

LUBIANE GUIMARÃES DOS SANTOS

IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS DE *Apis mellifera* EM
PRODUTOS APÍCOLAS COMERCIALIZADOS NO ESTADO
DE SÃO PAULO E PERFIL DA SANIDADE APÍCOLA NO
VALE DO RIBEIRA, SP

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

2014

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

S231i
2014 Santos, Lubiane Guimarães dos, 1989-
Identificação de patógenos de *Apis mellifera* em produtos
apícolas comercializados no estado de São Paulo e perfil da
sanidade apícola no Vale do Ribeira, SP / Lubiane Guimarães
dos Santos. – Viçosa, MG, 2014.
xi, 73f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Eduardo Serrão.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Abelhas - Produtos. 2. *Apis mellifera*. 3. Fungos. 4.
Nosema apis. 5. *Nosema Ceranae*. 6. *Varroa destructor*. 7. Abelhas -
Pólen. 8. Abelhas - Mel. 9. Abelhas - Geleia real. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa
de Pós-graduação em Entomologia. II. Título.

CDD 22. ed. 638.1

LUBIANE GUIMARÃES DOS SANTOS

IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS DE *Apis mellifera* EM PRODUTOS APÍCOLAS COMERCIALIZADOS NO ESTADO DE SÃO PAULO E PERFIL DA SANIDADE APÍCOLA NO VALE DO RIBEIRA, SP.

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: 23 de julho de 2014.

Maria Aparecida Scatamburlo Moreira

Weyder Cristiano Santana
(Coorientador)

José Eduardo Serrão
(Orientador)

“Transportai um punhado de terra todos os dias e fareis uma montanha.”

Confúcio

À minha mãe Edi, por todo amor e incentivo,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Entomologia pela oportunidade e pelos conhecimentos proporcionados.

À Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) pela oportunidade de realização da parte experimental deste estudo.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPESP pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Agradeço a Deus por me abençoar com grandes oportunidades e por iluminar todo o meu caminho durante esta trajetória.

À minha mãe, Edi Guimarães dos Santos, por todo carinho, pela compreensão e por estar sempre presente em minha vida.

Ao meu pai, Benedito Aparecido dos Santos, por todo incentivo e apoio.

Ao meu noivo Luiz Fernando Cestaro pela paciência, pelo carinho, e principalmente por me apoiar em minhas escolhas.

As minhas irmãs, Lediane e Liliane, aos meus cunhados, Rogério e Fabrício, e aos meus sobrinhos, Julia, Marina e Felipe. O incentivo, as conversas, as experiências de vida e todo carinho dado por vocês foram essenciais para esta conquista.

Ao meu orientador Professor Dr. José Eduardo Serrão por toda paciência e atenção em atender às minhas dúvidas e problemas.

Aos meus coorientadores Dejair Message, Marta F. Martins e Weyder C. Santana por todo o suporte e colaboração.

À minha coorientadora Dra. Érica W. Teixeira por tudo que me ensinou desde meu primeiro programa de iniciação científica, em 2009. Agradeço por toda paciência e pelo incentivo diário aos estudos e à pesquisa.

Ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo (IBt-SP) pelo uso das instalações e equipamentos do laboratório do Núcleo de Pesquisa em Palinologia (NPP) para a preparação do material polínico e, à Dra. Cynthia Fernandes Pinto da Luz, pesquisadora científica do NPP, pelas identificações e análises polínicas.

Ao Professor Dr. Ademílson Espencer (USP - Ribeirão Preto) por estar sempre disposto a colaborar, permitindo o uso de aparelhos de sua Instituição para esterilização dos produtos apícolas utilizados neste trabalho.

À Karla Ribeiro pelo auxílio no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

Aos amigos do setor de Apicultura da APTA (Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios) em Pindamonhangaba: Benedito Maria, Benedito Salgado, Carlos,

Carmen, Dorival, Ilda e Ronaldo. Agradeço especialmente à pesquisadora MSc. Maria Luisa T.M.F. Alves por todos os ensinamentos sobre as abelhas e pela importante colaboração.

Aos amigos Mariane Ávila e Kleber Pereira pela amizade construída através dos estudos e das novas experiências vividas durante o curso de entomologia na UFV.

A todas as colegas da pensão da Solange pelas conversas e risadas, especialmente às minhas amigas Laís, Alice e Sophia.

A todos os colegas do curso de pós-graduação em Entomologia e do Laboratório de Biologia Celular.

À minha amiga, bióloga Tainá Gouveia, pela presença, mesmo distante, durante os dois anos de curso. Sua amizade foi muito importante durante meus dias difíceis longe de todos. Obrigada pela amizade e sinceridade.

A todos que de alguma forma colaboraram para a elaboração deste trabalho.

BIOGRAFIA

Lubiane Guimarães dos Santos, filha caçula de Benedito Aparecido dos Santos e Edi Guimarães dos Santos, nasceu em Pindamonhangaba, interior de São Paulo, em 23 de Outubro de 1989.

Aos 15 anos, cursava o primeiro ano do ensino médio e se encantou pela primeira aula de genética. O interesse pelas aulas de ciências aumentava cada vez mais, o que levou a iniciar o curso de Licenciatura em Ciências Biológicas na Universidade de Taubaté em 2008.

O amor pelo estudo da vida, principalmente a dos animais, crescia a cada experiência na faculdade. O interesse e o gosto pelos estudos sempre foram parte do objetivo de ingressar na pós-graduação. No segundo ano de faculdade, teve a oportunidade de participar do Programa de Iniciação Científica do CNPq, no setor de apicultura da APTA em Pindamonhangaba, onde permaneceu como bolsista de 2009 a 2012. Durante este período, realizou estudos envolvendo a sanidade apícola de abelhas *Apis mellifera*, sendo um deles premiado em congresso interinstitucional como um dos melhores trabalhos apresentados.

Concluiu a graduação em Ciências Biológicas em 2011 e ingressou no curso de Mestrado em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa no segundo semestre do mesmo ano. Cursou as disciplinas do curso de Entomologia em Viçosa – MG, durante sete meses e após este período, realizou a parte experimental do curso no Laboratório de Sanidade Apícola – LASA, localizado no setor de Apicultura da APTA, em Pindamonhangaba. Em 23 de Julho de 2014 submeteu-se aos exames finais de defesa de dissertação para obtenção do título de Magister Scientiae em Entomologia.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
Introdução Geral.....	1
Referências Bibliográficas.....	5
Capítulo 1: Desenvolvimento e Validação de Metodologia para Detecção de Patógenos em Produtos Apícolas.....	9
Resumo.....	9
Introdução.....	11
Material e Métodos.....	13
Resultados e Discussão.....	21
Conclusão.....	28
Referências Bibliográficas.....	35
Capítulo 2 – Perfil sanitário de apiários do Vale do Ribeira, SP.....	48
Resumo.....	49
Introdução.....	50
Material e Métodos.....	52
Resultados e Discussão.....	58
Conclusão.....	69
Referências Bibliográficas.....	70

RESUMO

SANTOS, Lubiane Guimarães dos. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2014. **Identificação de patógenos de *Apis mellifera* em produtos apícolas comercializados no Estado de São Paulo e Perfil da sanidade apícola no Vale do Ribeira, SP.** Orientador: José Eduardo Serrão. Coorientadores: Érica Weistein Teixeira, Dejair Message, Marta Fonseca Martins e Weyder Cristiano Santana.

A sanidade apícola representa hoje uma preocupação devido ao declínio populacional de abelhas melíferas que vem sendo observado em vários países. As abelhas *Apis mellifera* podem ser acometidas por diversos patógenos e a confirmação da relação entre a presença destes agentes e o enfraquecimento de colônias demonstra a necessidade de estabelecimento de um sistema de controle epidemiológico mais eficiente. Os objetivos deste trabalho foram padronizar o processamento de amostras de mel, pólen e geleia real para detecção de patógenos em produtos apícolas, provenientes de estabelecimentos com registro no Serviço de Inspeção Federal (S.I.F.) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), comercializados no Estado de São Paulo e avaliar a presença de patógenos em apiários do Vale do Ribeira, SP. Para análise dos produtos apícolas foi padronizado o processamento de amostras, capaz de detectar simultaneamente esporos de *Nosema apis*, *Nosema ceranae*, *Ascospaera apis* e unidades formadoras de colônias de *Paenibacillus larvae* em mel, pólen apícola e geleia real. Para avaliar o perfil sanitário de apiários do Vale do Ribeira, SP, foram analisadas amostras de abelhas operárias campeiras, favos de cria e favos de mel, coletadas em 10 municípios da região, para verificar a contaminação por *Nosema* sp., *Paenibacillus larvae* e *Varroa destructor*. O processamento de amostras padronizado apresentou limiar de detecção de 25 esporos de *N. ceranae*, 150 esporos de *A. apis* e 8 esporos de *P. larvae*. Do total de 39 amostras de produtos apícolas obtidas, apenas dez não apresentaram contaminação por nenhum dos patógenos analisados. *Nosema ceranae* foi detectado em 74,3% das amostras analisadas, *Ascospaera apis* foi detectado em 15,3% e *Paenibacillus larvae* em 2,5%. O processamento de amostras para detecção de patógenos padronizado neste estudo poderá servir de subsídios para diretrizes governamentais para o controle sanitário de produtos apícolas. Na região do Vale do Ribeira, SP, foi encontrada média de 1.069.033 (mínimo de 33.000 e máximo de 3.087.000) esporos de *N. ceranae* por abelha, além de uma taxa de infestação pelo ácaro *V. destructor* de 8,88% e 3,26% em abelhas adultas e células de cria, respectivamente. Esses resultados reafirmam a alta prevalência de *N. ceranae* e *V. destructor* que vem sendo encontrada em diversas partes do mundo.

ABSTRACT

SANTOS, Lubiane Guimarães dos. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2014. **Identification of pathogens of *Apis mellifera* in bee products marketed in the state of São Paulo and health profile of apiculture in the Vale do Ribeira region.** Adviser: José Eduardo Serrão. Co-Advisers: Érica Weistein Teixeira, Dejair Message, Marta Fonseca Martins and Weyder Cristiano Santana.

The health of bee colonies is a growing concern nowadays due to the population decline of honeybees that has been observed in various parts of the world. *Apis mellifera* bees can be afflicted by a variety of pathogens and the confirmation of the relationship between the presence of these agents and deterioration of colonies demonstrates the need to establish a more efficient system for epidemiological analysis. The objectives of this study were to standardize the processing for detection of pathogens in samples of honey, pollen and royal jelly marketed in the state of São Paulo. The samples came from commercial beekeepers registered with Brazil's Federal Inspection Service, part of the Ministry of Agriculture. The samples were analyzed for simultaneous detection of spores of *Nosema apis*, *Nosema ceranae* and *Ascospaera apis* as well as colony forming units of *Paenibacillus* larvae. To assess the sanitary profile of apiaries in the Vale do Ribeira region of São Paulo, samples of honeycomb from the brood area, combs containing capped brood, adult bees that cover the brood and foraging bees, collected in 10 municipalities in the region, to check for contamination by *Nosema* sp., *Paenibacillus* larvae and *Varroa destructor*. The standardized analysis of the processed samples presented a limit of detection of 25 spores of *N. ceranae*, 150 spores of *A. apis* and 8 spores of *P. larvae*. Of the total of 39 samples of bee products, only 10 did not present contamination by any of the pathogens analyzed. *Nosema ceranae* was detected in 74.3% of the samples, *Ascospaera apis* in 15.3% and *Paenibacillus* larvae in 2.5%. The standardized method for processing samples to detect pathogens reported here can help improve government programs for sanitary control of bee products. In the Vale do Ribeira region, an average of 1,069,033 (minimum of 33,000 and maximum of 3,087,000) *N. ceranae* spores per bee was found, besides rates of infestation by the mite *V. destructor* of 8.88% and 3.26% in adult bees and brood cells, respectively. These results reaffirm the high prevalence of *N. ceranae* and *V. destructor* in Brazil, as has been reported in many other countries.

INTRODUÇÃO GERAL

Além do fato das abelhas polinizarem mais de 70 das 100 espécies vegetais de interesse agrícola mundial (FAO, 2004), sabe-se que sem essa contribuição, não é possível sustentar os serviços de polinização nos ecossistemas naturais, com manutenção da capacidade reprodutiva de plantas silvestres (Kremen, 2004).

Além da FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations) a NAS (National Academy of Sciences) vem divulgando, na última década, significativo declínio de polinizadores, dentre os quais as abelhas melíferas, que são preocupantes, muito embora os dados sejam imprecisos, em virtude da ausência de monitoramento.

Perdas de colônias de abelhas foram relatadas na Espanha (Higes et al., 2005) e, pouco tempo depois, nos Estados Unidos da América (Kluser e Peduzzi, 2007; Cox-Foster et al., 2007), quando esses acontecimentos foram denominados “Colony Collapse Disorder” (CCD), momento a partir do qual intensificaram-se estudos pela comunidade científica mundial, em busca de identificação das eventuais causas envolvidas.

O CCD foi caracterizado pelo sumiço repentino das abelhas operárias da colônia (Oldroyd, 2007; Stokstad, 2007), além de apresentar características como a ausência de abelhas vivas ou mortas dentro e próximo das colônias, presença de rainha, presença de crias operculadas e alimento estocado (Kluser e Peduzzi, 2007; Cox-Foster et al., 2007).

O colapso, bem como declínio ou enfraquecimento das colônias, vem sendo descrito como uma síndrome multifatorial, podendo envolver fatores como o uso de pesticidas, fragmentação de habitat, alterações climáticas, doenças, além de outros (Kluser e Peduzzi, 2007).

Dentre os fatores possivelmente envolvidos, os patógenos vêm sendo constantemente indicados como potenciais responsáveis pela CCD, seja individualmente ou de forma associada ao efeito dos atuais princípios ativos utilizados

na composição de agrotóxicos, que podem estar contribuindo para a vulnerabilidade das abelhas aos patógenos (Alaux et al., 2010; Vidau et al., 2011).

Segundo Bailey e Ball (1991), as abelhas *Apis mellifera* podem ser acometidas por diversos patógenos, incluindo vírus, bactérias, fungos e ácaros parasitas. Tais patógenos estão amplamente distribuídos pelo mundo, sendo disseminados por meio da troca de materiais contaminados, pela atividade de apicultura migratória ou do manejo adotado e, ainda, através de produtos apícolas (Giersch et al., 2009). Entre as doenças que acometem as abelhas, pode-se ressaltar a Cria Pútrida Americana, a Cria Giz, a Nosemose e a Varroose, enfermidades que estão sendo bastante estudadas buscando a elucidação das causas do declínio populacional de abelhas.

A Cria Pútrida Americana causada pela bactéria *Paenibacillus larvae* foi reportada no Brasil pela primeira vez em 2001, no Estado do Rio Grande do Sul, onde Schuch et al. (2003) detectaram a bactéria em amostras de mel e pólen importados. Mais tarde, em 2006, *P. larvae* foi encontrada contaminando colônias no Estado do Paraná (MAPA, 2006), constituindo-se no primeiro e único foco da doença oficialmente registrado em território brasileiro.

Esta doença está amplamente distribuída pelo mundo, causando consideráveis perdas econômicas aos apicultores (Ellis e Munn, 2005; Genersch, 2010). A contaminação pela bactéria tem início na ingestão de esporos por abelhas em estágio de larva, durante o processo de alimentação (Blacquièrre e Van der Steen, 2006). Crias doentes podem estar infectadas por até 1 bilhão de esporos, que são facilmente transmitidos através das abelhas operárias, levando a colônia a morte (Hansen e Brødsgaard, 1999; Shimanuki e Knox, 2000).

A Cria Giz é causada pelo fungo *Ascosphaera apis*, que acomete larvas de abelhas em diversas partes do mundo (Aronstein e Murray, 2010), inclusive no Brasil, onde foi identificada primeiramente nos Estados de São Paulo e Rio Grande do Sul (Rocha et al.,

1998; Sattler et al., 1998). O processo de infecção da doença, assim como a Nosemose e a Cria Pútrida Americana, tem início durante o processo de alimentação das crias, quando as larvas ingerem alimento contaminado com esporos (Hornitzky, 2001). 24 horas após a ingestão, os esporos germinam na parede do intestino, onde ocorre o crescimento do micélio fúngico, fazendo com que a pupa fique coberta com uma espessa camada de micélio branco, característica que confere uma aparência mumificada e endurecida às pupas mortas, o que designa o nome da doença como “Cria Giz” (Bailey e Ball 1991). Segundo Kluser e Peduzzi (2007), há algumas indicações de que a incidência de Cria Giz tem aumentado nos últimos anos e, embora não seja capaz de destruir toda uma colônia, essa doença é fatal para as larvas, podendo causar perdas significativas em termos de número de abelhas e produtividade (Bailey, 1963; Wood, 1998).

A Nosemose pode ser considerada uma das mais importantes doenças que afetam abelhas *Apis mellifera* em todo o mundo (Chen et al., 2009, Giersch et al., 2009), podendo ser causada por *Nosema apis* ou *Nosema ceranae*. O processo de infecção da doença tem início na ingestão de esporos pelas abelhas, durante o processo de limpeza, o forrageamento, ou por alimento contaminado (Higes et al., 2010). Este microsporídio se aloja no trato digestório das abelhas, germina nas células epiteliais e é liberado junto com as fezes, podendo contaminar toda a colônia (Somerville e Hornitzky, 2007). A Nosemose pode causar desordens no sistema digestivo, levando a diminuição da longevidade, redução da população de abelhas nas colmeias e redução na produção de mel (Whitaker et al., 2010; Chen et al., 2008; Higes et al., 2008a).

A Varroose é causada pelo ácaro *Varroa destructor*, um ectoparasita que se alimenta da hemolinfa de crias e adultos de abelhas (Hornitzky, 2010). A doença tem início quando uma fêmea adulta do ácaro entra em uma célula de cria e passa para o fundo da célula, onde se encontra o alimento larval. Segundo Rosenkranz et al. (2010),

este comportamento pode ser uma adaptação de *V. destructor* para evitar a sua detecção e remoção por abelhas higiênicas. Após a operculação da célula, a fêmea do ácaro realiza a postura de seus ovos, que darão origem primeiramente a um macho e depois a fêmeas. Após atingir a maturidade sexual, as fêmeas jovens são fecundadas pelo macho irmão, e quando adultas, sairão da célula de cria juntamente com a abelha hospedeira, para realizar uma fase forética, onde a fêmea adulta do ácaro, transportada pela abelha, entra em nova célula de cria e reiniciar o processo de reprodução (Bailey e Ball 1991; Rosenkranz et al. 2010). Ao alimentar-se, o ácaro interfere no desenvolvimento das abelhas, deixando-as enfraquecidas e susceptíveis a outras infecções (Rosenkranz, et al, 2010), além de estar fortemente associado à transmissão de vírus (Chen e Siede, 2007, Boecking e Genersch, 2008).

A realização de monitoramento sanitário de produtos apícolas que adentrem o território nacional, com vistas a evitar a introdução de novas doenças através dos mesmos, se constitui de grande importância. O monitoramento de apiários em nível nacional é igualmente importante, por permitir a certificação de isenção de certas doenças, ou mesmo, a presença daqueles patógenos eventualmente identificados, objetivando a transparência no processo de comercialização de produtos internamente ou com mercados externos. Atualmente, o Brasil conta com o Programa Nacional de Sanidade Apícola (PNSAp), o qual visa prevenir, controlar e erradicar doenças das abelhas prejudiciais à saúde animal ou que interfiram na produtividade apícola, protegendo divisas comerciais e elevando o potencial de produção nacional. Isto posto, este estudo teve por objetivos padronizar o processamento de amostras para avaliação da presença de patógenos em produtos apícolas, registrados no S.I.F., comercializados no Estado de São Paulo, além de avaliar a presença de patógenos em apiários do Vale do Ribeira, SP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alaux, C., Brunet, J.T., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S. (2009). Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honey bees. *Env. Microbiol.* 12:774–782.
- Aronstein, K. A., Murray, K. D. (2010). Chalkbrood disease in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 103:S20–S29.
- Bailey, L. (1963). Infectious diseases in honey bee. Land Book, London. 175p.
- Bailey, L., Ball, B.V. (1991). Honey Bee Pathology. London: Academic Press, 208p.
- Blacqui re, T., Van Der Steen, J. (2006). Diagnosis and control of American foulbrood disease of honey bees in the Netherlands. *Proc. Neth. Entomol. Soc. Meet.* v. 17. 2006.
- Boecking, O., Genersch, E. (2008). Varroosis - the ongoing crisis in bee keeping. *J. Verbr. Lebens.* 3(2):221–228.
- Chen, Y.P., Siede, R. (2007). Honey bee viruses. *Adv. Virus Res.* 70:33–80.
- Chen, Y., Evans, J.D., Smith, I.B., Pettis, J.S. (2008). *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidean infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J. Invertebr. Pathol.* 97:186–188.
- Chen, Y. P., Evans J. D., Zhou L., Boncristiani H., Kimura K., Xiao T., Litkowski A. M., Pettis, J. S. (2009). Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 101:204-209.
- Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., Vanengelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S., Lipkin, W.I. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science.* 318:283–287.

- Ellis, J. D., Munn, P. A. (2005). The worldwide health status of honey bees. *Bee World* 86:88–101.
- FAO. (2004). Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture the international response. In: Freitas, B.M.; Pereira, J. O. P. Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2004. P. 2 a 19.
- Genersch, E., vonderOhe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Buchler, R., Berg, S., Ritter, W., Muhlen, W., Gisder, S., Meixner, M., Liebig, G., Rosenkranz, P. (2010). The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*. 41:332–352.
- Giersch, T., Berg, T., Galea, F., Hornitzky, M. (2009). *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie*. 40:117-123.
- Hansen, H., Brodsgaard., C. J. (1999). American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World*. 80:5–23.
- Higes, M., Martín-Hernandez, R., Sanz, A., Alvarez, N., García, M. P., Meana, A. (2005). El síndrome de despoblamiento de las colmenas en España. Consideraciones sobre su origen. *Vida Apícola*. 133:15–21.
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., Botías, C., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A.V., Barrios, L., Del Nozal, M.J., Berna, J. L., Jiménez, J. J., Palencia, P. G., Meana, A. (2008a). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol*. 10:2659-2669.
- Higes, M., Martín-Hernandez, R., Meana, A. (2010). *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie*. 41:375-392.

- Hornitzky, M. (2001). Literature review of chalkbrood – a fungal disease of honeybees. Australia: Kingston ACT; 2001. Rural Industries Research and Development Corporation. RIRDC Publication 01/150. 17p.
- Hornitzky, M. (2010) Honey bee diseases, Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedure. 2003. 20p.
- Kremen, C. (2004). Pollination services and community composition: does it depend on diversity, abundance, biomass or species traits? In: Freitas & Pereira (ed.), Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination. Fortaleza, CE, p.115-124.
- Kluser, S., Peduzzi, P. (2007). Global pollinator decline: a literature review. Geneva: UNEP/GRID. 10p.
- MAPA. Nota técnica DSA nº52/2006. Ocorrência de “Cria Pútrida Americana” no município de Quatro Barras, estado do Paraná-Brasil. Ministry of Agriculture of Brasil, Brasília, 2006.
- Mondragón, L., Vandame, R., Spivak, M. (2005). A multifactorial study of the resistance of honeybees *Apis mellifera* to the mite *Varroa destructor* over one year in Mexico. *Apidologie*. 36:345-358.
- Rocha, H. C., Bagagli, E., Funari, S. R. C. (1998). Identificação do fungo *Ascosphaera apis* em colmeias de abelhas *Apis mellifera* L. no estado de São Paulo - SP, Abstr. 12nd Congresso Brasileiro de Apicultura. Salvador, BA. p. 247.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *J. Invertebr. Pathol.* 1:S96-119.
- Sattler, A., Disconzi, M. S., Duarte, V., Silveira, J. R. P. (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., L. G. Tochetto, and A. Sattler. (2003). Isolamento de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* no Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.* 38:441–444.
- Shimanuki, H., Knox. D. A. (2000). Diagnosis of honey bee diseases. *Bee Research Handbook*, n. 690. U.S. Department of Agriculture. Agricultural Research Service, Washington, DC.
- Somerville, D., Hornitzky, M. (2007). Nosema Disease. Primefact 699. Disponível em: http://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0003/177519/nosemadisease.pdf. Acesso em: Junho de 2014.
- Vidau. C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Vignes, B. (2011). Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honey bees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS One*. 6:e21550.
- Whitaker, J., Szalanski, A. L., Kence, M. (2010). Molecular detection of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* from Turkish honey bees. *Apidologie*. 41:364-374.
- Wood, M. (1998). Microbes help bees battle chalkbrood. *J. Econ. Entomol.* 46(8):16–17.

CAPÍTULO 1

Desenvolvimento e Validação de Metodologia para Detecção de Patógenos em Produtos Apícolas

Resumo – As abelhas *Apis mellifera* podem ser acometidas por diversos patógenos, entre eles, vírus, fungos, bactérias e ácaros parasitas, que podem estar relacionados ao recente declínio populacional desses insetos. Produtos apícolas são considerados importantes veículos de disseminação de doenças das abelhas, e por este fato a padronização de metodologias capazes de detectar patógenos nesses produtos é muito importante. Os objetivos deste trabalho foram padronizar o processamento de amostras para detecção de patógenos em mel, pólen e geleia real e avaliar a presença de patógenos em produtos apícolas, registrados no S.I.F., comercializados no Estado de São Paulo. Para a análise dessas amostras foi realizada a padronização do processamento de cada produto, individualmente, capaz de detectar esporos de *Paenibacillus larvae*, *Ascospaera apis*, *Nosema apis* e *Nosema ceranae*. A análise de PCR apresentou os seguintes limiares de detecção: 25 esporos de *N. ceranae*, 150 esporos de *A. apis* e 8 esporos de *P. larvae* a cada 20 mL de mel, 10g de pólen apícola e 5g de geleia real. Amostras de mel, de pólen e de geleia real obtidas em diversos municípios do Estado de São Paulo foram analisadas, constatando-se que apenas 10 não estavam contaminados por algum dos patógenos analisados. Nenhuma amostra apresentou contaminação pelo microsporídio *N. apis*. *Nosema ceranae* foi detectado em 74,3% das amostras analisadas, *Ascospaera apis* foi detectado em 15,3% e *Panibacillus larvae* em 2,5%. A técnica padronizada neste estudo mostrou eficácia e rapidez na detecção dos patógenos em produtos apícolas, podendo servir de subsídio para diretrizes governamentais para o controle sanitário de produtos apícolas, uma vez

que o comércio nacional e internacional, assim como o deslocamento de colônias entre regiões, desempenham um papel importante na dispersão de patógenos em *Apis mellifera*.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, *Nosema ceranae*, *Ascospaera apis*, *Paenibacillus* larvae, Mel, Pólen, Geleia real, PCR.

INTRODUÇÃO

Atualmente, a importante função ecológica e econômica que as abelhas representam vem sendo comprometida pelo declínio populacional desses insetos em diversas partes do mundo (Cox-Foster et al., 2007; Stokstad, 2007; Genersch et al., 2010). O colapso de colônias, observado com maior intensidade a partir do outono de 2006 por cientistas americanos, foi designado Colony Collapse Disorder (CCD) e caracterizado pelo desaparecimento de abelhas operárias (Oldroyd, 2007; Stokstad, 2007), além de apresentar algumas características específicas como a ausência de abelhas mortas dentro e próximo das colmeias, presença de rainha, presença de crias operculadas e alimento estocado (Kluser e Peduzzi, 2007; Cox-Foster et al., 2007).

Embora ainda não tenha suas causas totalmente definidas, diversos estudos acerca do colapso ou enfraquecimento de colônias, com consequente declínio de populações de abelhas, vêm sendo realizados com o objetivo de elucidar tais acontecimentos. Doenças como a Cria Pútrida Americana, causada pela bactéria *Paenibacillus larvae*, a Cria giz, causada pelo fungo *Ascosphaera apis* e a Nosemose causada pelos microsporídios *Nosema apis* e *Nosema ceranae* acometem colônias de abelhas em diversos países, e parecem desempenhar importante papel nas causas do declínio populacional desses insetos (Higes et al., 2006; 2008a; Martin-Hernández et al., 2007; Blanchard et al., 2008). Nesse contexto, os produtos apícolas vêm sendo apontados como importantes veículos de disseminação de tais agentes (Hale e Menapace, 1980; Flores et al., 2005a; Higes et al., 2008a; Giersch et al., 2009).

Produtos como mel, pólen e geleia real são susceptíveis a contaminação por patógenos presentes nas colônias, principalmente por serem armazenados nos alvéolos pelas abelhas ou transferidos por trofalaxia (OIE, 2013).

Desta forma, estudos que viabilizem a detecção de patógenos em produtos apícolas são importantes ferramentas para o monitoramento sanitário de colônias de

abelhas, auxiliando no conhecimento da distribuição de patógenos e do diagnóstico de doenças.

Até o momento, poucas técnicas moleculares foram desenvolvidas para detecção de patógenos em produtos apícolas. Para análise de *Nosema* sp., foram realizadas técnicas capazes de detectar esporos do microsporídio em mel utilizando técnica molecular (Giersch et al., 2009; Puker, 2011) e em pólen corbicular, utilizando microscopia (Higes et al. 2008b). Para detecção de *A. apis* foi apresentada uma única técnica para detecção do fungo em mel, utilizando PCR (Puker, 2011). Para *P. larvae* foram apresentadas técnicas para detecção da bactéria em mel, também através de técnicas moleculares, (OIE, 2008; Bassi et al., 2010; Graaf et al., 2013) e pólen através de análise microbiológica (OIE, 2008).

Nesse contexto, os objetivos deste trabalho foram adequar o processamento de amostras para detecção de patógenos em mel, pólen e geleia real e avaliar a presença de patógenos e produtos apícolas, registrados no S.I.F., comercializados no Estado de São Paulo, considerando a possibilidade de dispersão dos agentes patogênicos pelos produtos apícolas.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de produtos apícolas comercializados no Estado de São Paulo

Foram obtidas 18 amostras de mel, 11 de pólen e 10 de geleia real, todas com registro no S.I.F. As amostras foram obtidas em casas comerciais de diferentes municípios do estado de São Paulo. Para tanto, monitorou-se, durante dezesseis meses a disponibilidade de produtos, sendo que pode houve repetição da identificação de S.I.F. entre produtores, mas não do mesmo produto.

Todas as amostras foram identificadas por meio de códigos, evitando com isto reconhecimento do nome comercial, durante todo o processo de análise a que foram submetidas.

Adequação de processamento de amostras para detecção de patógenos em produtos apícolas

Para detecção de *P. larvae*, *A. apis* e *N. ceranae* em produtos apícolas, foi necessário estabelecer um protocolo de preparo para cada um dos três produtos, efetuando-se, em seguida, a extração de DNA utilizando-se Dneasy Plant Mini Kit Qiagen[®] (Qiagen, Hilden, Germany) conforme indicações do fabricante.

A padronização do preparo da amostra, para cada produto, foi realizada testando-se diversas quantidades de produtos, as quais foram submetidas a diversas velocidades e tempos de centrifugação. Para realização dos referidos testes, foram inoculadas diferentes quantidades de esporos de cada patógeno, individualmente, nos diferentes produtos.

Inicialmente foram pesados 0,5g de grãos de pólen, 0,5g de geleia real e 20 mL de mel, onde foram inoculadas as diferentes concentrações de esporos e UFC's. As concentrações de UFC's da bactéria *P. larvae* que foram testadas variaram sempre entre 1 UFC e 1.000 UFC, enquanto a concentração de esporos de *N. ceranae* variaram entre 10 e 250.000 esporos e de *A. apis* entre 10 e 300.000 esporos.

As velocidades de centrifugação testadas inicialmente foram: 10.000g; 14.000g e 19.000g, por 20 min, 30 min e 40min. Nessas condições foram testadas as mesmas quantidades dos referidos patógenos, com o objetivo de detectar as menores concentrações em menores tempos e velocidades de centrifugação.

A melhor forma de detecção dos patógenos foi observada em 12.500 x g por 40 min e por isso foi estabelecida para efetuar os demais testes. Para isso, as quantidades de pólen e geleia real foram reconsideradas e estabelecidas em 10g e 5g, respectivamente, por representarem as amostras a serem analisadas de forma mais ampla. Contudo, o material acumulado após a centrifugação das amostras de pólen se mostrou muito elevado e sem sucesso quanto à amplificação dos fragmentos de interesse após reações de PCR. Por este fato, foi estabelecida a filtração dos grãos de pólen após homogeneização com água destilada estéril. Após a inoculação dos referidos patógenos, as amostras foram filtradas em papel de filtro Whatman nº1.

Após a falha tentativa de filtração apenas vertendo a amostra em papel filtro acoplado a um funil de vidro, foi utilizada bomba de vácuo para auxiliar na filtração dos grãos de pólen. O pólen filtrado foi armazenado em um kitasato e depois, vertido para o tubo cônico de 50 mL, o qual foi submetido à centrifugação e depois à extração de DNA pelo DNeasy Plant Mini Kit Qiagen[®] (Qiagen, Hilden, Germany) e PCR.

Obtenção dos patógenos

A solução de esporos de *N. ceranae* foi obtida a partir da coleta de abelhas campeiras infectadas. A coleta foi realizada segundo Teixeira e Message (2010) e a contagem dos esporos segundo Cantwell (1970) utilizando uma Câmara de Neubauer espelhada. Após a contagem de esporos, a suspensão foi purificada com Percoll[®], segundo Higes et al. (2008c).

Para a obtenção da solução de esporos de *A. apis*, foram utilizadas crias mumificadas com confirmação prévia de diagnóstico para Cria Giz. Após maceração e diluição em água destilada estéril, os esporos foram contados conforme Cantwell (1970).

Para inoculação de esporos de *P. larvae*, foi utilizada uma solução de esporos ATCC 9545 fornecida pelo Laboratório Nacional Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (LANAGRO/MAPA, Porto Alegre- RS). É importante ressaltar que, previamente aos testes de limiar de detecção, todos os produtos utilizados nas análises, foram esterilizados em bomba de cobalto (Departamento de Genética/USP, Ribeirão Preto - SP), onde receberam dose de irradiação ionizante de aproximadamente 960 Gy/10 cm.

As amostras de abelhas adultas utilizadas para obtenção de esporos de *N. ceranae*, de crias, usadas para obtenção de esporos de *A. apis* ou a solução de UFC de *P. larvae*, utilizadas para fins de testes de limiares de detecção, foram previamente diagnosticadas como positivas para os respectivos patógenos, conforme análises moleculares anteriores efetuadas no Laboratório de Sanidade Apícola/APTA-SAA, SP, cujos sequenciamentos de DNA foram efetuados na ESALQ/USP segundo procedimento realizado por Teixeira et al. (2013).

Nosema apis não foi incluída nessa padronização em virtude da ausência de abelhas infectadas com este patógeno, esperando-se, todavia, que o limiar de detecção seja similar ao obtido para N. ceranae, já que a técnica de contagem em Câmara de Neubauer é exatamente a mesma e por tratar-se apenas de diferente espécie do microsporídeo.

Limiares de detecção de patógenos em produtos apícolas

Para conhecimento dos limiares de detecção apresentada após a adequação do processamento das amostras, foram inoculadas diferentes concentrações de esporos de N. ceranae e de A. apis, bem como de UFC, no caso de P. larvae, com o intuito de avaliar o limite de detecção a partir da concentração de patógenos decrescente, até atingir-se o número mínimo detectável. As concentrações testadas foram: 2.500, 250, 100, 50, 25 esporos de N. ceranae; 3.000, 300, 150, 75 esporos de A. apis; 1.000, 100, 10, 8, 4, 1 UFC de P. larvae. As concentrações foram testadas nos três produtos apícolas envolvidos no estudo (mel, pólen e geleia real), nas seguintes quantidades: 20 mL de mel, 10 g de pólen e 5 g de geleia real. Essas quantidades foram definidas buscando representar as amostras analisadas da forma mais ampla possível, considerando a quantidade máxima de material analisado (100 mg) preconizado pelo protocolo de extração de DNA (DNeasy Plant Mini Kit Qiagen[®], Qiagen, Hilden, Germany).

Análise dos produtos apícolas detentores de S.I.F.

O preparo das amostras, por produto, foi diferenciado, com vistas a garantir o menor limiar de detecção possível, conforme segue: Para análise das amostras de pólen

foi realizado o seguinte procedimento: 10g de grãos de pólen foram pesados em tubo cônico de 50 mL, estéril, onde se completou o volume para 40 mL, com água destilada estéril. O tubo foi agitado para máxima dissolução dos grãos de pólen e homogeneização da solução. A solução foi vertida em um funil de vidro, contendo papel filtro Whatman nº 1, o qual estava acoplado a um kitasato. A amostra foi filtrada com auxílio de bomba de vácuo e após o término da filtração, a solução foi vertida em tubo cônico de 50 mL. A amostra foi submetida à centrifugação a 12500 x g por 40 min. Finalizada a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspenso em 1 mL de água destilada autoclavada. O conteúdo do tubo foi transferido para microtubo de 2 mL, o qual foi agitado vigorosamente para homogeneização do produto e submetido à nova centrifugação a 10.000 x g por 20 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 100 mg do material foram submetidos à extração de DNA pelo DNeasy Plant Mini Kit Qiagen[®] (Qiagen, Hilden, Germany), conforme indicações do fabricante. Para análise de mel e geleia real, foi utilizado o mesmo procedimento, diferenciando apenas a quantidade dos produtos, sendo 20 mL de mel e 5 g de geleia.

Análise molecular

Após a extração do material genético, reações de PCR monoplex e multiplex foram utilizadas para avaliar o limiar de identificação de cada patógeno, partindo-se de condições previamente estabelecidas por Puker (2011), havendo, no entanto, preparo diferenciado das amostras a serem analisadas. Em termociclador Applied Biosystems Veriti[®] (Life Technologies[®], Foster City, USA) foram conduzidas reações com volume de 20 µL constituídas de 10 µL de Gotaq Green[®] (Promega[®], Madison, USA), 7 µL de

água livre de DNase (Promega[®], Madison, USA), 1 µL de DNA da amostra (cuja concentração variou entre 0,5 e 37 ng) e 1 µL de cada primer (10 µM). As reações foram realizadas com as seguintes condições: 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. Para as reações de PCR multiplex foram conduzidas reações com volume de 20 µL constituídas de 10 µL de Gotaq Green[®] (Promega[®], Madison, USA), 2 µL de água livre de DNase (Promega[®], Madison, USA), 1 µL de DNA da amostra (cuja concentração variou entre 0,5 e 37 ng) e 1 µL de cada primer (10 µM). Os primers utilizados estão descritos na Tabela 1. Todas as reações de PCR realizadas continham controles positivos e negativos, os quais consistiam em DNA de amostra positiva para cada um dos patógenos analisados, e amostra sem adição de DNA molde, respectivamente.

Após o término da PCR, 5 µL da reação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% (m/v) corado com SYBR SAFE[®] (Life Technologies, Carlsbad, EUA) em tampão TBE 1X (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico e 2 mM EDTA). Após a eletroforese, o gel foi visualizado em fotodocumentador E-Gel Imager (Life Technologies[®], Carlsbad, EUA). O marcador de 100 pb (Invitrogen[®], Carlsbad, EUA) foi utilizado como referência para determinação do tamanho do fragmento de interesse.

Tabela 1. Primers utilizados nas reações de PCR monoespecífica e multiplex.

Patógeno	Primer	Sequência do primer (5' – 3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
<i>Ascospaera apis</i>				Murray et al. (2005)
Forward	AscoF3	GCACTCCCACCCTTGTCTA	485	
Reverse	AapisR3	CCCCTAGAAAGTAAATGATGGTTA		
<i>Nosema apis</i>				Martín-Hernandez et al. (2007)
Forward	321APIS	GGGGGCATGTCTTTGACGTAATATGTA	321	
Reverse	321APIS	GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACAACATATG		
<i>Nosema ceranae</i>				Martín-Hernandez et al. (2007)
Forward	218MITOC	CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA	218	
Reverse	218MITOC	CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG		
<i>Paenibacillus larvae</i>				Piccini et al. (2002)
Forward	PI 5	CGAGCGGACCTTGTGTTTCC	700	
Reverse	PI 4	TCAGTTATAGGCCAGAAAGC		

Análise polínica das amostras de produtos apícolas detentores de S.I.F.

A análise palinológica é um método capaz de avaliar os resultados da visita das abelhas às flores, identificando suas preferências através dos espectros polínicos de amostras de pólen e de mel. Desta forma é possível reconhecer a vegetação apícola regional, identificando as principais fontes poliníferas e nectaríferas utilizadas pelas abelhas (Freitas et al. 2010).

Todas as amostras de mel e pólen apícola que mostraram contaminação pelo fungo *A. apis* e pela bactéria *P. larvae* foram levadas para o Núcleo de Pesquisa em Palinologia do Instituto de Botânica (Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo) onde foram tratadas pelo método clássico europeu de Maurizio & Louveaux (1965), descrito em Barth (1989), sem utilização de acetólise.

Para o mel, separou-se 10 mL que foram dissolvidos em 20 mL de água destilada e após centrifugação foram montadas lâminas de microscopia com gelatina glicerinada e parafina para lutagem. Do conjunto de bolotas de grãos de pólen, separou-se aleatoriamente 2 g de cada lote, os quais foram macerados em 10 mL de álcool a 70%, constituindo uma amostra única por lote, com montagem final em lâminas de microscopia com gelatina glicerinada e parafina (Modro et al. 2009). Foram contados, no mínimo, 500 grãos de pólen por amostra de mel e 1.000 grãos de pólen apícola (bolotas).

Para avaliação do espectro palinológico procurou-se identificar todos os tipos polínicos de cada amostra levando-se em consideração a presença ou ausência de eventuais grãos de pólen exóticos para servirem de marcadores, ou seja, que não fossem originários de Biomas brasileiros, principalmente nas amostras onde se verificou a presença do patógeno exótico. A identificação dos tipos polínicos foi baseada, principalmente, na comparação com a Palinoteca do Instituto de Botânica, assim como

utilizando-se como referência catálogos polínicos disponíveis na literatura especializada.

Na avaliação das amostras foram aplicadas as classes de frequência segundo Zander apud Maurizio & Louveaux (1965), correspondendo a: > 45% do total de grãos de pólen contado = pólen dominante (D); de 15% a 45% = pólen acessório (A); de 3% a 15% = pólen isolado importante (I); e < 3% = pólen isolado ocasional (O). Os valores correspondentes aos grãos de pólen das espécies anemófilas (dispersos pelo ar) foram subtraídos antes do cálculo das percentagens nas amostras de mel. Apesar de não contribuir com néctar, seu valor diz respeito à origem fitogeográfica da amostra. Antes da diagnose final do mel, foi levado em consideração a sub e superrepresentação dos táxons botânicos (Barth 1970a, b, c, d, 1989, 1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo apresenta pela primeira vez um protocolo de processamento de amostras capaz de detectar simultaneamente *N. apis*, *N. ceranae*, *A. apis* e *P. larvae* em mel, pólen e geleia real. Além disso, apresenta o primeiro processamento de amostras para detecção de *Nosema* sp., *A. apis* e *P. larvae* em geleia real, assim como *A. apis* em pólen.

Os protocolos padronizados mostraram-se eficientes para detecção dos patógenos nos produtos apícolas analisados, mostrando resultados iguais tanto em reações de PCR monoplex como multiplex. Os limiares de detecção obtidos foram: 25 esporos de *Nosema ceranae*, 150 esporos de *Ascospaera apis* e 8 esporos de *Paenibacillus larvae* em 10g de pólen, em 5g de geleia real ou em 20mL de mel (Tabela 2).

Tabela 2. Limiar de detecção de *Nosema ceranae*, *Ascospaera apis* e *Paenibacillus larvae* em produtos apícolas de *Apis mellifera* após técnica de PCR.

Matriz	<i>Nosema ceranae</i>	<i>Ascospaera apis</i>	<i>Paenibacillus larvae</i>
Pólen	25 esporos	150 esporos	8 esporos
Mel	25 esporos	150 esporos	8 esporos
Geleia Real	25 esporos	150 esporos	8 esporos

Nas Figuras 1, 2 e 3 pode-se observar a amplificação de fragmentos dos patógenos *Nosema ceranae* (218 pb), *Ascospaera apis* (485 pb) e *Paenibacillus larvae* (699 pb) em gel de agarose (2%) referente aos limiares de detecção obtidos em 10g de pólen apícola, 20mL de mel e 5g de geleia real, respectivamente, após técnicas de PCR.

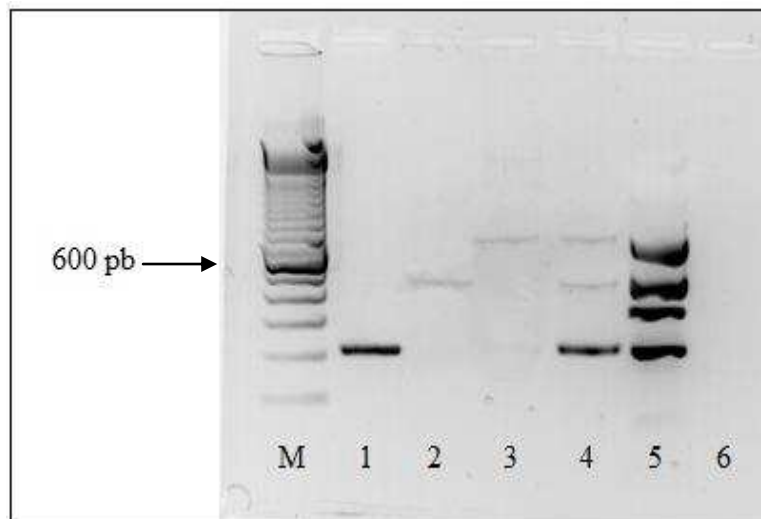


Figura 1: Gel de agarose (2%) corado com SYBR® Safe dos produtos de PCR monoplex e multiplex referentes aos limiares de detecção dos patógenos em 10g de pólen apícola. M: Marcador de 100 pb (Invitrogen®). 1: PCR monoplex para *N. ceranae*. 2: PCR monoplex para *A. apis*. 3: PCR monoplex para *P. larvae*. 4: PCR multiplex para *N. ceranae*, *A. apis* e *P. larvae*. 5: Controles positivos de *N. ceranae* (218 pb), *N. apis* (321 pb), *A. apis* (485 pb) e *P. larvae* (699 pb). 6: Controle Negativo.

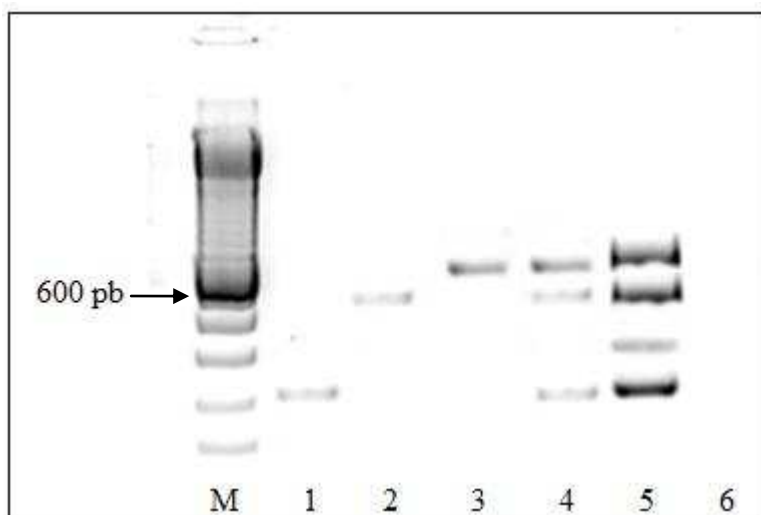


Figura 2: Gel de agarose (2%) corado com SYBR® Safe dos produtos de PCR monoplex e multiplex referentes aos limiares de detecção dos patógenos em 20 mL de mel. M: Marcador de 100 pb (Invitrogen®). 1: PCR monoplex para *N. ceranae*. 2: PCR monoplex para *A. apis*. 3: PCR monoplex para *P. larvae*. 4: PCR multiplex para *N. ceranae*, *A. apis* e *P. larvae*. 5: Controles positivos de *N. ceranae* (218 pb), *N. apis* (321 pb), *A. apis* (485 pb) e *P. larvae* (699 pb). 6: Controle Negativo.

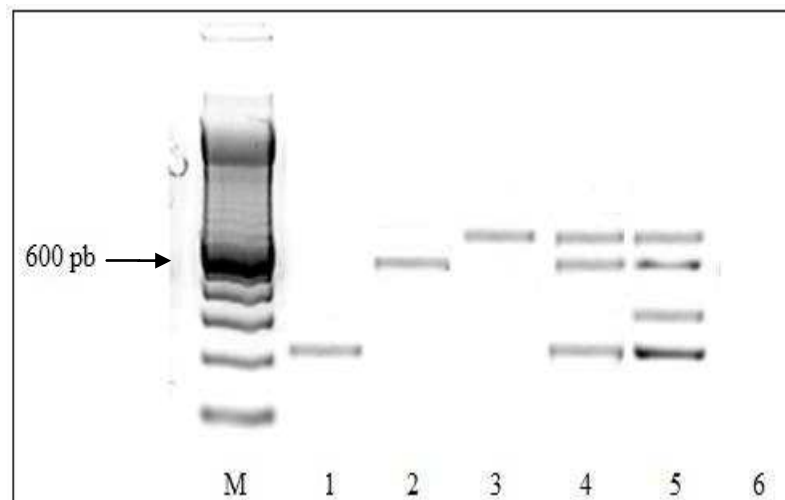


Figura 3: Figura 1: Gel de agarose (2%) corado com SYBR® Safe dos produtos de PCR monoplex e multiplex referentes aos limiares de detecção dos patógenos em 5g de geleia real. M: Marcador de 100 pb (Invitrogen®). 1: PCR monoplex para *N. ceranae*. 2: PCR monoplex para *A. apis*. 3: PCR monoplex para *P. larvae*. 4: PCR multiplex para *N. ceranae*, *A. apis* e *P. larvae*. 5: Controles positivos de *N. ceranae* (218 pb), *N. apis* (321 pb), *A. apis* (485 pb) e *P. larvae* (699 pb). 6: Controle Negativo.

Poucos trabalhos acerca da detecção de patógenos em produtos apícolas buscam detalhar o limiar de detecção. Em relação à detecção do microsporídio *Nosema* sp. por exemplo, Giersch et al. (2009) analisaram amostras de mel contaminadas com *Nosema* sp. na Austrália, mas não detalharam os limiares de detecção obtidos na técnica utilizada. Em mel, Puker (2011) obteve limiar de detecção de 100 esporos/mL de mel em reações de PCR monoespecífica e multiplex. Tal sensibilidade, neste caso, não foi determinada por meio de curva de inoculação artificial, mas sim se efetuando projeções matemáticas (Puker, 2011, informação pessoal). No mesmo trabalho, o autor apresentou resultados acerca da detecção da bactéria *P. larvae* e do fungo *A. apis*, obtendo limiares de detecção de 10 UFC/ml de mel, tanto em reações monoplex quanto em reações multiplex e 10 e 100 esporos/mL de mel em reações monoplex e multiplex, respectivamente. Reynaldi et al. (2003) também utilizaram técnica molecular para detecção de *A. apis* em mel, porém, os autores não apresentaram limiares de detecção.

Após a adequação do processamento de amostras e obtenção dos limiares de detecção dos patógenos, o protocolo padronizado foi aplicado em produtos apícolas comercializados no estado de São Paulo a fim de diagnosticar a presença ou ausência de *Nosema* sp., *A. apis* e *P. larvae*. Trinta e nove amostras de produtos apícolas foram analisadas, sendo *N. ceranae* o patógeno com maior incidência nas amostras, variando de 63,6% em amostras de pólen a 83,3% em amostras de mel (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de amostras de pólen, de mel e de geleia real contaminados com *Nosema ceranae*, *Ascospaera apis* e *Paenibacillus larvae*, comercializadas no Estado de São Paulo.

Matriz	<i>N. ceranae</i>	<i>A. apis</i>	<i>P. larvae</i>	Isentas de contaminação
Pólen N=11	7	5	1	3
Mel N= 18	15	1	0	3
Geleia Real N= 10	7	0	0	3

Em relação ao microsporídeo *Nosema ceranae*, embora este patógeno esteja presente em diversas partes do mundo (Higes et al., 2006; Klee et al., 2007; Paxton et al., 2007; Fries, 2010) e esteja relacionado ao declínio populacional de abelhas (Martín-Hernandez et al., 2007; Higes et al., 2008a), não existem técnicas oficiais para detecção deste microsporídeo em produtos apícolas apresentadas pela Organização mundial de saúde animal (OIE, 2013) no Manual de Testes de Diagnósticos e Vacinas para Animais Terrestres, assim como no trabalho realizado por Fries et al. (2013), o qual se constitui em coletânea de protocolos padrões para pesquisa de patógenos apícolas (Beebook).

Considerando o fungo *A. apis*, a coletânea de protocolos também não apresenta técnicas para detecção deste patógeno (Jensen et al. 2013).

Para detecção da bactéria *P. larvae* em mel, é sugerida pela OIE (2008) análise microbiológica, onde 25 mL de mel devem ser diluídos em um volume igual de água destilada e centrifugados a 3.000 x g durante 30 minutos. O sobrenadante é descartado e o pellet resuspenso para 200 µL de água destilada estéril. Embora seja semelhante, a técnica apresentada neste trabalho utiliza centrifugação de 12.500 x g por 40 min a fim de detectar não somente *P. larvae*, mas também outros patógenos de importância apícola como *Nosema* sp. e *A. apis*.

Em amostras de pólen, obtivemos sucesso efetuando filtração de 10 g de pólen com auxílio de bomba de vácuo, semelhante à técnica preconizada pela OIE (2008), onde é sugerida a diluição de apenas 1 g do produto em 10 mL de água destilada estéril e filtração simples através de papel filtro Whatman 1. A utilização de bomba de vácuo permite filtração mais rápida e eficaz, além disso, a técnica apresentada neste estudo abrange maior quantidade do produto (10 g), podendo obter resultados mais confiáveis.

Para detecção da bactéria em geleia real, a OIE (2008) sugere a mesma metodologia usada para detritos, abelhas adultas e cera, porém considera amostras deste produto como “solução de esporos” a qual pode ser submetida à PCR após a centrifugação de 5.000g por 5 minutos utilizando de 1-5ul do sobrenadante como DNA template numa reação de PCR de 50ul. A mesma reação de PCR é sugerida para mel e pólen.

Nas amostras de geleia real analisadas, três (30%) estavam livres de qualquer contaminação por patógenos e as outras sete amostras (70%) mostraram-se positivas para o microsporídeo *N. ceranae* (Figura 4).

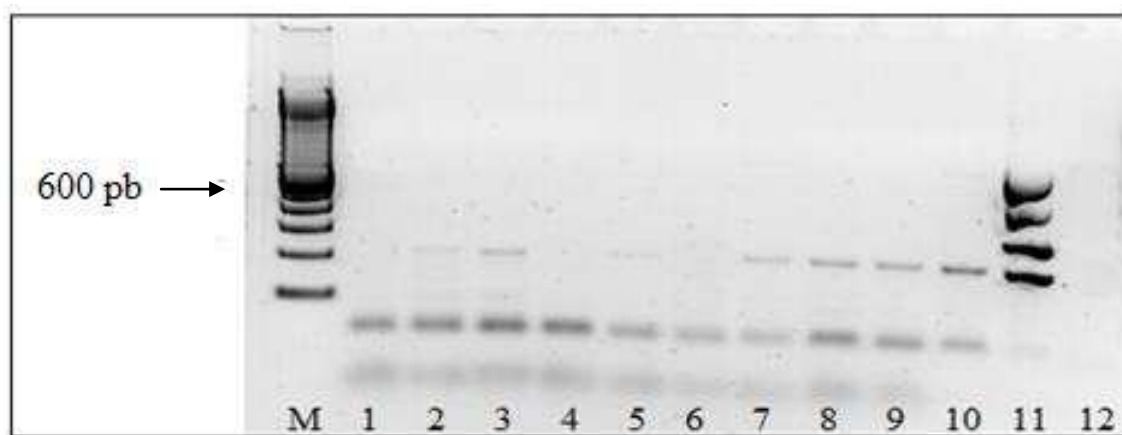


Figura 4: Gel de agarose (2%) corado com SYBR® Safe dos produtos de PCR multiplex referentes à detecção de patógenos em amostras de geleia real comercializadas no Estado de São Paulo. M: Marcador de 100 pb (Invitrogen®). 1 – 10: Amostras de geleia real detentoras de S.I.F.. 11: Controle Positivo de *N. ceranae* (218 pb), *N. apis* (321 pb), *A. apis* (485 pb) e *P. larvae* (699 pb). 12: Controle Negativo.

Nas amostras analisadas foram detectadas apenas amostras contaminadas pelo microsporídio *N. ceranae*. Este resultado corrobora com o apresentado por Chen et al. (2010) de que esporos desta espécie de microsporídio não afetam apenas células do intestino médio, mas também glândulas hipofaríngeas, entre outras estruturas. Além disso, não foi detectada contaminação por parte do fungo *A. apis* e da bactéria *P. larvae*, o que pode ser atribuído à presença do peptídeo realisina na geleia real.

O peptídeo realisina (royalisin) foi isolado por Fujiwara et al. (1990), onde os autores observaram sua ação contra bactérias gram-positivas. Desde então, alguns estudos foram realizados acerca das propriedades imunológicas de compostos presentes na geleia real, os quais parecem desempenhar papéis de defesa nas abelhas contra patógenos. Biliková et al. (2001) apresentaram um processo para preparação natural de realisina, estudando também sua atividade antibiótica. Os autores observaram atividade de defesa contra a bactéria *P. larvae*, além de sugerirem atividade antifúngica. Logo, foi possível concluir que este peptídeo presente na geleia real é um dos principais constituintes que combatem bactérias e fungos nas abelhas (Fujiwara et al., 1990; Biliková et al., 2001; Fontana et al., 2004).

Das 18 amostras de mel, apenas três (16,6%) não apresentaram contaminação pelos patógenos analisados. As quinze amostras restantes (83,3%) apresentaram resultado positivo para o microsporídio *N. ceranae*, sendo que uma delas (5,5%) apresentou *N. ceranae* e *A. apis* simultaneamente (Figura 5).

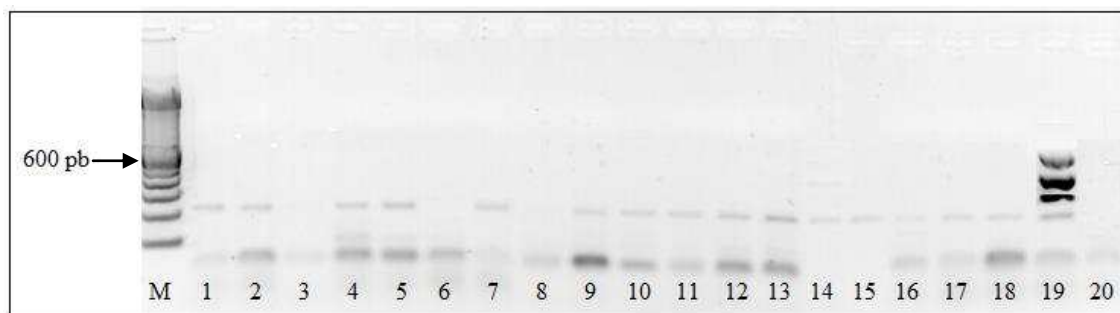


Figura 5: Gel de agarose (2%) corado com SYBR® Safe dos produtos de PCR multiplex referentes à detecção de patógenos em amostras de mel comercializados no Estado de São Paulo. M: Marcador de 100 pb (Invitrogen®). 1 – 18: Amostras de mel registradas no S.I.F.. 19: Controle Positivo de *N. ceranae* (218 pb) e *N. apis* (321 pb) 20: Controle Positivo de *A. apis* (485 pb). 21: Controle Positivo de *P. larvae* (699 pb). 22: Controle Negativo.

O microsporídio *N. ceranae* foi o patógeno mais prevalente nas amostras de mel analisadas. Este microsporídio foi identificado em abelhas *Apis cerana* por Fries et al. (1996) e mostrou rápida disseminação em abelhas *A. mellifera* em diversas partes do mundo, tendo sua presença confirmada em cinco continentes (Higes et al., 2006; Klee et al., 2007; Paxton et al., 2007; Fries, 2010). Esta dispersão pode ter ocorrido através do trânsito de abelhas, seja naturalmente ou na forma de pacotes de abelhas de forma legal ou ilícita, sem o devido crivo sanitário, além do comércio de produtos apícolas contaminados com o microsporídio.

Além da técnica apresentada neste trabalho, outra técnica capaz de detectar *Nosema* sp. em mel foi realizada por Giersch et al. (2009). Os autores analisaram amostras importadas e originadas da Austrália, onde detectaram *N. apis* e *N. ceranae* através de processamento semelhante ao apresentado neste trabalho (50 mL de mel diluídos em PBS e centrifugados a 3.000g por 45 min.).

Puker (2011) também apresentou técnica para detecção de *Nosema* sp., além de *A. apis* e *P. larvae* em mel. O autor utilizou 20 ml do produto diluídos em 45 ml de água estéril, centrifugados a 10.000 x g por 40 min.

Embora a técnica apresentada aqui necessite de maior tempo e velocidade de centrifugação, é importante ressaltar que tal procedimento é realizado a fim de detectar simultaneamente os três patógenos analisados.

Dentre as 11 amostras de pólen, apenas três (27,2%) estavam livres de qualquer contaminação envolvendo os patógenos analisados (Figura 4). Do restante, sete amostras (63,6%) estavam contaminadas com *N. ceranae*, cinco (45,4%) com *A. apis* e uma amostra (9,0%) com *P. larvae*. Quatro amostras (36,3%) apresentaram contaminação por *N. ceranae* e *A. apis* e uma (9,0%) apresentou contaminação por *N. ceranae* e *P. larvae* (Figura 4).

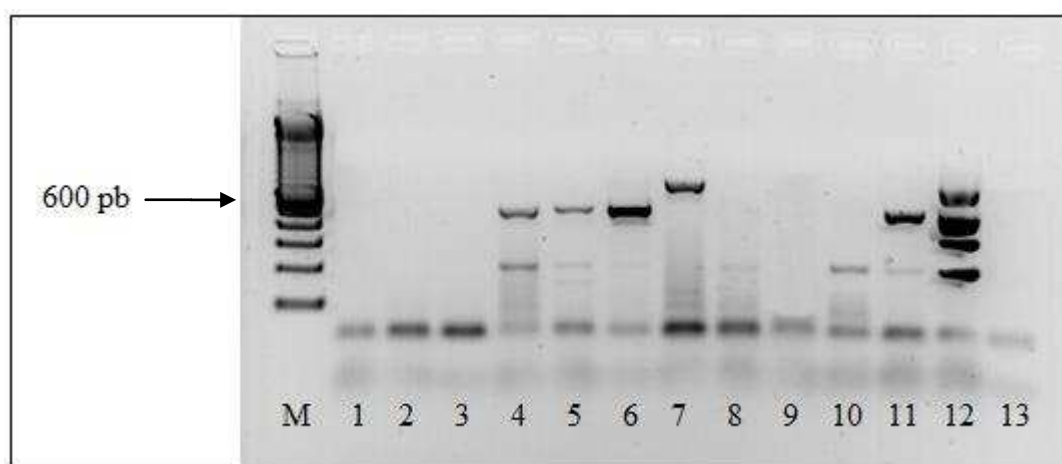


Figura 6: Gel de agarose (2%) corado com SYBR® Safe dos produtos de PCR multiplex referentes à detecção de patógenos em amostras de pólen apícola comercializados no Estado de São Paulo. M: Marcador de 100 pb (Invitrogen®). 1 – 11: Amostras de pólen registrados no S.I.F.. 12: Controle Positivo de *N. ceranae* (218 pb), *N. apis* (321 pb), *A. apis* (485pb) e *P. larvae* (699 pb). 13: Controle Negativo.

Até o momento, apenas Higes et al. (2008b) haviam mostrado contaminação de *Nosema* em pólen. Os autores detectaram esporos de *N. ceranae* em cargas de pólen da corbícula coletadas em abelhas *A. mellifera* na Espanha utilizando microscopia e PCR.

Ao contrário de *Nosema* sp., em relação ao fungo *A. apis* vários estudos confirmaram a importância do pólen como transmissor de esporos do patógeno (Hale e Menapace, 1980; Flores et al., 2005a). Este produto é normalmente utilizado pelos apicultores como alimento para suas colmeias e a transmissão de esporos de *A. apis*, assim como de outros patógenos, se torna ainda mais fácil considerando a alimentação de colônias saudáveis por pólen retirado de colônias contaminadas. Além disso, devido ao comportamento higiênico, as abelhas operárias removem as abelhas doentes e descartam na entrada da colmeia, onde geralmente são acoplados os coletores de pólen. Estes coletores formam um reservatório de tudo que é retirado pelas abelhas no processo de limpeza, inclusive esporos de *A. apis*, os quais podem permanecer viáveis no ambiente por cerca de 15 anos (Hornitzky, 2010).

Em relação à detecção da bactéria *P. larvae*, no Brasil, a Cria Pútrida Americana é considerada uma doença exótica, sendo oficialmente detectada uma única vez, no estado do Paraná, em 2006 (MAPA, 2006). Por este fato, para confirmação de que se tratava realmente de contaminação pela bactéria, foi realizada análise triplicata da amostra de pólen suspeita e, após resultado positivo por meio de eletroforese, os produtos da PCR foram sequenciados e comparados com sequências contidas no GenBank (número de acesso AY030079.1), as quais confirmaram a presença de *P. larvae* mostrando 99% de homologia.

Os resultados da análise palinológica quantitativa e qualitativa de cada amostra de mel e pólen apícola constituíram seus espectros polínicos. Estes espectros são relativos à distribuição das plantas produtoras de néctar (nectaríferas) e às produtoras de grãos de pólen (poliníferas) de determinada região geográfica. A determinação das famílias botânicas, a partir da morfologia polínica, não apresentou grande obstáculo, porém em relação ao gênero, isso nem sempre foi possível.

Na maioria dos casos não se pôde determinar a espécie, de modo que foi preciso limitar-se ao tipo polínico (tipo morfológico do grão de pólen). As amostras de mel e pólen consideradas como monoflorais foram aquelas cuja contribuição polínica de uma planta foi dominante e as biflorais, quando ambas as contribuições constituíram pólen acessório. Já nos méis heteroflorais não houve nenhuma dominância. As amostras de mel e pólen consideradas como monoflorais foram aquelas cuja contribuição polínica de uma planta foi dominante e as biflorais, quando ambas as contribuições constituíram pólen acessório. Já nos méis heteroflorais não houve nenhuma dominância.

A representatividade polínica revelou recursos poliníferos de plantas arbóreas, arbustivas e herbáceas típicas tanto do interior da Mata Atlântica do sudeste e sul do Brasil quanto de clareiras e trilhas, assim como de cultivadas em hortas. Nenhum pólen exótico foi identificado. Os tipos polínicos identificados nessas amostras estão apresentados no Apêndice.

CONCLUSÃO

O processamento de amostras de produtos apícolas padronizado foi capaz de detectar esporos de *N. ceranae*, *A. apis* e *P. larvae* em amostras de mel, de pólen e de geleia real comercializados no estado de São Paulo. A detecção de tais patógenos em produtos apícolas afigura-se como de extrema importância e poderão servir de subsídios para diretrizes governamentais, com fortalecimento de indicações de conduta para o controle sanitário de produtos apícolas, uma vez que o comércio e seus aspectos de globalização, bem como o deslocamento de colônias entre regiões, podem desempenhar um papel importante na dispersão de patógenos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Barth, O. M. (1970a). Análise microscópica de algumas amostras de mel. 1. Pólen dominante. *Anais da Academia Brasileira de Ciência*, 42:351-366. p.351-366.
- Barth, O. M. (1970b). Análise microscópica de algumas amostras de mel. 2. Pólen acessório. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 42:571-590.
- Barth, O. M. (1970c). Análise microscópica de algumas amostras de mel. 3. Pólen isolado. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 42:747-772.
- Barth, O. M. (1970d). Análise microscópica de algumas amostras de mel. 4. Espectro polínico de algumas amostras de mel do Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Brasil. de Biologia.* 30:575-582.
- Barth, O. M. (1989). *O pólen no mel brasileiro*. Editora Luxor, Rio de Janeiro.
- Barth, O. M. (1990). Pollen in monofloral honeys from Brazil. *J. of Apicul. Res.* 29:89-94.
- Bassi, S., Carra, E., Carpana, E., Paganelli, G. L., Pongolini, S. (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.
- Bíliková K., Wu G., Simúth J. (2001). Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor, *Apidologie.* 32:275–283.

- Blanchard, P., Schurr, F., Celle, O., Cougoule, N., Drajnudel, P., Thiéry, T. (2008). First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). *J. Invert. Pathol.* 99:348–350.
- Borneck, R., Viry, A., Martín-Hernández, R. Higes, M. (2010). Honey bee colony losses in the Jura Region, France and related pathogens. *J. Apic. Res. and Bee World.* 49:334–336.
- Calderón, R. A., Sanchez, L.A., Yañez, O., Fallas, N. (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.
- Castagnino, G. L. B., D., Message, Barreto, R. W. (2006a). Primeiro relato da doença “cria-giz” em abelhas *Apis mellifera* no estado de Minas Gerais. *Ceres.* 53:234–236.
- Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., Vanengelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S., Lipkin, W.I. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science.* 318:283–287.
- Ellis, J. D., Munn, P. A. (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.

- Fontana, R., Mendes, M. A., de Souza, B. M., Konno, K., Marcondes, L. M. (2004) Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the royal jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides*. 25: 919–928.
- Freitas, A. S., Barth, O. M., Luz, C. F. P. (2010). Análise polínica comparativa e origem botânica de amostras de mel de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) do Brasil e da Venezuela APACAME. *MESAGEM DOCE*, nº 106.
- Fries, I., Feng, A. F., Silva, S. B., Slemenda, N., Pieniazek, J. (1996). *Nosema ceranae* (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.
- Fries, I. (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 103: 573-579.
- Fries, I., Chauzat, M. P., Chen, Y. P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., Higes, M., McMahon, D. P., Martín-Hernández, R., Natsopoulou, M., Paxton, R. J., Tanner, G., Webster, T. C., Williams, G. R. (2013). Standard methods for *Nosema* research. *J.1 of Apicul. Res.* 52(1):(2013).
- Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T. K. (1990) A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *J. Biol. Chem.* 265:11333–11337.
- Genersch, E., vonderOhe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Buchler, R., Berg, S., Ritter, W., Muhlen, W., Gisder, S., Meixner, M., Liebig, G., Rosenkranz, P. (2010). The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*. 41:332–352.
- Giersch, T., Berg, T., Galea, F., Hornitzky, M. (2009). *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie*. 40:117-123.

- Gilliam, M., Taber, S., Lorenz, B.J., Prest, D.B. (1988). Factors affecting development of Chalkbrood disease in colonies of honey bees, *Apis mellifera*, fed pollen contaminated with *Ascosphaera apis*. *J. Invertebr. Pathol.* 52:314-325.
- Graaf, D. C., Alippi, A. M., Antúnez, K., Aronstein, K. A., Budge, G., De Koker, D., De Smet, L., Dingman, D. W., Evans, J. D., Foster, L. J., Fünfhau, A., Garcia-Gonzalez, E., Gregorc, A., Human, H., Murray, K. D., Nguyen, B. K., Poppinga, L., Spivak, M., vanEngelsdorp, D., Wilkins S., Genersch, E. (2013). Standard Methods for American Foulbrood research. *J. of Apicul. Res.* 52(1):(2013).
- Hale, P. J., Menapace, D. M. (1980). Effect of time and temperature on the viability of *Ascosphaera apis*. *J. Invertebr. Pathol.* 36:429–430.
- Hamiduzzaman, M. M., Guzman-Novoa, E., Goodwin. P. H. (2010). A multiplex PCR assay to diagnose and quantify *Nosema* infections in honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 105:151–155.
- Hansen, H., Brodsgaard., C. J. (1999). American foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World.* 80:5–23.
- Heath, L.A.F., Gaze, B.M. (1987). Carbon dioxide activation of spores of the Chalkbrood fungus, *Ascosphaera apis*. *J. of Apicult. Res.* 26:243-246.
- Higes, M., Martín -Hernández R., Meana, A. (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J. Invertebr. Pathol.* 92:93-95.
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., Botías, C., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A.V., Barrios, L., Del Nozal, M.J., Berna, J. L., Jiménez, J. J., Palencia, P. G., Meana, A. (2008a). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol.* 10: 2659-2669.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., García-Palencia, P., Meana, A. (2008b). Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *J. Inv. Pathology.* 76-78.

- Higes M., Martín-Hernández R., Garrido-Bailón E., Botías C., García-Palencia P., Meana A. (2008c). Regurgitated pellets of *Merops apiaster* as fómites of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores, *Environ. Microbiol.* 5:1374–1379.
- Higes, M., Matin-Hernandez, R., Garrido-Bailón E., Botías C., Meana A. (2009). First detection of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in African Honey bees (*Apis mellifera intermissa*). *J. of Apic. Res.* 48:217–219.
- Higes, M., Matin-Hernandez, R., Meana, A. (2010). *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie.* 41, 375-392.
- Hornitzky, M. (2010). Honey bee diseases, Australia and New Zealand Standard Diagnostic Procedure, 2003. 20p.
- Invernizzi, C., Abud C., Tomasco, I.H., Harriet, J., Ramallo, G., Campa, J., Katz, H., Gardiol, G., Mendonça, Y. (2009). Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *J. Inverteb. Pathol.* 101:150-153
- Jensen, A. B., Aronstein, K., Flores, J. M., Vojvodic, S., Palacio M. A., Spivak , M. (2013). Standard methods for fungal brood disease research. *J. of Apicult. Res.* 52(1).
- Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D. Q., Chinh, T. X., Puerta, F., Ruz, J. M., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I., Paxton, R. J. (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*, *J. Invertebr. Pathol.* 96:1-10.
- Kluser, S., Peduzzi, P. (2007). Global pollinator decline: a literature review. Geneva: UNEP/GRID. 17p.
- Koenig, J. P., Boush, G. M., Erickson Jr., E. H. (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.

- MAPA. Nota técnica DSA nº52/2006. Ocorrência de “Cria Pútrida Americana” no município de Quatro Barras, estado do Paraná-Brasil. Ministry of Agriculture of Brasil, Brasília, 2006.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A. M., Garrido-Bailon, E., Higes, M. (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:6331-6338.
- Martínez, J., Simon, V., Gonzalez, B., Conget, P. (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.
- Maurizio A., Louveaux, J. (1965). Pollens de plantes mellifères d’Europe. Union des groupements apicoles français, Paris. 148.
- Modro, A. F. H., Maia, E., Silva, I. C., Luz, C. F. P., Message, D. (2009). Subamostragem de pólen apícola para análise melissopalínológica. *Hoehnea.* 36: 709-714.
- Moeller, F. E., Williams, P. H. (1976). Chalkbrood research at Madison, Wisconsin. *Am. Bee J.* 116:484–495.
- Murray, K. D., Aronstein, K. A., Jones, W. A. (2005). A molecular diagnostic method for selected *Ascosphaera* species using PCR amplification of internal transcribed spacer regions of rDNA. *J. Apicult. Res.* 44 (2):61–64.
- Muz, M. N., Girisgin, A. O., Muz, D., Aydin, L. (2010). Molecular detection of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infections in Turkish apiaries with collapsed colonies. *J. Apic. Res. and Bee World.* 49:342.
- OIE. (2008). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 6 ed. 2008.

- OIE. (2013). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 7 ed. 2013.
- Oldroyd, B. P. (2007). What's killing American Honey Bees? PLoS Biology. 5:1195-1199.
- Paxton, R. J., Kleea, J., Korpela, S., Fries, I. (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.
- Piccini, C., D'Alessandro, B., Antúnez, K., Zunino, P. (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., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Lucía, M., Botías, C., Meana, A., Abrahamovich, A. H., Lange, C., Higes, M. (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.
- Puker, A. (2011). PCR Multiplex para detecção de patógenos de *A. mellifera* em mel. MsC. Tese. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil. 69p.
- Reynaldi, F. J., Lopez, A. C., Albo, G. N., Alippi, A. M. (2003). Differentiation of *Ascosphaera apis* isolates by rep-PCR fingerprinting and determination of chalkbrood incidence in Argentinean honey samples. J. Apic. Res. 42:68–76.
- Rocha, H. C., Bagagli, E., Funari, S. R. C. (1998). Identificação do fungo *Ascosphaera apis* em colmeias de abelhas *Apis mellifera* L. no estado de São Paulo - SP, Abstr. 12nd Congresso Brasileiro de Apicultura. Salvador, BA. p. 247.
- Salgado-Labouriau, M. L. (2007). Critérios e técnicas para o Quaternário. Editora Edgard Blucher, São Paulo. 404p.

- Sattler, A., Disconzi, M. S., Duarte, V., Silveira, J. R. P. (1998). Ocorrência de *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., L. G. Tochetto, and A. Sattler. (2003). Isolamento de esporos de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* no Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.* 38:441–444.
- Stokstad, E. (2007). The case of the empty hives. *Science.* 316:970–972.
- Teixeira, E. W., Santos, L. G., Sattler, A., Message, D., Alves, M. L. T. M. F., Martins, M. F., Grassi-sella, M. F., Franco, T. M. (2013). *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 114:250-254.

APÊNDICE

Análise polínica dos produtos apícolas detentores de S.I.F., nos quais foram detectados

Ascosphaera apis e *Paenibacillus larvae*

Tabela A. Composição polínica da amostra de mel 14, a qual se mostrou positiva para o fungo *Ascosphaera apis*.

Tipo polínico	Porcentagem (%)
Euterpe/Syagrus (Arecaceae)	1,28% (O)
Persea (Lauraceae)	3,84% (I)
Andira/Machaerium (Fabaceae)	69,23% (D)
Brassicaceae	2,56% (O)
Morus (Moraceae)	1,28% (O)
Struthanthus (Loranthaceae)	1,28% (O)
Matayba (Sapindaceae)	3,84% (I)
Mimosa scabrella (Fabaceae)	1,28% (O)
Ambrosia (Asteraceae)*	-----
Piper (Piperaceae)*	-----
Merremia (Convolvulaceae)	1,28% (O)
Ilex (Aquifoliaceae)	2,61% (O)
Piptadenia (Fabaceae)	1,28% (O)
Allophylus (Sapindaceae)	5,12% (I)
Poaceae*	-----
Antigonum leptopus (Polygonaceae)	1,28% (O)
Cyperaceae*	-----
Datura (Solanaceae)	1,28% (O)
Anadenanthera (Fabaceae)	1,28% (O)
Vernonia (Asteraceae)	1,28% (O)
Total	100%

Tabela B. Composição polínica da amostra de pólen apícola 4, a qual se mostrou positiva para o fungo *Ascospaera apis*.

Tipo polínico	Porcentagem (%)
Euterpe/Syagrus (Arecaceae)	10,34% (I)
Astrocaryum (Arecaceae)	22,10% (A)
Cyperaceae	2,29% (O)
Piptadenia (Fabaceae)	1,14% (O)
Piper (Piperaceae)	14,94% (I)
Ilex (Aquifoliaceae)	8,04% (I)
Amaranthus (Amaranthaceae)	3,44% (I)
Impatiens (Balsaminaceae)	1,14% (O)
Apiaceae	1,14% (O)
Cecropia (Cecropiaceae)	9,20% (I)
Fabaceae	1,14% (O)
Schizolobium parahybum (Fabaceae)	10,34% (I)
Vernonia (Asteraceae)	5,74% (I)
Bidens (Asteraceae)	1,14% (O)
Myrcia (Myrtaceae)	3,44% (I)
Brassicaceae	3,44% (I)
Total	100%

Tabela C. Composição polínica da amostra de pólen apícola 5, a qual se mostrou positiva para o fungo *Ascospaera apis*.

Tipo polínico	Porcentagem (%)
Poaceae	1,33% (O)
Bignoniaceae	8,02% (I)
Antigonum leptopus (Polygonaceae)	4,02% (I)
Amaranthus (Amaranthaceae)	2,66% (O)
Apiaceae	1,33% (O)
Fabaceae	1,33% (O)
Schizolobium parahybum (Fabaceae)	9,33% (I)
Solanaceae	2,66% (O)
Bidens (Asteraceae)	30,66% (A)
Brassicaceae	38,66% (A)
Total	100%

Tabela D. Composição polínica da amostra de pólen apícola 6, a qual se mostrou positiva para o fungo *Ascosphaera apis*.

Tipo polínico	Porcentagem (%)
Euterpe/Syagrus (Arecaceae)	5,00% (I)
Solanaceae	5,00% (I)
Antigonum leptopus (Polygonaceae)	5,00% (I)
Bignoniaceae	10,00% (I)
Amaranthus (Amaranthaceae)	6,25% (I)
Apiaceae	5,00% (I)
Cecropia (Cecropiaceae)	7,5% (I)
Polygonum (Polygonaceae)	1,25% (O)
Schizolobium parahybum (Fabaceae)	16,25% (A)
Baccharis (Asteraceae)	1,25% (O)
Bidens (Asteraceae)	11,25% (I)
Myrcia (Myrtaceae)	1,25% (O)
Brassicaceae	25,00% (A)
Total	100%

Tabela E. Composição polínica da amostra de pólen apícola 7, a qual se mostrou positiva para o fungo *Ascosphaera apis* e para a bactéria *Paenibacillus larvae*.

Tipo polínico	Porcentagem (%)
Euterpe/Syagrus (Arecaceae)	28,57% (A)
Vernonia (Asteraceae)	1,10% (O)
Ambrosia (Asteraceae)	2,19% (O)
Myrcia (Myrtaceae)	24,17% (A)
Ilex (Aquifoliaceae)	1,09% (O)
Fabaceae	1,09% (O)
Mimosa scabrella (Fabaceae)	2,19% (O)
Mikania (Asteraceae)	32,96% (A)
Croton (Euphorbiaceae)	1,09% (O)
Phoradendron (Loranthaceae)	1,09% (O)
Allophylus (Sapindaceae)	1,09% (O)
Schinus (Anacardiaceae)	2,19% (O)
Trema (Ulmaceae)	1,09% (O)
Total	100%

Tabela F. Composição polínica da amostra de pólen apícola 11, a qual se mostrou positiva para o fungo *Ascospaera apis*.

Tipo polínico	Porcentagem (%)
Weinmania (Cunoniaceae)	5,12% (I)
Brassicaceae	30,77% (A)
Schizolobium parahybum (Fabaceae)	10,25% (I)
Ricinus (Euphorbiaceae)	5,12% (I)
Bidens (Asteraceae)	29,50% (A)
Amaranthus (Amaranthaceae)	8,10% (I)
Antigonum leptopus (Polygonaceae)	1,28% (O)
Apiaceae	1,28% (O)
Althernanthera (Amaranthaceae)	1,28% (O)
Morus (Moraceae)	1,28% (O)
Poaceae	3,84% (I)
Solanaceae	1,28% (O)
Total	100%

CAPÍTULO 2

Perfil sanitário de colmeias do Vale do Ribeira, SP

Resumo – Atualmente o declínio populacional de abelhas melíferas vem sendo relatado em diversas partes do mundo. Múltiplos fatores podem estar envolvidos, entre eles as várias doenças que podem acometer esses insetos. Este trabalho teve por objetivo avaliar a presença dos patógenos *Paenibacillus larvae*, *Nosema ceranae*, *Nosema apis* e *Varroa destructor* no Vale do Ribeira, SP, possibilitando o conhecimento do perfil sanitário de apiários dessa região. Amostras oriundas de 15 apiários, localizados em 10 diferentes municípios da região do Vale do Ribeira, foram coletadas, sendo 75 amostras de abelhas campeiras, 62 amostras de favos de cria contendo células operculadas, 68 amostras de favos de mel e 82 amostras de abelhas adultas da área de cria, totalizando 287 amostras. Nenhuma amostra analisada estava contaminada por *P. larvae* ou por *N. apis*. Após contagem em Câmara de Neubauer, a média da intensidade de infecção do microsporídio *N. ceranae* obtida foi de 1.069.033 esporos por abelha e a taxa de infestação do ácaro *V. destructor* foi de 8,88% e 3,26% em abelhas adultas e células de cria, respectivamente. Apenas o haplótipo K do ácaro foi identificado. O número médio de descendentes viáveis deixados por *V. destructor* foi de 3,53 e o potencial reprodutivo de 1,03. Esses resultados reafirmam a considerável frequência da espécie *N. ceranae* (presente em 100% das amostras analisadas) e do ácaro *V. destructor* (presente em mais de 90% das amostras analisadas) em diversas partes do mundo.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, *Paenibacillus larvae*, *Nosema ceranae*, *Varroa destructor*

INTRODUÇÃO

No contexto atual, em que surgem nos diferentes continentes, vários focos de declínio de colônias de abelhas, comprometendo as atividades de polinização e de produtividade das colmeias e, conseqüentemente, da produção agrícola mundial, são necessários estudos voltados para contribuir para o esclarecimento dos referidos fenômenos. No Brasil tais perdas também têm sido constatadas, onde, assim como em outros países, suspeita-se da ação de diversos patógenos, além de agrotóxicos. Muito embora diferentes patógenos que acometem as abelhas venham sendo investigados há mais de dois séculos, novas e importantes descobertas vêm sendo feitas, como consequência de inúmeras pesquisas que visam elucidar as causas envolvidas com tais perdas, enfraquecimento de enxames, além de colapsos de colônias.

Até o momento, o colapso de colônias, designado como Colony Collapse Disorder, ainda não teve suas causas totalmente esclarecidas, porém, acredita-se na possibilidade de uma síndrome multifatorial, que pode envolver mudanças climáticas, uso de pesticidas, doenças, entre outros (Kluser e Peduzzi, 2007).

Tal fenômeno impulsionou o desenvolvimento de grande número de pesquisas na última década, porém, significativas lacunas do conhecimento são ainda existentes.

Vários organismos podem causar doenças às abelhas na fase imatura ou adulta podendo levar a colônia ao colapso (Bailey e Ball, 1991; Ellis e Munn, 2005), entre elas a Nosemose, a Cria Pútrida Americana e a Varroose. Em abelhas adultas, o microsporídeo *Nosema* sp. afeta o sistema digestório dos insetos, podendo causar a redução de abelhas nas colmeias, entre outras conseqüências. Em larvas de abelhas, a Cria Pútrida Americana é considerada a doença mais grave. Esta enfermidade é causada pela bactéria *Paenibacillus larvae*, que contamina as colônias através da ingestão de esporos pelas abelhas (Garrido-Bailón et al., 2013). No Brasil, a doença foi detectada

pela primeira vez em 2006, no Estado do Paraná, onde foram observados sinais clínicos da doença (MAPA, 2006). Porém, no ano de 2001 tal bactéria já havia sido detectada em amostras de mel importado, as quais foram encontradas em um entreposto no Estado do Rio Grande do Sul (Schuch et al., 2003). Nesse caso, não foram observados sinais clínicos da doença e a confirmação da bactéria se deu por análise microbiológica.

O ácaro *Varroa destructor* afeta abelhas adultas (em estado forético) e crias operculadas (estágio de reprodução), este parasita se alimenta da hemolinfa desses insetos, interferindo no desempenho de voo e na redução do tempo de vida (Rosenkranz et al., 2010). Além disso, o ácaro está associado à transmissão de diversos tipos de vírus (Chen e Siede, 2007, Boecking e Genersch, 2008), o que apontou o parasita como um dos principais responsáveis por perdas de colônias de abelhas no mundo (Dahle, 2010; Genersch et al., 2010; Martin et al., 2012). Em virtude da tal importância e, considerando que a taxa de reprodução de um parasita é um fator chave para determinação de sua virulência (Garrido et al., 2003), diversos estudos acerca do perfil genético deste ácaro foram realizados. Anderson e Truemann (2000) realizaram análises morfológicas e genéticas em ácaros de diversas regiões do mundo, separando o parasita em duas espécies (*Varroa jacobsoni* e *Varroa destructor*) e 18 haplótipos, dos quais apenas dois (J - Japonês-Tailandês e K – Coreano-Russo) foram encontrados parasitando *A. mellifera*, inclusive no Brasil.

Neste contexto, monitoramentos preventivos para se conhecer o perfil sanitário de colônias são importantes, em especial as que compõem plantéis comerciais. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a presença de *Varroa destructor*, *Nosema apis*, *Nosema ceranae* e *Paenibacillus larvae*, em apiários da região do Vale do Ribeira, São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas foram efetuadas no mês de abril de 2013 em apiários fixos localizados em 10 municípios do Vale do Ribeira, SP (Figura 1): Apiaí (-24° 30' 34'' S -48° 50' 33'' O), Barra do Chapéu (-24° 28' 23'' S -49° 01' 28'' O), Barra do Turvo (-24° 45' 23'' S -48° 30' 17'' O), Iguape (-24° 42' 29'' S -47° 33' 19'' O), Itapirapuã Paulista (-20° 38' 27'' S -47° 13' 09'' O), Jacupiranga (-24° 41' 33'' S -48° 00' 08'' O), Juquiá (-24° 19' 15'' S -47° 38' 05'' O), Pariqueira – Açú (-24° 42' 54'' S -47° 52' 52'' O), Ribeira (-24° 39' 25'' S -49° 00' 32'' O) e Sete Barras (-24° 23' 16'' S -47° 55' 32'' O).

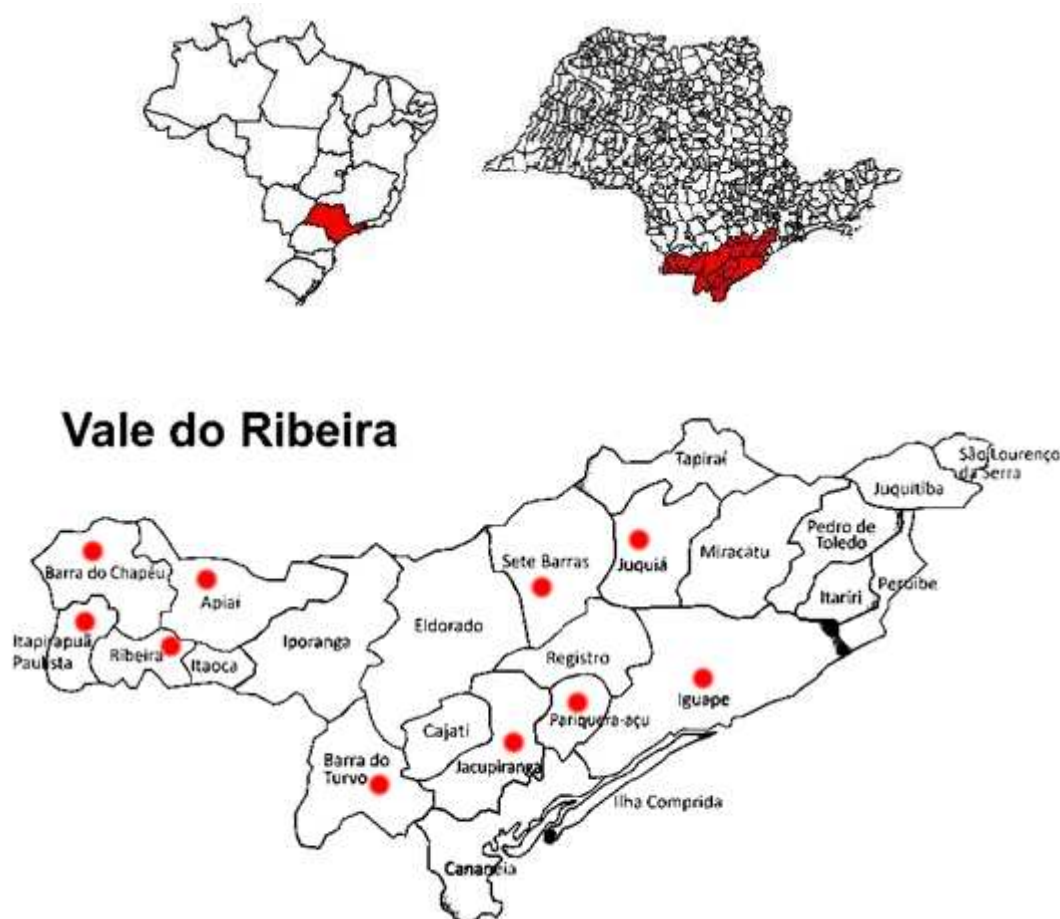


Figura 1: Região do Vale do Ribeira, SP (IBGE – Organização de Carolina Todesco e Rubia Morato) – www.ovaledoribeira.com.br.

A coleta totalizou 287 amostras, sendo 75 amostras de abelhas campeiras, 82 abelhas adultas da área de cria, 62 de favos de cria operculada e 68 de favos de mel em

15 diferentes apiários. As coletas foram efetuadas conforme Teixeira e Message (2010) e as análises realizadas no Laboratório de Sanidade Apícola do Polo Regional do Vale do Paraíba, APTA/SAA-SP.

Procedeu-se a preparação e contagem de esporos do microsporídio *Nosema* sp., segundo Cantwell (1970) com modificações. Após a obtenção do número de esporos, a solução de trinta abelhas maceradas foi submetida à centrifugação de 2.500 x g por 40 minutos à 22°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspendido em 1 mL de água estéril. O precipitado foi transferido para microtubo de 2 mL e centrifugado em 10.000 x g por 5 minutos para concentração do material. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado submetido à extração de DNA pelo DNeasy Plant Mini Kit Qiagen® (Qiagen, Hilden, Germany) para identificação da espécie do microsporídio (*N. apis* ou *N. ceranae*).

As amostras de mel, coletadas próximo à área de cria, foram submetidas à análise microbiológica quanto à presença de *P. larvae* por meio do método de diagnóstico oficial adotado pelo MAPA (Schuch et al., 2001; Brasil, 2003), o qual preconiza a diluição de 20mL de mel em 30 mL de água destilada estéril, os quais são centrifugados a 3000 x g por 30 min. Após a centrifugação o sobrenadante é descartado e o precipitado resuspendido em 1 mL de água destilada estéril. Para o espalhamento do inoculo em placas de Petri contendo ágar *P. larvae* (PL), se procedeu a semeadura pela superfície por meio de espalhamento nas duas repetições, para cada uma das amostras analisadas (utilizando-se 300 µL em cada repetição). Para cada um dos municípios de coleta, amostras compostas foram preparadas, sendo estas representativas dos apiários onde se efetuou coleta, em um mesmo município. Na formação desses pools, foram contemplados, para cada município, todos os apiários visitados, em partes iguais.

As amostras de mel assim obtidas foram homogeneizadas, não sendo considerado assim o fator apiário. Para todos os lotes de amostras analisadas foram preparados controles positivos e negativos. Os controles negativos consistiam de méis estéreis, submetidos à radiação ionizante gama em dose de aproximadamente 960 Gy/10 cm no Departamento de Genética/USP, Ribeirão Preto, SP. Os controles positivos consistiram de méis estéreis e inoculados com esporos da bactéria *P. larvae*, ATCC 9545, (0,5 mL da solução de esporos com concentração correspondendo a aproximadamente 150 a 165 UFC em 20 mL de mel), fornecidos pelo LANAGRO/MAPA, Porto Alegre. Após o plaqueamento, as amostras foram incubadas a 36°C por cinco dias.

Após a inoculação das amostras em ágar PL, para realização de análise molecular, os 400 µL restantes da solução de mel foram centrifugados a 10.000 x g por 5 minutos, o sobrenadante descartado, e o precipitado submetido à extração de DNA pelo DNeasy Plant Mini Kit Qiagen® (Qiagen, Hilden, Germany).

Em termociclador Applied Biosystems Veriti® (Life Technologies®, Foster City, USA) foram conduzidas reações com volume de 20 µL constituídas de 10 µL de Gotaq Green® (Promega®, Madison, USA), 7 µL de água livre de DNase (Promega®, Madison, USA), 1 µL de DNA da amostra (cuja concentração variou entre 1 e 183 ng) e 1 µL de cada primer (10 µM). As reações foram realizadas com as seguintes condições: 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. Para as reações de PCR multiplex foram conduzidas reações com volume de 20 µL constituídas de 10 µL de Gotaq Green® (Promega®, Madison, USA), 2 µL de água livre de DNase (Promega®, Madison, USA), 1 µL de DNA da amostra (cuja concentração variou entre 2 e 18 ng) e 1 µL de cada primer (10 µM). Os primers utilizados estão descritos na Tabela 1. Todas as reações de PCR realizadas continham controles

positivos e negativos, os quais consistiam em DNA de amostra positiva para cada um dos patógenos analisados, e amostra sem adição de DNA molde, respectivamente.

Após o término da reação de PCR, 5 μ L da reação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% (m/v) corado com SYBR SAFE[®] (Life Technologies[®], Carlsbad, USA) em tampão TBE 1X (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico e 2 mM EDTA). Após a eletroforese, o gel foi visualizado em fotodocumentador E-Gel Imager (Life Technologies[®], Carlsbad, USA). O marcador de 100 pb (Invitrogen[®], Carlsbad, EUA) foi utilizado como referência para determinação do tamanho do fragmento de interesse. Os primers utilizados estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Primers utilizados nas reações de PCR.

Patógeno	Primer	Sequência do primer (5' – 3')	Tamanho do produto (pb)	Região-alvo amplificada	Referências
Nosema apis				16S rRNA	Martín-Hernández et al. (2007)
Forward	321APIS	GGGGGCATGTCTTTGACGTA	321		
Reverse	321APIS	GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACAACTATG			
Nosema ceranae				16S rRNA	Martín-Hernández et al. (2007)
Forward	218MITOC	CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTA	218		
Reverse	218MITOC	CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG			
Paenibacillus larvae				16S rRNA	Piccini et al. (2002)
Forward	PI 5	CGAGCGGACCTTGTGTTTCC	700		
Reverse	PI 4	TCAGTTATAGGCCAGAAAGC			

Para análise da taxa de infestação de *V. destructor* em abelhas adultas foi adotada metodologia proposta por De Jong et al. (1982b, c). Em relação às amostras de favos de cria, com base nos dados obtidos, foram avaliados o total de fêmeas adultas por amostra, o número de células de cria infestadas (% total de células infestadas), o número de células infestadas com prole (% células infestadas com prole), o número de descendentes viáveis produzidos por fêmea adulta (descendentes fêmeas que possivelmente chegarão à fase adulta até a emergência da abelha) e o potencial reprodutivo do ácaro (descendentes viáveis dividido pelo número de fêmeas adultas) (Medina e Martin, 1999).

Para se determinar o haplótipo de *V. destructor*, os ácaros adultos encontrados nos favos de cria foram submetidos à extração de DNA segundo Faza et al. (2013) com algumas modificações. Após a extração do material genético, o gene COI do genoma mitocondrial do ácaro foi amplificado utilizando os primers descritos por Navajas et al. (2002):

F 5'-TACAAAGAGGGGAAGAAGCAGCC-3'

R 5'-GCCCCTATTCTTAATACATAGTGAAAATG-3'

A técnica de PCR foi realizada utilizando 7 µL de água ultra-pura nuclease-free Ambion[®] (Life Technologies[®], Foster City, USA), 1 µL de primer F e R, 10 µL de Gotaq Green[®] (Promega[®], Madison, USA) e 1 µL de DNA (cuja concentração variou entre 5 e 505 ng) extraído de cada amostra. As reações foram realizadas em termociclador Applied Biosystems Veriti[®] (Life Technologies[®], Foster City, USA) com as seguintes condições: desnaturação inicial por 4 min a 92°C, seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 min, anelamento a 52°C por 1 min e 30 s e alongamento a 72°C por 1 min e 30 s.

Em seguida análises moleculares foram conduzidas para identificação dos haplótipos J ou K com base em produtos da digestão com enzimas de restrição, XhoI e SacI (Anderson e Fuchs, 1998).

Ambos os haplótipos têm sítio de clivagem para a enzima XhoI, mas apenas o padrão Japonês mostra clivagem pela enzima SacI. Contudo, torna-se necessário o uso da enzima XhoI para confirmação da espécie, pois a espécie *V. jacobsoni*, não possui sítio de clivagem para essa enzima. Para cada enzima, foram realizadas reações separadas, uma com a enzima XhoI e outra com a enzima SacI. Após o término das reações, 5 µL foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% (m/v) corado com SYBR SAFE[®] (Life Technologies[®], Carlsbad, USA) em tampão TBE 1X. O marcador de 100 pb (Invitrogen[®], Carlsbad, EUA) foi utilizado como referência para determinação do tamanho do fragmento de interesse e o gel foi visualizado em fotodocumentador E-Gel Imager ((Life Technologies[®], Carlsbad, USA).

RESULTADOS

Nas 287 amostras testadas, foi encontrada apenas a espécie de microsporídio *N. ceranae* (Figura 1), não sendo detectadas *N. apis*, assim como a bactéria *P. larvae*. O número médio de esporos do microsporídio foi 1.069.033 esporos/abelha e a taxa de infestação do ácaro em abelhas adultas 8,8% (Tabela 1).

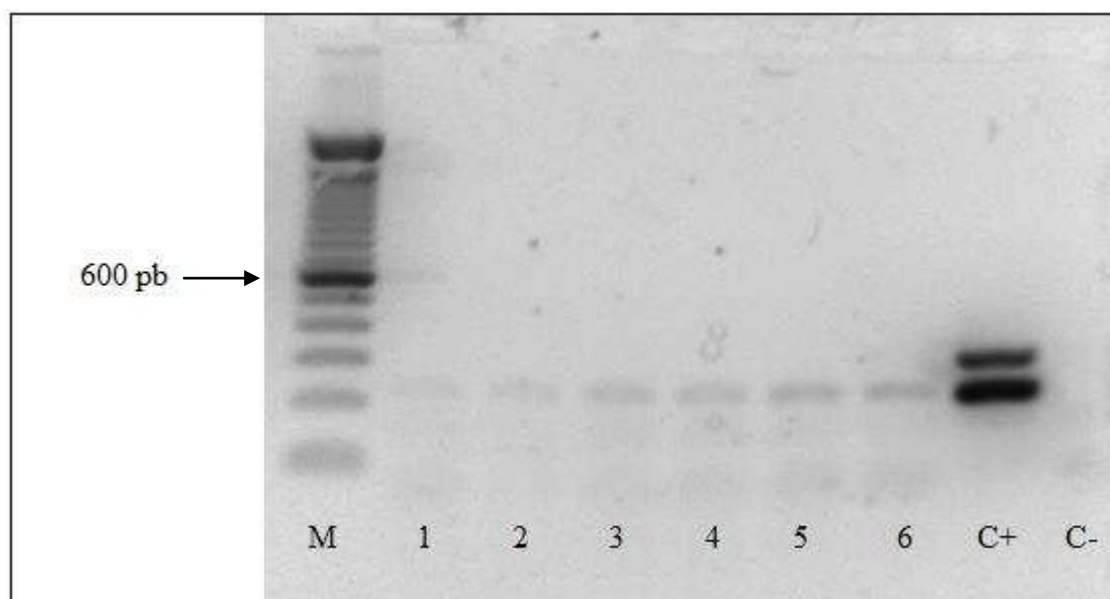


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose (2%) corado com SYBR® Safe dos produtos de PCR referente à detecção do microsporídio *Nosema ceranae*. M: Marcador. 1 – 6: Amostras de abelhas campeiras coletadas no Vale do Ribeira, SP. C+: Controle positivo de *Nosema apis* (321pb) e *Nosema ceranae* (218pb). C-: Controle Negativo.

Tabela 1. Número médio de esporos de *Nosema ceranae* por abelha (ou por mL) coletada no alvado das colmeias e porcentagem de infestação do ácaro *Varroa destructor* em abelhas adultas coletadas na área de cria, em coleta realizada em dez localidades do Estado de São Paulo.

Município	Nº de esporos de <i>N. ceranae</i> (10^3)	V. destructor em abelhas adultas (%)
Apiáí	3010±2870	9,64±8,19
Barra do Chapéu	3087±3253	7,00±2,33
Barra do Turvo	525±534	7,02±3,26
Iguape	70±54	6,42±3,48
Itapirapuã Paulista	1650±1577	12,70±4,97
Jacupiranga	33±28	8,33±1,82
Juquiá	38±67	5,65±5,29
Pariquera-Açu	260±501	9,90±6,23
Ribeira	1375±1944	14,29±7,09
Sete Barras	538±571	10,14±2,89

Na Tabela 2 encontram-se os resultados referentes à infestação pelo ácaro *V. destructor* em favos de cria, correspondendo ao total de fêmeas adultas, à porcentagem de células de cria infestadas, à porcentagem de células infestadas com prole, ao número de descendentes viáveis, ao potencial reprodutivo do ácaro e seu perfil genético. A menor taxa de infestação de fêmeas adultas do ácaro foi encontrada no município de Barra do Chapéu ($0,33 \pm 0,57$), enquanto a maior foi encontrada no município de Pariquera-açu ($5,75 \pm 8,67$). Estes municípios também apresentaram a menor e maior taxa de infestação em relação ao número de células com prole, sendo 0 e $5,75 \pm 8,67$, respectivamente, e ao número de descendentes viáveis deixados por fêmea, sendo 0 e $8,37 \pm 16,22$ respectivamente. Em relação ao potencial reprodutivo, o município de Barra do Chapéu apresentou resultado igual a 0, enquanto o município de Juquiá apresentou $2,05 \pm 2,90$.

Tabela 2. Número de fêmeas adultas, células infestadas, células infestadas com prole, descendentes viáveis produzidos por fêmeas adultas e potencial reprodutivo ácaro *V. destructor* e respectivos desvios padrão em amostras de favos de crias operculadas coletadas em dez localidades do Estado de São Paulo.

Município	Fêmeas adultas	Cels. Inf. (%)*	Cels. Inf. com prole (%)**	Desc. Viáveis***	Potencial reprodutivo****
Apiaí	4,33±2,94	4,50±2,73	4,00±2,36	5,17±3,25	1,13±0,76
Barra do Chapéu	0,33±0,57	0,33±0,57	0	0	0
Barra do Turvo	2,71±3,03	3,40±3,72	1,88±1,65	2,29±2,13	0,46±0,59
Iguape	0,75±2,19	0,81±0,84	0,53±0,69	0,86±1,21	0,43±0,53
Itapirapuã Paulista	4,80±3,70	5,20±2,28	3,80±1,92	4,80±1,92	1,32±0,75
Jacupiranga	5,33±4,50	5,39±3,60	4,05±2,72	5,00±4,35	1,20±0,72
Juquiá	0,80±0,78	1,20±1,11	1,00±1,05	2,10±2,87	2,05±2,90
Pariquera-Açu	5,75±8,67	6,39±10,56	5,12±9,20	8,37±16,22	1,22±1,62
Ribeira	5,50±3,29	6,14±2,71	2,85±3,46	3,00±4,62	0,54±0,73
Sete Barras	2,00±1,63	1,65±1,23	1,42±1,28	2,00±1,63	0,75±0,50

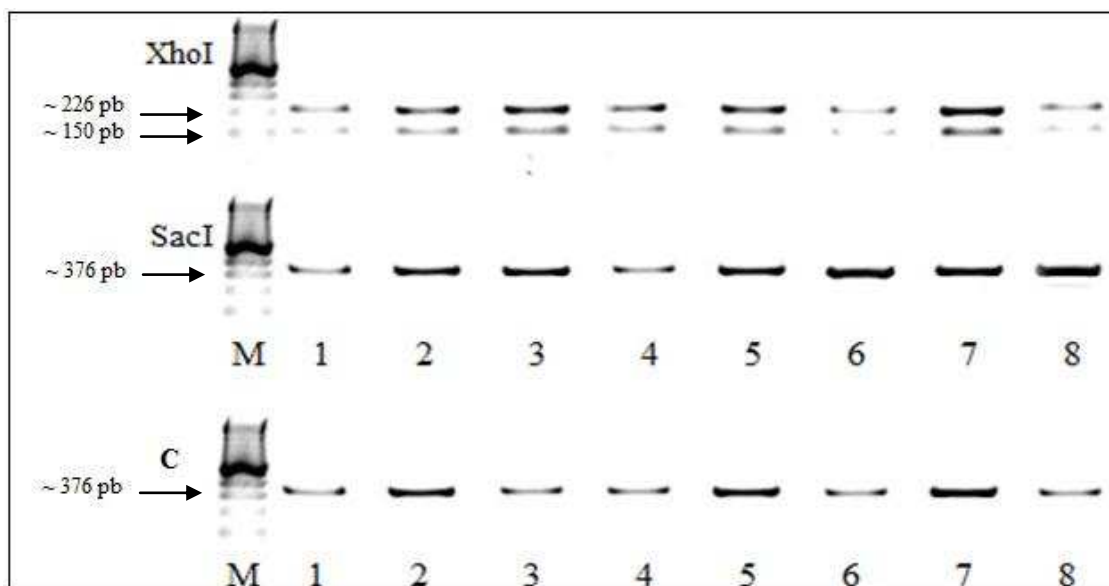
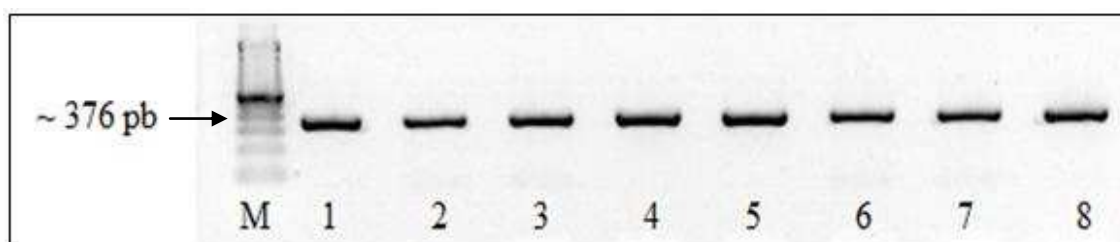
*Células infestadas

**Células infestadas com prole

***Descendentes viáveis (fêmeas que possivelmente se tornarão adultas até a emergência da abelha).

****Potencial reprodutivo (Número de descendentes viáveis dividido pelo número de fêmeas adultas).

Após amplificação do gene mitocondrial COI, as amostras apresentaram o fragmento esperado de 376 pb (Figura 2). Além disso, todas as amostras mostraram resultado positivo para a espécie *V. destructor*, apresentando sítio de clivagem na presença da enzima XhoI (fragmentos de ~150 pb e ~226 pb), além de não apresentarem sítio de clivagem na presença da enzima SacI, caracterizando ácaros de haplótipo K (Figura 3).



DISCUSSÃO

Nesta pesquisa não foi detectada a presença da bactéria *P. larvae* em apiários de 10 municípios do Vale do Ribeira, SP. É importante salientar que, assim como em outros estados brasileiros, não existe cadastro oficial dos apicultores do estado de São Paulo e que as coletas foram efetuadas em apiários identificados por meio de auxílio de cadastro de associações locais, indicações de Escritórios de Desenvolvimento Regional (EDR), bem como de Casas de Agricultura, da Coordenadoria de Assistência Técnica (CATI) da Secretaria de Agricultura e Abastecimento de São Paulo. Tal amostragem, portanto, foi feita segundo as condições e informações existentes, por ausência de ferramenta oficial que indicasse todos os produtores ali existentes, situação que perdura até o momento.

Avaliando os resultados de intensidade de infecção de *N. ceranae* obtidos nos municípios, é possível observar uma grande variação do número de esporos (mínimo de 33.000 ± 28.000 e máximo de $3.087.000 \pm 3.253.000$). Os municípios de Jacupiranga e Juquiá apresentaram as menores intensidades de infecção sendo, 33.000 ± 28.000 e 38.000 ± 67.000 , respectivamente, e os municípios de Barra do Chapéu e Apiaí apresentaram as maiores intensidades, sendo $3.010.000 \pm 2.870.000$ e $3.087.000 \pm 3.253.000$, respectivamente.

Embora os municípios analisados estejam localizados na mesma região, não foi possível observar um padrão de infecção por localidade. Santos et al. (2010) coletaram amostras na região do Vale do Paraíba e também observaram considerável variação na intensidade de infecção entre os municípios analisados (mínimo de 258.000 ± 106.000 e máximo de $1.655.000 \pm 114.000$). A média de 1.069.033 esporos por abelha obtida no presente estudo pode ser considerada semelhante às encontradas em municípios do Vale do Paraíba e Rio Claro, também no Estado de São Paulo (Santos et al., 2010; Santos et

al., 2011). Esses autores encontraram em média 879.000 e 1.167.241 esporos por abelha respectivamente, considerando coletas realizadas na mesma estação do ano (Outono). As maiores intensidades de infecção encontradas no outono podem ser explicadas pelas temperaturas mais baixas que definem esta estação e conseqüentemente, pelo aumento de tempo que as abelhas ficam confinadas nas colmeias, aumentando o risco de transmissão e de infecção (Martín-Hernandez et al., 2009).

Embora não seja observado padrão na intensidade de infecção de *Nosema* sp. em relação à sazonalidade (Martín-Hernandez et al., 2007; Teixeira et al., 2013), este parâmetro tem impacto direto sobre o padrão epidemiológico da Nosemose (Higes et al., 2013).

Os resultados obtidos no presente estudo são semelhantes aos encontrados por Higes et al. (2008a) que observaram maiores intensidades de infecção de *N. ceranae* nos meses mais frios e menores no início da primavera. No país de estudo, Espanha, o microsporídio *N. ceranae* está fortemente relacionado à perda de abelhas, que geralmente ocorre no final do inverno (Martín-Hernandez et al., 2007; Higes et al., 2008a). Em trabalho realizado na Alemanha, Gisder et al. (2010) verificaram que a intensidade de infecção por *Nosema* spp. foi maior na primavera do que no outono.

Os resultados apresentados por estes autores corroboram com a proposta de Fries et al. (2010) de que a infecção por *N. ceranae* parece produzir efeitos distintos em diferentes regiões geográficas, indicando que, embora este patógeno seja amplamente presente, as características biológicas de seu desenvolvimento permanecem desconhecidas (Chen et al., 2009).

Os resultados mostraram presença de *N. ceranae* em todas as amostras analisadas, reforçando a hipótese de que existe a possibilidade de *N. ceranae* ter substituído *N. apis* em diversas localidades (Higes et al., 2006; Klee et al., 2007; Teixeira et al., 2013). *Nosema ceranae* foi encontrada primeiramente em abelhas asiáticas (Fries et al., 1996),

e depois, em abelhas europeias na Europa e Ásia (Higes et al., 2006; Huang et al., 2007), sendo atualmente considerada a espécie que causa o maior problema para a saúde de abelhas melíferas no mundo (Fries, 2010; Higes et al., 2010; Medici et al., 2012; Martinez et al., 2012). Este microsporídeo tem sido frequentemente relacionado com o fenômeno do desaparecimento das abelhas (Cox-Foster et al., 2007; Martin-Hernandez et al., 2007; Higes et al., 2007; Chen et al., 2009). No Brasil, *N. ceranae* foi primeiramente relatada por Klee et al. (2007), porém, segundo Teixeira et al. (2013), esta espécie está presente em território nacional desde a década de 1970.

Em relação ao ácaro *V. destructor*, o presente estudo, todas as amostras analisadas apresentaram ácaros de haplótipo K, resultados que se assemelham aos encontrados por Garrido et al. (2003), onde os autores observaram a predominância do haplótipo K em amostras de Ribeirão Preto – SP e Florianópolis – SC, embora tenha sido encontrado também o haplótipo J. Em Santa Catarina, Strapazzon et al. (2009) também verificaram a existência de ácaros de haplótipo K, entretanto, em Fernando de Noronha – PE, os autores encontraram amostras de haplótipo J. Recentemente no Brasil, Pinto (2012) obteve prevalência de mais 95% do haplótipo K e cerca de 4% do haplótipo J, sendo que três amostras mostraram-se positivas para ambos os haplótipos na mesma colônia.

Segundo Anderson e Truemann (2000), o haplótipo K é normalmente encontrado em localidades onde o ácaro causa graves problemas, ao contrário do haplótipo japonês, que tem uma distribuição mais restrita e é considerado menos danoso (De Guzman e Rinderer, 1999; Zhang et al., 2000).

No Brasil, até o momento, os níveis de infestação são considerados baixos, sem que o ácaro cause grandes prejuízos à apicultura (Moretto et al., 1991). No presente estudo foi encontrada taxa média de infestação de *V. destructor* de 8,8% (mínimo de $5,65 \pm 5,29$ e máximo de $14,29 \pm 7,09$) em abelhas adultas, resultado semelhante aos obtidos por Santos et al. (2010) na região de Rio Claro – SP. Os autores encontraram

taxa de 9,47% em apiários fixos e 6,34% em apiários migratórios, considerando amostras coletadas no mesmo período. Geralmente no Outono, os ácaros são encontrados em estado forético, se alimentando principalmente de abelhas nutridoras (Martin et al., 2001a; Rosenkranz et al., 2010). Considerando os resultados obtidos por município foi observada considerável variação da taxa de infestação tanto em abelhas adultas quanto em favos de cria. No Brasil, até o momento, os níveis de infestação são considerados baixos, sem que o ácaro cause grandes prejuízos à apicultura (Moretto et al., 1991).

Em relação à infestação de *V. destructor* encontradas em favos de cria, foram obtidos resultados bastante variados ($0,33 \pm 0,57\%$ a $5,75 \pm 8,67\%$), mas que podem ser considerados baixos quando comparados ao trabalho desenvolvido por Garrido et al. (2003), que encontrou infestação média de 8% na região de Ribeirão Preto, SP. No Vale do Paraíba, SP, Santos et al. (2010) encontraram níveis de infestação semelhantes (4,66%), assim como na região de Rio Claro, SP (3,58% em apiários fixos e 2,87% em apiários migratórios). A variação das taxas de infestação de *V. destructor* pode estar relacionada ao clima da região estudada, como concluiu Moretto (1997). Por exemplo, se comparados a dados obtidos em países de clima temperado, as taxas de infestação encontradas no presente estudo são consideradas baixas. Kanchev et al. (1989) obtiveram taxas de infestação de 18 a 49% na Bulgária e Martin (1994) (2001b) obtiveram taxas de 15 a 40% e 6 a 42% na Inglaterra e no Reino Unido, respectivamente.

Moretto et al. (1997) também relacionaram a capacidade reprodutiva de *V. destructor* com o clima. Embora os resultados aqui apresentados (0 a $5,12 \pm 9,20$) reforcem a ideia de que as fêmeas mostram fecundidade reduzida em países da América Central e do Sul (Rosenkranz e Engels, 1994; Medina & Martin, 1999), um trabalho realizado por Garrido et al. (2003) mostrou aumento significativo na fertilidade de

fêmeas de *Varroa* na região de Ribeirão Preto-SP, o que foi atribuído à confirmação de uma mudança para o haplótipo K. Carneiro et al. (2007) também encontraram dados que reforçam a ideia de aumento do número de fêmeas férteis do ácaro no Brasil. Segundo os autores, na década de 1980 eram deixadas em média 1,7 descendentes e no período de 2005-2006 passou a apresentar em média 2,6 descendentes. Considerando descendentes viáveis, na década de 1980 as fêmeas deixavam em média 0,7 descendentes viáveis, e em 2005-2006, a média aumentou para 1,4.

No presente trabalho foi obtida média de 3,53 descendentes viáveis deixados por fêmea, resultado semelhante ao obtido por Santos et al. (2010) onde os autores encontraram 3,34 descendentes viáveis em apiários fixos da região de Rio Claro, SP. Em contrapartida, Santos et al. (2010) encontraram potencial reprodutivo de 0,78, enquanto o resultado aqui obtido foi de 1,03. Correa-Marques (2000) obtiveram potencial reprodutivo de 0,64 no Brasil (Ribeirão Preto – SP) e Medina e Martin (1999) obtiveram 0,73 em abelhas africanizadas em Yucatan no México. Em abelhas higiênicas, esse valor normalmente é menor do que o encontrado em abelhas não higiênicas. Ibrahim e Spivak (2006) encontraram potencial reprodutivo de 0,33 de *V. destructor* em abelhas selecionadas. Embora tenham sido apresentados valores mais altos No Brasil, os baixos níveis de infestação podem estar associados ao comportamento higiênico e de “grooming” comumente realizados pelas abelhas africanizadas.

Considerando os resultados obtidos por município, foi observada considerável variação da taxa de infestação tanto em abelhas adultas quanto em favos de cria. Variações climáticas entre os municípios, tipo de manejo e comportamento higiênico das abelhas podem influenciar nas taxas de infestação de *V. destructor*, contribuindo para a variação da dinâmica de infestação deste patógeno na região estudada. Do mesmo modo, Santos et al. (2010) também observaram variações entre níveis de infestação

obtidos em 13 municípios do Vale do Paraíba, assim como Pinto (2012) ao avaliar infestação do ácaro em 58 municípios brasileiros.

Em diversas partes do mundo o ácaro *V. destructor* vem sendo fortemente relacionado ao desaparecimento das abelhas, principalmente pelo fato de atuar como vetor de diversos tipos de vírus, como o DWV, IAPV, ABPQ, KBV e SBV (Bakonyi et al. 2003; Chen et al. 2004; Boecking e Genersch, 2008). Contudo, é importante ressaltar que desde o seu primeiro contato com a *A. mellifera*, a dinâmica populacional do ácaro varia de uma região para outra e que a correlação entre os genótipos deste parasita e a sua fertilidade em diferentes localidades pode ser útil para o melhor entendimento acerca dos efeitos e das relações do ácaro com abelhas em diferentes regiões do mundo.

CONCLUSÃO

Embora se encontrem em locais próximos ao foco de Cria Pútrida Americana, registrado em 2006, amostras de mel coletadas em municípios do Vale do Ribeira, SP, não apresentaram contaminação pela bactéria *P. larvae*. Por outro lado, todas as amostras analisadas apresentaram contaminação pelo microsporídio *N. ceranae*, confirmando a prevalência desta espécie em mais uma região do Estado de São Paulo, assim como a prevalência do ácaro *V. destructor*, presente em 98,8% das amostras de abelhas adultas analisadas e em 79% dos favos de cria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, D. L., Trueman, J. W. H. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp. Appl. Acarol.* 24:165–189.
- Bailey, L. Ball, B.V. (1991). *Honey Bee Pathology*. London: Academic Press, 208p.
- 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.
- Boecking, O., Genersch, E. (2008). Varroosis - the ongoing crisis in bee keeping. *J. Verbr. Lebens.* 3(2):221–228.
- Brasil. (2003). Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa n.º 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal. Anexo, Capítulo XIX Pesquisa de *Paenibacillus* larvae subsp. larvae. Diário Oficial da União, 18/09/2003.
- Cantwell, G. R. (1970). Standard methods for counting nosema spores. *Am. Bee J.* 110:222-223.
- Carneiro, F., Torres, R., Strapazzon, R., Ramirez, S., Guerra, J., Koling, D., Moretto, G. (2007). Changes in the reproductive ability of the mite *Varroa destructor* (Anderson and Trueman) in Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae) colonies in Southern Brazil. *Neotrop. Entomol.* 36:949–952.
- Chen, Y. P., Pettis, J. S., Evans, J. D., Kramer, M., Feldlaufer, M. F. (2004). Molecular evidence for transmission of Kashmir bee virus in honey bee colonies by ectoparasitic mite, *Varroa destructor*. *Apidologie (Celle)*. 35:441–448.

- Chen, Y.P., Siede, R. (2007). Honey bee viruses. *Adv. Virus Res.* 70:33–80.
- Chen, Y. P., Evans J. D., Zhou L., Boncristiani H., Kimura K., Xiao T., Litkowski A. M., Pettis, J. S. (2009). Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 101:204-209.
- Corrêa-Marques, M.H (2000). Sucesso reprodutivo do ácaro *Varroa jacobsoni* em abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) (2000). In: VI Encontro de Abelhas. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, pp. 22–28.
- Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., Vanengelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S., Lipkin, W.I. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science.* 318:283–287.
- Dahle, B. (2010.) The role of *Varroa destructor* for honey bee colony losses in Norway. *J. Apic. Res.* 49:124-125.
- De Guzman, L.I., Rinderer, T.E. (1999). Distribution of the Japanese and Russian genotypes of *Varroa jacobsoni*. *Honeybee Sci.* 19:115-119.
- De Guzman, L.I., Rinderer, T.E. (1999). Identification and comparison of *Varroa* species infesting honey bees, *Apidologie.* 30:85-95.
- De Jong D, De Jong PH, Gonçalves LS (1982b) Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *V. jacobsoni*. *J. Apicult. Res.* 21:165–216.
- De Jong, D., Roma, D. A., Gonçalves, L.S. (1982c). A comparative analysis of shaking solutions for the detection of *Varroa jacobsoni* on adult honey bees. *Apidologie.* 13:297–306.
- Ellis, J. D., Munn, P. A. (2005). The worldwide health status of honey bees. *Bee World.* 86:88–101.

- Faza, A. P., Pinto, I. S. B., Fonseca, I., Antunes, G. R., De Oliveira, M. O. C. M., Daemon, E., Muniz, M. S., Martins, M. F., Prata, M. C. A., Furlong, J. (2013). A new approach to characterization of the resistance of populations of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to organophosphate and pyrethroid in the state of Minas Gerais, Brazil. *Exper. Parasit.* 134:519-523.
- Fries, I., Feng, A. F., Silva, S. B., Slemenda, N., Pieniasek, J. (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.
- Fries, I. (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 103: 573-579.
- Garrido, C., Rosenkranz, P., Paxton, R. J., Gonçalves, L. S. (2003). Temporal changes in *Varroa destructor* fertility and haplotype in Brazil. *Apidologie.* 34:535–541.
- Garrido-Bailón, E., Higes, M., Martínez-Salvador, A. (2013). The prevalence of the honeybee brood pathogens *Ascosphaera apis*, *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius* in Spanish apiaries determined with a new multiplex PCR assay. *Microb. Biotech.* 6:731–739.
- Genersch, E. (2010). American foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 103:S10–S19.
- Gisder, S., Hedtke, K., Mockel, N., Frielitz, M., Linda, A., Genersch, E. (2010). Five-Year Cohort Study of *Nosema* spp. in Germany: Does Climate Shape Virulence and Assertiveness of *Nosema ceranae*? *Appl. Environ. Microbiol.* 76:3032–3038.
- Higes, M., Martín -Hernández R., Meana, A. (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J. Invertebr. Pathol.* 92:93-95.

- Higes, M., Garcia-Palencia, P., Martin-Hernandez, R., Meana, A., 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invertebr. Pathol.* 94, 211–217.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., García-Palencia, P., Meana, A. (2008a). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol.* 10:2659-2669.
- Higes, M., Martin-Hernandez, R., Meana, A. (2010). *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie.* 41:375-392.
- Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C., Martín-Hernandez, R. (2013). *Nosema ceranae* (Microsporidia) a controversial 21 st century honey bee pathogen. *Envir. Microb. Reports.* 5(1):17-29.
- Huang, W. F., Jiang, J. H., Chen, Y. W., Wang C. H. (2007). A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie.* 38:30–37.
- Ibrahim, A., Spivak, M. (2006). The relationship between hygienic behavior and suppression of mite reproduction as honey bee (*Apis mellifera*) mechanisms of resistance to *Varroa destructor*. *Apidologie.* 37:31–40.
- Kanchev, B., Gurgulova, K., Stoimenov, V. (1989). Defective bee and varoatosis. *International Congress of Apiculture (ed) Program and abstract reports.* Rio de Janeiro, pp 145–146.
- Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D. Q., Chinh, T. X., Puerta, F., Ruz, J. M., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I., Paxton, R. J. (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*, *J. Invertebr. Pathol.* 96:1-10.
- Kluser, S., Peduzzi, P. (2007). *Global pollinator decline: a literature review.* Geneva: UNEP/GRID. 20p.

- MAPA. Nota técnica DSA nº52/2006. Ocorrência de “Cria Pútrida Americana” no município de Quatro Barra, estado do Paraná-Brasil. Ministry of Agriculture of Brasil, Brasília, 2006.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A. M., Garrido-Bailon, E., Higes, M. (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:6331-6338.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., García-Palencia, P., Marín, P., Botías, C., Garrido-Bailón, E., Barrios, L., Higes, M. (2009). Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia, *Appl. Environ. Microbiol.* 75:2554–2557.
- Martin, S. J. (1994). Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Exp. Appl. Acarol.* 18:87–100.
- Martin, S. J. (2001a). The role of varroa and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modeling approach. *J. Appl. Ecol.* 38:1082–1093.
- Martin, S. J. (2001b). *Varroa destructor* reproduction during the winter in *Apis mellifera* colonies in UK. *Exp. Appl. Acarol.* 25:321–325.
- Martin, S. J, Highfield, A. C, Brettell, L., Villalobos, E. M, Budge, G. C., Powell, M. (2012). Global honeybee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science.* 336:1304–1306.
- Martínez, J., Leal, G., Conget, P. (2012). *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. *Parasitol. Res.* 111:601-607.
- Medici, S.K., Sarlo, E.G., Porrini, M.P., Braunstein, M., Eguaras, M.J. (2012). Genetic 384 variation and widespread dispersal of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* 385 apiaries from Argentina. *Parasitol Res.* 110:859-864.

- Medina, L., Martin, S. J. (1999). A comparative study of *Varroa jacobsoni* reproduction in worker cells of honeybees (*Apis mellifera*) in England and Africanized bees in Yucatan, Mexico. *Exp. Appl. Acarol.* 23:659–667.
- Moretto, G., Gonçalves, L. S., De Jong, D., Bichuette, M. Z. (1991). The effects of climate and bee race on *Varroa jacobsoni* Oud. infestations in Brazil. *Apidologie.* 22(3):197–203.
- Moretto, G., Gonçalves, L. S., De Jong, D. (1997). Relationship between food availability and the reproductive ability of the mite *Varroa jacobsoni* in Africanized bee colonies. *Am. Bee. J.* 137:67–69.
- Navajas, M., Solignac, M., Le Conte, Y., Cros-Arteil, S., Cornuet, J. M. (2002). The complete sequence of the mitochondrial genome of the honey-bee ectoparasite *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata). *Mol. Biol. Evol.* 19:2313–2317.
- Paxton, R. J., Kleea, J., Korpela, S., Fries, I. (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.
- Piccini, C., D’Alessandro, B., Antúnez, K., Zunino, P. (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.
- Pinto, F. A. (2012). *Varroa destructor*: Perfil genético, taxas de infestação e reprodução em abelhas *Apis mellifera*. MsC. Tese. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil. 43p
- Rosenkranz P., Engels W. (1994). Infertility of *Varroa jacobsoni* females after invasion into *Apis mellifera* worker brood as a tolerance factor against varroaosis, *Apidologie.* 25:402–411.

- Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *J. Invertebr. Pathol.* 1:S96-119.
- Santos, L.G., Teixeira, E. W., Alves, M. L., Message, D., Silva, I.C., Barreto, L.M.R.C. (2010) Perfil da Sanidade Apícola no Vale do Paraíba: Apta, gestão de produção com qualidade. In: 4º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, 2010, Campinas. Anais: 4º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, 2010.
- Santos, L.G., Teixeira, E. W., Alves, M. L., Message, D. (2011) Apicultura Migratória, aspectos sanitários. In: 5º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, 2011, Campinas. Anais: 5º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, 2011. pp
- Schuch, D.M.T., Madden, R.H., Sattler, A. (2001). An improved method for the detection and presumptive identification *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. *Pesq. Agropec. Bras.* 38:441-444.
- Strapazzon, R., Carneiro, F. E., Guerra, J. C. V., Moretto, G. (2009). Genetic characterization of the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) collected from honey bees *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. *Genet. Mol. Res.* 8(3):990-997.
- Teixeira, E. W. & Message, D. (2010). Abelhas. In Marques, G.H.F., Pompei, J.C.A., Martini, M. (coords), *Manual Veterinário de Colheita e Envio de Amostras* (pp 175-213). São Paulo, Ed. Horizonte.
- Teixeira, E. W., Santos, L. G., Sattler, A., Message, D., Alves, M. L. T. M. F., Martins, M. F., Grassi-sella, M. F., Francoy, T. M. (2013). *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 114: 250-254.

Todesco, C. (2010). Presença ausente e ausência presente do Estado na produção do espaço para o turismo no Vale do Ribeira paulista. *Confins* [Online], n 9, posto online em 16 Julho 2010, Consultado em 25 Junho 2014. Disponível em: <<http://confins.revues.org/6484>> .

Zhang, Z. Q. (2000). Notes on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) parasitic on honeybees in New Zealand. *Systematic & Applied Acarology Special Publications* 5: 9-14.