* **39**:25–33.

Alippi, A. M., F. J. Reynaldi, A. C. López, M. R. De Giusti, and O. M. Aguilar. 2004. Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae larvae* and incidence of American foulbrood in Argentinean honeys from Buenos Aires province. *J. Apic. Res.* **43**:135–143.

Allen-Wardell, G., P. Bernhardt, R. Bitner, A. Burquez, S. Buchmann, J. Cane, P. A. Cox, V. Dalton, P. Feinsinger, M. Ingram, D. Inouye, C. E. Jones, K. Kennedy, P. Kevan, H. Koopowitz, R. Medellin, S. Medellin-Morales, G. P. Nabhan, B. Pavlik, V. Tepedino, P. Torchio, and S. Walker.

1998. The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. *Conserv. Biol.* **12**:8–17.

Anderson, D., H. Giaccon, and N. Gibson. 1997. Detection and thermal destruction of the chalkbrood fungus (*Ascosphaera apis*) in honey. *J. Apic. Res.* **36**:163–168.

Antúnez, K., B. D'Alessandro, C. Piccini, E. Corbella, and P. Zunino. 2004. *Paenibacillus larvae larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey. *J. Invertebr. Pathol.* **86**:56–58.

Aronstein, K. A., and K. D. Murray. 2010. Chalkbrood disease in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* **103**:S20–S29.

Bailey, L., and B. V. Ball. 1991. Honey bee pathology, 2nd ed. Academic Press, London, United Kingdom.

Bakonyi, T., I. Derakhshifar, E. Grabensteiner, and N. Nowotny. 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.

Bassi, S., E. Carra, E. Carpana, G. L. Paganelli, and S. Pongolini. 2010. A scientific note on the detection of spores of *Paenibacillus larvae* in naturally and

artificially contaminated honey: comparison of cultural and molecular methods. *Apidologie* **41**:425–427.

Behrens, D., E. Forsgren, I. Fries, and R. F. A. Moritz. 2010. Lethal infection thresholds of *Paenibacillus larvae* for honeybee drone and worker larvae (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* **12**:2838–2845.

Borneck, R., A. Viry, R. Martín-Hernández, and M. Higes. 2010. Honey bee colony losses in the Jura Region, France and related pathogens. *J. Apic. Res. and Bee World* **49**:334–336.

Borum, A. E., and M. Ulgen. 2008. Chalkbrood (*Ascosphaera apis*) infection and fungal agents of honey bees in North-West Turkey. *J. Apic. Res. and Bee World* **47**:171–172.

Brasil. 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Anexo, Capítulo XIX Pesquisa de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>. Acesso em: janeiro de 2011.

Brødsgaard, C. J., W. Ritter, and H. Hansen. 1998. Response of in vitro reared honey bee larvae to various doses of *Paenibacillus larvae larvae* spores. *Apidologie* **29**:569–578.

- Calderón, R. A., G. Rivera, L. A. Sánchez, and L. G. Zamora.** 2004. Chalkbrood (*Ascosphaera apis*) and some other fungi associated with Africanized honey bees (*Apis mellifera*) in Costa Rica. *J. Apic. Res.* **43**:187–188.
- Calderón, R. A., L. A. Sanchez, O. Yañez, and N. Fallas.** 2008. Presence of *Nosema ceranae* in Africanized honey bee colonies in Costa Rica. *J. Apic. Res. and Bee World* **47**:328–329.
- Cantwell, G. R.** 1970. Standard methods for counting *Nosema* spores. *Am. Bee J.* **110**:222–223.
- Carvalho, A. C. P., and D. Message.** 2004. A scientific note on the toxic pollen of *Stryphnodendron polyphyllum* (Fabaceae, Mimosoideae) which causes sacbrood-like symptoms. *Apidologie* **35**:89–90.
- Castagnino, G. L. B., D. Message, and R. W. Barreto.** 2006a. Primeiro relato da doença “cria-giz” em abelhas *Apis mellifera* no estado de Minas Gerais. *Ceres* **53**:234–236.
- Castagnino, G. L. B., S. R. C. Funari, E. Blume, M. Z. Arboitte, and M. N. Weber.** 2006b. Doença cria giz *Ascosphaera apis* (Maassen ex Claussen) Olive & Spiltoir em abelhas *Apis mellifera* L. na depressão central do Rio Grande do Sul. *Cienc. Rural* **36**:1909–1911.

Chauzat, M. P., M. Higes, R. Martín-Hernández, A. Meana, N. Cougoule, and J. P. Faucon. 2007. Presence of *Nosema ceranae* in French honey bee colonies. *J. Apic. Res.* **46**:127–128.

Chen, Y., J. D. Evans, I. B. Smith, and J. S. Pettis. 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J. Invertebr. Pathol.* **97**:186–188.

Chen, Y. P., J. D. Evans, C. Murphy, R. Gutell, M. Zuker, D. Gundensen-Rindale, and J. S. Pettis. 2009. Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **56**:142–147.

Costa, P. S. C. 1995. Cria Pútrida Americana: comparação de técnicas de detecção de esporos em mel e avaliação em amostras nacionais e importadas. MSc. thesis. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.

Costanza, R., R. d'Arge, R. de Groot, S. Farberk, M. Grasso, B. Hannon, K. Limburg, S. Naeem, R. V. O'Neil, J. Paruelo, R. G. Raskin, P. Suttonkk, and M. van den Belt. 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* **387**:253–269.

Cox-Foster, D. L., S. Conlan, E. C. Holmes, G. Palacios, J. D. Evans, N. A. Moran, P. L. Quan, T. Briese, M. Hornig, D. M. Geiser, V. Martinson, D. vanEngelsdorp, A. L. Kalkstein, A. Drysdale, J. Hui, J. Zhai, L. Cui, S. K.

Hutchison, J. F. Simons, M. Egholm, J. S. Pettis, and W. I. Lipkin. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* **318**:283–287.

De Graaf, D. C., H. Raes, G. Sabbe, P. H. De Rycke, and F. J. Jacobs. 1994. Early development of *Nosema apis* (Microspora: Nosematidae) in the midgut epithelium of the honeybee (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* **63**:74–81.

De Graaf, D. C., A. M. Alippi, M. Brown, J. D. Evans, M. Feldlaufer, A. Gregorc, M. Hornitzky, S. F. Pernal, D. M. T. Schuch, D. Titera, V. Tomkies, and W. Ritter. 2006. Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. *Lett. Appl. Microbiol.* **43**:583–590.

Ellis, J. D., and P. A. Munn. 2005. The worldwide health status of honey bees. *Bee World* **86**:88–101.

Flores, J. M., I. Gutiérrez, and R. Espejo. 2005a. The role of pollen in chalkbrood disease in *Apis mellifera*: transmission and predisposing conditions. *Mycologia* **97**:1171–1176.

Flores, J. M., M. Spivak, and I. Gutiérrez. 2005b. Spores of *Ascospaera apis* contained in wax foundation can infect honeybee brood. *Vet. Microbiol.* **108**:41–144.

Forsgren, E., and I. Fries. 2010. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Vet. Parasitol.* **170**:212–217.

Fries, I., and S. Camazine. 2001. Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie* **32**:199–214.

Fries, I., F. Feng, A. Silva, S. B. Slemenda, and N. J. Pieniasek. 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *Eur. J. Protistol.* **32**:356–365.

García-Palencia, P., R. Martín-Hernández, A. V. González-Porto, P. Marin, A. Meana, and M. Higes. 2010. Natural infection by *Nosema ceranae* causes similar lesions as in experimentally infected caged-workers honey bees (*Apis mellifera*). *J. Apic. Res.* **49**:278–283.

Genersch, E. 2010. American foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* **103**:S10–S19.

Genersch, E., E. Forsgren, J. Pentikäinen, A. Ashiralieva, S. Rauch, J. Kilwinski, and I. Fries. 2006. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:501–511.

Giersch, T., T. Berg, F. Galea, and M. Hornitzky. 2009. *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie* **40**:117–123.

Gillard, M., J. D. Charriere, and L. Belloy. 2008. Distribution of *Paenibacillus larvae* spores inside honey bee colonies and its relevance for diagnosis. *J. Invertebr. Pathol.* **99**:92–95.

Gochnauer, T. A., and J. Corner. 1974. Detection and identification of *Bacillus larvae* in a commercial sample of bee-collected pollen. *J. Apic. Res.* **13**:265–267.

Gonçalves, J. C. 2004. Avaliação de esporos *Paenibacillus* subsp. *larvae* em mel de apiários do estado do Piauí e de método de detecção. MSc. thesis. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.

Gonçalves, J. C. 2008. Mecanismos de defesa comportamental e anatômico contra doenças e ectoparasitas em abelhas africanizadas (*Apis mellifera*). Ph.D. thesis Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil.

Govan, V. A., M. H. Allsopp, and S. Davison. 1999. A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2243–2245.

Grabensteiner, E., T. Bakonyi, W. Ritter, H. Pechhacker, and N. Nowotny. 2007. Development of a multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of

three viruses of the honeybee (*Apis mellifera* L.): *Acute bee paralysis virus*, *Black queen cell virus* and *Sacbrood virus*. J. Invertebr. Pathol. **94**:222–225.

Hale, P. J., and D. M. Menapace. 1980. Effect of time and temperature on the viability of *Ascospaera apis*. J. Invertebr. Pathol. **36**:429–430.

Hamiduzzaman, M. M., E. Guzman-Novoa, and P. H. Goodwin. 2010. A multiplex PCR assay to diagnose and quantify *Nosema* infections in honey bees (*Apis mellifera*). J. Invertebr. Pathol. **105**:151–155.

Hansen, H. 1984. Methods for determining the presence of the foulbrood bacterium *Bacillus larvae*. Tidsskr. Planteavl **88**:325–328.

Hansen, H., and C. J. Brødsgaard. 1999. American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. Bee World **80**:5–23.

Hansen, H., and B. Rasmussen. 1986. The investigation of honey from bee colonies for *Bacillus larvae*. Tidsskr. Planteavl **90**:81–86.

Haseman, L. 1961. How long can spores of American foulbrood live? Am. Bee J. **101**:298–299.

Heath, L. A. F. 1982. Chalk brood pathogens: a review. Bee World **63**:130–135.

Higes, M., R. Martín, A. Sanz, N. Alvarez, A. Sanz, M. P. García, and A. Meana. 2005. El síndrome de despoblamiento de las colmenas en España. Consideraciones sobre su origen. *Vida Apícola* **133**:15–21.

Higes, M., R. Martín, and A. Meana. 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J. Invertebr. Pathol.* **92**:93–95.

Higes, M., P. García-Palencia, R. Martín-Hernández, and A. Meana. 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invertebr. Pathol.* **94**:211–217.

Higes, M., R. Martín-Hernández, E. Garrido-Bailón, P. García-Palencia, and A. Meana. 2008. Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *J. Invertebr. Pathol.* **97**:76–78.

Higes, M., R. Martín-Hernández, P. García-Palencia, P. Marín, and A. Meana. 2009a. Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (Microsporidia) from worker honeybees to queens (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol. Rep.* **1**:495–498.

Higes, M., R. Martín-Hernández, E. Garrido-Bailón, C. Botías, and A. Meana. 2009b. The presence of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in North African honey bees (*Apis mellifera intermissa*). *J. Apic. Res. and Bee World* **48**:217–219.

Higes, M., R. Martín-Hernández, E. Garrido-Bailón, A. V. González-Porto, P. García-Palencia, A. Meana, M. J. del Nozal, R. Mayo, and J. L. Bernal.

2009c. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ. Microbiol. Rep.* **1**:110–113.

Higes, M., R. Martín-Hernández, E. Garrido-Bailón, C. Botías, P. García-

Palencia, and A. Meana. 2009d. Regurgitated pellets of *Merops apiaster* as fomites of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores. *Environ. Microbiol.* **10**:1374–1379.

Higes, M., R. Martín-Hernández, A. Martínez-Salvador, E. Garrido-Bailón,

A. V. González-Porto, A. Meana, J. L. Bernal, M. J. del Nozal, and J. Bernal.

2010. A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environ. Microbiol. Rep.* **2**:243–250.

IBGE. 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/>. Acesso em: janeiro de 2011.

Invernizzi, C., C. Abud, I. H. Tomasco, J. Harriet, G. Ramallo, J. Campá, H.

Katz, G. Gardiol, and Y. Mendoza. 2009. Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *J. Invertebr. Pathol.* **101**:150–153.

James, R. R., and J. S. Skinner. 2005. PCR diagnostic methods for

Ascospaera infections in bees. *J. Invertebr. Pathol.* **90**:98–103.

Klee, J., A. M. Besana, E. Genersch, S. Gisder, A. Nanetti, D. Q. Tam, T. X. Chinh, F. Puerta, J. M. Ruz, P. Kryger, D. Message, F. Hatjina, S. Korpela, I. Fries, and R. J. Paxton. 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* **96**:1–10.

Klein, A.-M., B. E. Vaissière, J. H. Cane, I. Steffan-Dewenter, S. A. Cunningham, C. Kremen, and T. Tschardt. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* **274**:303–313.

Koenig, J. P., G. M. Boush, and E. H. Erickson, Jr. 1987. Isolation of the chalkbrood pathogen, *Ascosphaera apis*, from honey bee (*Apis mellifera*) surfaces, pollen loads, and a water source. *Am. Bee J.* **127**:581–583.

Lauro, F. M., M. Favaretto, L. Covolo, M. Rattu, and G. Bertoloni. 2003. Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *Int. J. Food Microbiol.* **81**:195–201.

Lindström, A., S. Korpela, and I. Fries. 2008. Horizontal transmission of *Paenibacillus larvae* spores between honey bee (*Apis mellifera*) colonies through robbing. *Apidologie* **39**:515–522.

Malone, L. A., H. S. Gatehouse, and E. L. Tregidga. 2001. Effects of time, temperature, and honey on *Nosema apis* (Microsporidia: Nosematidae), a parasite

of the honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). J. Invertebr. Pathol. **77**:258–268.

Martín-Hernández, R., A. Meana, L. Prieto, A. M. Salvador, E. Garrido-Bailón, and M. Higes. 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. Appl. Environ. Microbiol. **73**:6331–6338.

Martínez, J., V. Simon, B. Gonzalez, and P. Conget. 2010. A real-time PCR-based strategy for the detection of *Paenibacillus larvae* vegetative cells and spores to improve the diagnosis and the screening of American foulbrood. Lett. Appl. Microbiol. **50**:603–610.

Meana, A., R. Martín-Hernández, and M. Higes. 2010. The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. J. Apic. Res. **49**:212–214.

Mehr, Z., D. M. Menapace, W. T. Wilson, and R. R. Sackett. 1976. Studies on the initiation and spread of chalkbrood within an apiary. Am. Bee J. **116**:266–268.

Message, D. 1997. Management and disease problems of Africanized bees in Brazil. The Central Associations of Beekeepers, England, United Kingdom.

Moeller, F. E., and P. H. Williams. 1976. Chalkbrood research at Madison, Wisconsin. Am. Bee J. **116**:484–495.

Morse, R. A., and N. W. Calderone. 2000. The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in 2000. *Bee Culture* **128**:1–15.

Murray, K. D., K. A. Aronstein, and W. A. Jones. 2005. A molecular diagnostic method for selected *Ascosphaera* species using PCR amplification of internal transcribed spacer regions of rDNA. *J. Apic. Res.* **44**:61–64.

Muz, M. N., A. O. Girisgin, D. Muz, and L. Aydin. 2010. Molecular detection of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infections in Turkish apiaries with collapsed colonies. *J. Apic. Res. and Bee World* **49**:342.

Nascimento, C. B. 1970. Pesquisa de endo e ecto-parasitos de *Apis mellifera* L., p. 199–207. Abstr. 1st Congresso Brasileiro de Apicultura. Florianópolis, SC.

Oldroyd, B. P. 2007. What's killing American honey bees? *Plos Biol.* **5**:e168.

Palacio, M. A., E. Rodriguez, L. Gonçalves, E. Bedascarrasbure, and M. Spivak. 2010. Hygienic behaviors of honey bees in response to brood experimentally pin-killed or infected with *Ascosphaera apis*. *Apidologie* **41**:602–612.

Paxton, R. J., J. Kleea, S. Korpelab, and I. Fries. 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* **38**:558–565.

Pettis, J., D. Vanengelsdorp, and D. Cox-Foster. 2007. Colony collapse disorder working group pathogen sub-group progress report. *Am. Bee J.* **147**:595–597.

Piccini, C., B. D’Alessandro, K. Antúnez, and P. Zunino. 2002. Detection of *Paenibacillus larvae* subspecies *larvae* spores in naturally infected bee larvae and artificially contaminated honey by PCR. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **18**:761–765.

Plischuk, S., R. Martín-Hernández, L. Prieto, M. Lucía, C. Botías, A. Meana, A. H. Abrahamovich, C. Lange, and M. Higes. 2009. South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol. Rep.* **1**:1–5.

Rehner, S. A., and J. D. Evans. 2009. Microsatellite loci for the fungus *Ascospaera apis*: cause of honey bee chalkbrood disease. *Mol. Ecol. Resour.* **9**:855–858.

Reynaldi, F. J., A. C. Lopez, G. N. Albo, and A. M Alippi. 2003. Differentiation of *Ascospaera apis* isolates by rep-PCR fingerprinting and determination of chalkbrood incidence in Argentinean honey samples. *J. Apic. Res.* **42**:68–76.

Rocha, H. C., E. Bagagli, and S. R. C. Funari. 1998. Identificação do fungo *Ascosphaera apis* em colméias de abelhas *Apis mellifera* L. no estado de São Paulo - SP, p. 247. Abstr. 12nd Congresso Brasileiro de Apicultura. Salvador, BA.

Rothenbuler, W. C. 1964. Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. IV. Responses of F₁ and backcross generations to disease-killed brood. *Am. Zool.* **4**:111–123.

Ryba, S., D. Titera, M. Haklova, and P. Stopka. 2009. A PCR method of detecting American foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in winter beehive wax debris. *Vet. Microbiol.* **139**:193–196.

Sattler, A. 2010. Mortandade de abelhas em ambiente de abelhas africanizadas. Abstr. 18th Congresso Brasileiro de Apicultura. Cuiabá, MT.

Sattler, A., M. S. Disconzi, V. Duarte, and J. R. P. Silveira. 1998. Ocorrência de cria giz *Ascosphaera apis* em abelhas *Apis mellifera* L. de apiários no Rio Grande do Sul, p. 257. Abstr. 12th Congresso Brasileiro de Apicultura. Salvador, BA.

Schuch, D. M. T., R. H. Madden, and A. Sattler. 2001. An improved method for the detection and presumptive identification de *Paenibacillus larvae* spores in honey. *J. Apic. Res.* **40**:59–64.

Schuch, D. M. T., L. G. Tochetto, and A. Sattler. 2003. Isolamento de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* no Brasil. *Pesqui. Agropecu. Bras.* **38**:441–444.

Spiltoir, C. F., and L. S. Olive. 1955. A reclassification of the genus *Pericystis* Betts. *Mycologia* **47**:238–244.

Spivak, M., and G. S. Reuter. 2001. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* **32**:555–565.

Stokstad, E. 2007. The case of the empty hives. *Science* **316**:970–972.

Teixeira, É. W., and D. Message. 2010. Abelhas, pp. 175–213. *In* Marques, G. H. F., J. C. A. Pompei, and M. Martini [eds.], *Manual veterinário de colheita e envio de amostras. PANAFTOSA - OPAS/OMS*, Rio de Janeiro, Brazil.

Teixeira, É. W., Y. Chen, D. Message, J. Pettis, and J. D. Evans. 2008a. Virus infections in Brazilian honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* **99**:117–119.

Teixeira, É. W., D. Message, Y. Chen, J. S. Pettis, and J. D. Evans. 2008b. First metagenomic analysis of microorganisms in honey bees from Brazil. *Bol. Ind. Anim.* **65**:355–361.

Topley, E., S. Davison, N. Leat, and M. Benjeddou. 2005. Detection of three

honeybee viruses simultaneously by a single Multiplex Reverse Transcriptase PCR. *Afr. J. Biotechnol.* **4**:763–767.

Valera, F., R. Martín-Hernández, and M. Higes. 2010. Evaluation of large-scale dissemination of *Nosema ceranae* spores by European bee-eaters *Merops apiaster*. *Environ. Microbiol. Rep.* **3**:47–53.

Van Emmelen, A. 1952. *Cartilha do apicultor brasileiro; abelhas, mel e cera*, 5th ed. Chácaras e Quintais, São Paulo, Brazil.

vanEngelsdorp, D., J. Hayes Jr., R. M. Underwood, and J. Pettis. 2008. A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. *Plos One* **3**:e4071.

vanEngelsdorp, D., J. Hayes Jr, R. M. Underwood, and J. S. Pettis. 2010. A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. *J. Apic. Res.* **49**:7–14.

Watanabe, M. E. 1994. Pollination worries rise as honey bees decline. *Science* **265**:1170.

Webster, T. C., K. W. Pomper, G. Hunt, E. M. Thacker, and S. C. Jones. 2004. *Nosema apis* infection in worker and queen *Apis mellifera*. *Apidologie* **35**:49–54.

Webster, T. C., E. M. Thacker, K. Pomper, J. Lowe, and G. Hunt. 2008. *Nosema apis* infection in honey bee (*Apis mellifera*) queens. J. Apic. Res. and Bee World **47**:53–57.

Williams, G. R., A. B. A. Shafer, R. E. L. Rogers, D. Shutler, and D. T. Stewart. 2008. First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. J. Invertebr. Pathol. **97**:189–192.

7. APÊNDICE

(a)

Preparação do meio de cultura BCA para cultivo de *Ascospaera apis*

Para preparar o meio de cultura BCA (batata, cenoura e ágar bacteriológico), 20 g de pequenos pedaços de batata e cenoura foram acrescentados em 1 L de água destilada. Após cozer por aproximadamente 30 min o conteúdo foi filtrado. Para novamente completar o volume inicial (1 L) que foi perdido pela evaporação, lavagens com água destilada foram realizadas no recipiente onde as porções de batata e cenoura foram cozidas, e novamente procedeu-se uma filtragem até completar o volume inicial de 1 L. Após esse procedimento dilui-se nesse caldo 20 g de ágar bacteriológico.

O conteúdo foi dividido em alíquotas iguais em três erlenmeyres e auto-clavado por 15 min. Após esse procedimento, os erlenmeyres foram esterilizados em UV por 15 min. O meio de cultura contendo antibiótico (Rifamicina SV Sódica) foi vertido para placas de Petri limpas, auto-clavadas e esterilizadas. As placas de Petri contendo o meio de cultura foram esterilizadas por 15 min, e após transcorridos esse tempo, foram fechadas e envolvidas com papel filme.

Previamente a repicagem do fungo *Ascospaera apis*, placas de Petri com o meio de cultura, bem como todos os materiais foram esterilizados por 15 min. Após isso, os envelopes contendo as amostras de abelhas infectadas com o fungo foram abertos e pequenos pedaços das “múmias” foram transferidos para as placas de Petri. Após essa transferência, as placas de Petri foram novamente fechadas e envoltas por

papel filme. As placas de Petri foram mantidas em câmara climatizada (± 26 °C; $\pm 70\%$ de UR).

Diariamente o crescimento do fungo foi monitorado e quando constatou-se a produção de esporos, estes foram isolados e transferidos para outras placas seguindo os mesmos procedimentos como descrito anteriormente.

(b)

Modelo de formulário utilizado para catalogação das amostras coletadas

Data da coleta:	Amostra No.
-----------------	-------------

Formulário - coleta de amostras

Nome do

apicultor: _____

Localização do

Apiário: _____

Endereço para

correspondência _____

Telefone: _(____) _____

E-mail: _____

Identificação da

colônia: _____

(identifique a colônia de forma permanente e escreva essa identificação aqui)

Amostras coletadas e aspecto no momento da coleta:

Abelhas do alvado. Aspecto: _____

Abelhas da área de cria.

Aspecto: _____

Abelhas do chão. Aspecto: _____

Crias. Aspecto: _____

Favo de mel.

Outros. Especificar: _____

Condição da colônia:

Forte. OBS: _____

Média. OBS: _____

Fraca. OBS: _____

Outros. OBS: _____

Adota alimentação suplementar (energética ou protéica)? Especificar e declarar a origem. _____

Comentários (sintomas observados, comportamento etc.):

(c)

Relação das 40 amostras de mel (*grupo apiário*) provenientes de 24 municípios de três estados do Brasil que foram submetidas à detecção por meio de PCR multiplex quanto à presença de *Ascospaera apis*, *Nosema ceranae* e *Paenibacillus larvae*

Estados/Municípios	Número de amostras	Latitude	Longitude
Mato Grosso do Sul			
Aquidauana	2	-20.47	-55.78
Mundo Novo	3	-23.93	-54.27
Paranhos	3	-23.89	-55.43
Minas Gerais			
Bocaiúva	4	-17.10	-43.81
Bonfinópolis de Minas	1	-16.56	-45.99
Guaraciaba	3	-20.57	-43.01
Mirabela	1	-16.26	-44.16
Paula Cândido	1	-16.26	-44.16
Riachinho	2	-16.22	-45.99
São Francisco	3	-15.94	-44.86
São João Evangelista	2	-18.54	-42.76
Turmalina	2	-17.28	-42.72
Viçosa	2	-20.75	-42.88
São Paulo			
Altinópolis	1	-21.02	-47.37
Areias	1	-22.57	-44.69
Cunha	1	-23.07	-44.95
Lagoinha	1	-23.09	-45.18
Monteiro Lobato	1	-22.95	-45.84
Paraibuna	1	-23.38	-45.66

Continuação...

Estados/Municípios	Número de amostras	Latitude	Longitude
Pindamonhangaba	1	-22.92	-45.46
Redenção da Serra	1	-23.26	-45.53
Ribeirão Preto	1	-21.17	-47.81
São José dos Campos	1	-23.17	-45.88
Taubaté	1	-23.02	-45.55
Total	40		

(d)

Relação das 40 amostras (*grupo apicultor*) provenientes de 34 municípios de 12 estados do Brasil que foram submetidas à detecção por meio de PCR multiplex quanto à presença de *Ascospaera apis*, *Nosema ceranae* e *Paenibacillus larvae*

Estados/Municípios	Número de amostras	Latitude	Longitude
Alagoas			
Maceió	1	-9.66	-35.73
Bahia			
Barra do Choça	1	-14.88	-40.57
Jaguaquara	2	-13.53	-39.97
Palmeiras	1	-12.52	-41.55
Vitória da Conquista	2	-14.86	-40.83
Distrito Federal			
Vicente Pires	1	-15.81	-48.12
Espírito Santo			
Águia Branca	1	-18.98	-40.74
Alto Rio Novo	1	-19.05	-41.01
Aracruz	1	-19.81	-40.27
Jaguareé	2	-18.91	-40.07
Marechal Floriano	1	-20.41	-40.68
Muqui	1	-20.95	-41.34
São Domingos do Norte	1	-19.14	-40.62
São Mateus	1	-18.71	-39.85
Goiás			
Silvânia	1	-16.65	-48.61
Maranhão			
Peri-Mirim	1	-2.57	-44.85

Continuação...

Estados/Municípios	Número de amostras	Latitude	Longitude
Mato Grosso			
Brasnorte			
Cáceres	1	-16.07	-57.67
Santa Carmem	1	-11.91	-55.22
Sinop	1	-11.86	-55.50
Minas Gerais			
Acaiaca	1	-20.36	-43.14
Cabo Verde	1	-21.47	-46.39
Cambuquira	1	-21.85	-45.29
Caxambu	2	-21.97	-44.93
Rio Pardo de Minas	1	-15.60	-42.54
Viçosa	1	-20.75	-42.88
Paraná			
Cambará	2	-23.04	-50.07
Rio de Janeiro			
Rio de Janeiro	1	-22.90	-43.20
Rio Grande do Sul			
Cachoeirinha	1	-29.95	-51.09
Santa Maria	1	-29.68	-53.81
São Paulo			
Aguai	1	-22.05	-46.97
Altinópolis	2	-21.02	-47.37
São Bento do Sapucaí	1	-22.68	-45.73
Taubaté	1	-23.02	-45.55
Total	40		

(e)

Relação das 40 amostras (*grupo comércio*) provenientes de 38 municípios de quatro estados do Brasil que foram submetidas à detecção por meio de PCR multiplex quanto à presença de *Ascospaera apis*, *Nosema ceranae* e *Paenibacillus larvae*

Estados/Municípios	Número de amostras	Latitude	Longitude
Goiás			
Águas Lindas de Goiás	1	-15.76	-48.28
Pirinópolis	1	-15.85	-48.95
Silvânia	1	-16.65	-48.61
Minas Gerais			
Andradas	1	-22.06	-46.56
Arantina	1	-21.91	-44.25
Bambuí	1	-20.00	-45.97
Belo Horizonte	1	-19.81	-43.95
Buritizeiro	1	-17.35	-44.96
Cabo Verde	1	-21.47	-46.39
Campestre	1	-21.71	-46.24
Carangola	1	-20.73	-42.02
Carvalhópolis	1	-21.77	-45.84
Divinópolis	1	-20.13	-44.88
Formiga	1	-20.46	-45.42
Machado	1	-21.67	-45.91
Patrocínio	1	-18.94	-46.99
Piumhi	1	-20.46	-45.95
Poços de Caldas	1	-21.78	-46.56
Presidente Olegário	1	-18.41	-46.41
Santa Bárbara	2	-19.95	-43.41
São Lourenço	1	-22.11	-45.05

Continuação...

Estados/Municípios	Número de amostras	Latitude	Longitude
Três Pontas	1	-21.36	-45.51
Turvolândia	2	-21.87	-45.78
Uberaba	1	-19.74	-47.93
Uberlândia	1	-18.91	-48.27
Paraná			
Icaraíma	1	-23.39	-53.61
Maringá	1	-23.42	-51.93
São Paulo			
Artur Nogueira	1	-22.57	-47.17
Barretos	1	-20.55	-48.56
Barueri	1	-23.51	-46.87
Bebedouro	1	-20.94	-48.47
Embu-Guaçu	1	-23.83	-46.81
Igarapava	1	-20.03	-47.74
Itupeva	1	-23.15	-47.05
Mogi das Cruzes	1	-23.52	-46.18
Olímpia	1	-20.73	-48.91
Porto Feliz	1	-23.21	-47.52
São Paulo	1	-23.54	-46.63
Total	40		