



**EPIDEMIOLOGIA DA NOSEMOSE SOB CONDIÇÕES TROPICAIS EM ABELHAS *Apis mellifera*  
L. AFRICANIZADAS**

Tatiane da Silva **Maia**<sup>1</sup>; Lubiane Guimarães dos **Santos**<sup>2</sup>; Maria Luisa Teles M. F. **Alves**<sup>3</sup>; Dejour **Message**<sup>4</sup>; Érica Weinstein **Teixeira**<sup>5</sup>

**Nº 15306**

**RESUMO** – O declínio de populações de abelhas têm se intensificado nas últimas décadas e dentre os patógenos apontados como possíveis envolvidos com esta problemática estão os fungos unicelulares causadores da nosemose em *Apis mellifera*, *Nosema ceranae* e *Nosema apis*. O presente trabalho teve como objetivos determinar a intensidade de infecção natural de *Nosema* spp., em condições tropicais, avaliando a influência de condições climáticas (temperatura, precipitação e umidade ar) e de local de instalação das colmeias (ambiente coberto ou ao ar livre) na intensidade de infecção. Adicionalmente, avaliou-se se a produção de pólen tinha influência no nível de infecção. Semanalmente, ao longo de 41 semanas, foram coletadas amostras de abelhas campeiras de 20 colônias, das quais dez estavam ao ar livre e dez sobre marquises de alvenaria, com telhado de barro. Os níveis de infecção foram quantificados através de contagem de esporos, em câmara de Neubauer. Técnica PCR duplex foi utilizada para confirmar a espécie de microsporídio presente. As variáveis climáticas foram obtidas em posto meteorológico do PRDTA-VP e em termo-higrômetro instalado no apiário coberto. *N. ceranae* foi a única espécie presente. Não houve diferença do número de esporos por abelha ( $P > 0,01$ ) entre os apiários durante o período estudado (em média  $20,14 \pm 10,81 \times 10^5$  e  $16,02 \pm 8,91 \times 10^5$ , em apiário coberto e ao ar livre, respectivamente). Umidade relativa do ar e precipitação influenciaram a intensidade de infecção do microsporídio ( $P < 0,01$ ) e os maiores valores coincidiram com a época de maior produção de pólen na localidade estudada.

**Palavras-chaves:** *N. apis*, *N. ceranae*, fungo, patógeno, microsporídio.

1Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduanda em Ciências Biológicas, UNITAU, Taubaté-SP; tatianesm.bio@gmail.com

2Colaborador, Bolsista de Pós-graduação em Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.

3Colaborador, Pesquisador da APTA Regional, Polo Vale do Paraíba, Pindamonhangaba-SP.

4Colaborador, Bolsista PVNS/CAPES, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, UFERSA, Mossoró-RN.

5Orientador: Pesquisador da APTA Regional, Polo Vale do Paraíba, Pindamonhangaba-SP; erica@apta.sp.gov.br



## **ABSTRACT-**

Various pathogens have been identified as possible culprits involved with the decline of bee populations in recent decades, including unicellular fungi of the species *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, which cause the nosemosis, one of the most prevalent diseases that affect bees around the world. The objectives of this study were to determine the intensity of natural infection by the microsporidium *Nosema* spp., during one year, under tropical conditions, as well as assess the possible influence of climate conditions (temperature, rainfall and relative humidity) and pollen production. Weekly, during 41 weeks, samples of forager bees were collected from 20 colonies, 10 located under a roof and 10 at the field. The infection levels were quantified by counting the spores of the microsporidium in a Neubauer Chamber under light microscope. Duplex PCR was used to confirm the *Nosema* specie. Climatic data were obtained in the meteorological station of PRDTA-VP. *N. ceranae* was the only microsporidian species present and the number of spores per bee was not different ( $P>0,01$ ) between the apiaries (on average  $20,14 \pm 10,81 \times 10^5$  and  $16,02 \pm 8,91 \times 10^5$  in hive located in a covered and uncovered apiary, respectively). The relative humidity and precipitation influenced the intensity of the microsporidian infection ( $P<0,01$ ) and the highest values coincided with the time of greater production of pollen in the same locality.

**Key-words:** *N. apis*, *N. ceranae*, fungus, pathogen, microsporidium.

## **1 INTRODUÇÃO**

Nosemose é uma das mais importantes e prevalentes doenças de abelhas adultas no mundo (Matheson, 1993; Moritz et al., 2010), cujos agentes etiológicos são os microsporídeos *Nosema apis* e *Nosema ceranae* (Fries, 2010). A infecção é ocasionada através da ingestão de esporos pelas abelhas, os quais se alojam no trato digestivo e germinam nas células epiteliais, sendo liberados junto com as fezes (Somerville e Hornitzky, 2007). Isto resulta em desordens digestivas levando à subnutrição e encurtando o tempo de vida da abelha (Calderón et al 2008), diminuindo a produção de mel nas colônias afetadas, com redução de população e prejuízos à polinização efetuada pelas abelhas, afetando assim a rentabilidade da atividade apícola (Higes et al, 2008). As espécies *N. apis* e *N. ceranae* apresentam semelhanças morfológicas que impedem a confirmação da espécie por microscopia ótica (Weiss e Vossbrinck, 1999), sendo necessária análise molecular de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para diferenciação da espécie (Fries, 2010). Acreditava-se que *N. apis* era a única espécie a parasitar as abelhas *A. mellifera*, entretanto a espécie *N. ceranae* foi identificada pela primeira vez em abelhas melífera asiáticas



## 9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015 10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

(Fries et al., 1996) e posteriormente em abelhas melíferas europeias (Higes et al., 2006). Atualmente a espécie *N. ceranae* pode ser encontrada em diversas partes do mundo e pesquisas sugerem que *N. ceranae* está substituindo gradualmente *N. apis* (Paxton et al., 2007). No Brasil, esta espécie foi primeiramente relatada por Klee et al. (2007), porém está em território nacional desde a década de 1970 (Teixeira et al., 2013).

Nenhum patógeno foi ainda apontado, individualmente, como responsável pelo declínio de populações de abelhas e grupos de estudiosos de diversos países de clima temperado indicam o fungo unicelular como sendo diretamente responsável por tais perdas. Avaliações epidemiológicas e estudos conduzidos em clima tropical podem contribuir de forma significativa para o entendimento de tais fenômenos.

Dado que fatores climáticos podem ter influência no impacto e infecção de *Nosema*, este trabalho teve como objetivo a determinação da intensidade de infecção natural do microsporídio *Nosema* spp. e sua flutuação ao longo de um ano em condições tropicais, em colmeias instaladas em área coberta e ao ar livre, além de avaliar se variáveis climáticas (temperatura, precipitação e umidade do ar) influenciam tais níveis de infecção. Adicionalmente, avaliou-se se a produção de pólen na localidade estudada tinha influência no nível de infecção.

## 2 MATERIAL E METÓDOS

Semanalmente, ao longo de dez meses, foram coletadas abelhas campeiras de 20 colônias, de abelhas africanizadas (*A. mellifera*), sorteadas entre as que compõem os sete apiários do PRDTA-VP, totalizando 820 amostras. As colmeias Langstroth estavam instaladas sobre cavaletes de 50 cm de altura, dez ao ar livre e dez sobre marquise de alvenaria, cobertas com telhas de barro. As coletas, contagem de esporos de *Nosema* sp. e preparo das amostras para extração de DNA foram realizadas de acordo com Teixeira e Message, (2010), Cantwell, (1970) e Martins et al. (2014), respectivamente. Para a confirmação da presença do microsporídio, análise PCR duplex foi realizada, conforme descrito por Teixeira et al. (2013), com programa de PCR composto inicialmente de uma etapa de desnaturação a 94 °C por 2min, em seguida, 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 57 °C por 30 seg e 72 °C 60 seg, além de uma extensão final a 72 °C por 5min.

Dados meteorológicos de temperatura, umidade do ar e precipitação foram obtidos na estação meteorológica do PRDTA-VP, além de temperatura e umidade relativa do ar obtidas em termo-higrômetro instalado no apiário coberto. A umidade do ar medida na estação meteorológica foi obtida apenas entre agosto e novembro de 2014, em virtude de disponibilidade de equipamento.



Deu-se continuidade, todavia, na obtenção desta variável por meio de termo-higrômetro, conforme mencionado.

As contagens de esporos foram transformadas para logaritmo, com vistas à obtenção da normalidade dos resíduos. A análise de variância foi feita conforme Martins et al. (2014), utilizando-se o procedimento GLM do pacote estatístico do SAS (2001). Adicionalmente, dados de produção de pólen foram obtidos no período de novembro de 2014 a maio de 2015, época de produção de pólen na localidade estudada, em seis colônias, com coletores de pólen do tipo intermediário, visando testar o efeito desta variável no nível de infecção do patógeno.

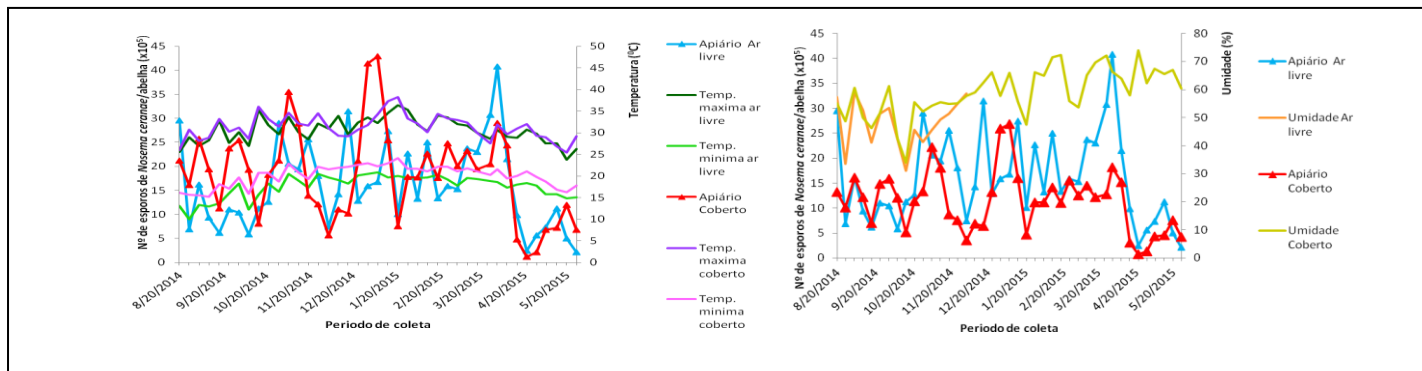
### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Todas as amostras analisadas por meio de PCR duplex apresentaram resultados positivos para a espécie *Nosema ceranae*, não tendo sido detectada a espécie *Nosema apis*. Tal resultado confirma possibilidade da espécie *N. ceranae* ter sobreposto a presença da *N. apis* em diversas localidades (Higes et al., 2006, Klee et al., 2007, Teixeira et al. 2013). Santos et al. (2011), Santos et al. (2014) e Martins et al. (2014) também não identificaram a referida espécie em nenhuma das amostras analisadas.

Na Figura 1 pode-se observar a intensidade de infecção natural de *Nosema ceranae* assim como a temperatura (máxima e mínima) e a umidade do ar em colmeias localizadas ao ar livre e em área coberta. Os resultados indicam que houve flutuação na intensidade de infecção do microsporídio ao longo dos meses analisados (agosto/2014 a maio/2015). Embora a média da intensidade de infecção de *N. ceranae* tenha sido maior nas amostras coletadas em apiários instalados em área coberta, comparando-se com os valores obtidos nas colmeias instaladas ao ar livre (médias de  $20,14 \pm 10,81 \times 10^5$  e  $16,02 \pm 8,91 \times 10^5$  esporos por abelha, respectivamente), essa diferença não foi significativa ( $P > 0,01$ ). A umidade do ar e a precipitação foram os parâmetros meteorológicos que apresentaram correlação ( $P < 0,01$ ) com a intensidade de infecção. Todavia, o local de instalação das colmeias não apresentou influência significativa em relação à variável dependente estudada, diferentemente dos resultados obtidos em ano anterior (período 2013-2014) por Martins et al. (2014) no mesmo local. Tal constatação ocorreu, certamente, em virtude das diferenças climáticas ocorridas entre os anos estudados, já que naquele período os autores constataram que além de apiário coberto ou ao ar livre, tanto temperatura como umidade também influenciavam o índice de infecção de *Nosema*.

Não foi verificado nesta pesquisa um padrão de infecção ao longo do período analisado, corroborando com observações de Teixeira et al. (2013), onde os autores discutem o fato de que

embora *N. ceranae* seja amplamente presente no Brasil, não parece haver padrão na intensidade da infecção deste microsporídeo ao longo do ano em território nacional. Martín-Hernández et al. (2009) também detectaram a falta de sazonalidade com relação à intensidade de infecção por *N. ceranae* ao longo do ano, em diferentes latitudes, considerando-se o clima ou região temperada.



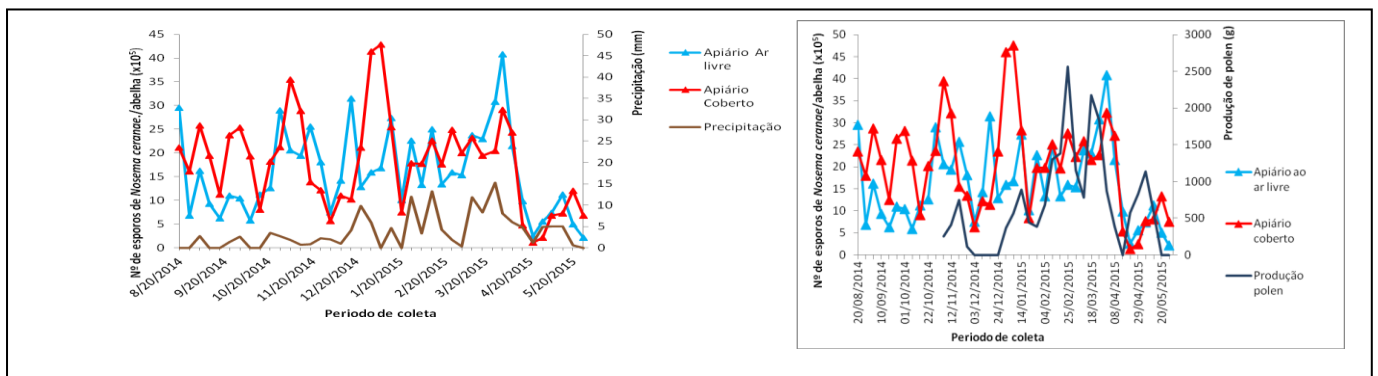
**Figura 1.** Flutuação da intensidade de infecção natural de *N. ceranae* (número médio de esporos/abelha  $\times 10^5$ ) em colmeias em área coberta e localizadas ao ar livre, temperatura máxima e mínima ( $^{\circ}\text{C}$ ) e umidade do ar (%), de agosto de 2014 a maio de 2015. Os valores de umidade obtidos ao ar livre se referem ao período de agosto a novembro de 2014 devido à disponibilidade de equipamento apenas neste intervalo de tempo.

Segundo Martín-Hernández et al. (2009) a elevação da temperatura tende a aumentar o potencial biótico apresentado pelo patógeno (capacidade reprodutiva máxima em condições ideais), favorecendo o crescimento populacional. Os valores das médias das temperaturas máximas e mínimas do local coberto foram um pouco maiores às obtidas no local ao ar livre ( $0,7$  e  $2,5^{\circ}\text{C}$ , respectivamente), porém não o suficiente para influenciar o índice de infecção (Figura 1). A umidade no período que foi avaliada em ambos os apiários (no período de agosto a novembro) se mostrou equivalente à obtida na área coberta e com a interrupção desta medida na área livre, passou-se a considerar a umidade apenas da área coberta para fins de análise do parâmetro umidade (Figura 1), o qual, assim como precipitação (Figura 2), influenciou positivamente ( $P < 0,01$ ) a intensidade de infecção de *N. ceranae*.

A flutuação do número de esporos por abelha acompanhou de certa forma a flutuação da disponibilidade de pólen como recurso proteico na natureza (Figura 2), motivo pelo qual tal parâmetro foi incluído no modelo matemático testado, em relação à variável dependente (intensidade de infecção). Em período mais úmido e de maior precipitação houve maior intensidade de infecção, tanto no local ao ar livre como na área coberta ( $P < 0,01$ ). Martins et al. (2014) demonstrou que umidade do ar elevada está diretamente relacionada à maior taxa de infecção de *N. ceranae* em condições tropicais (no mesmo local da pesquisa ora conduzida). Chen et al. (2012), constataram que a prevalência da infecção de *Nosema* está relacionada com a

temperatura, mas não com umidade. Os autores identificaram correlação negativa significativa da prevalência de *N. ceranae* com a temperatura; onde as maiores contagens de esporos foram registradas a uma temperatura média de cerca de 15°C.

Para Fries (2010) o clima pode ser um fator importante para explicar as diferenças de distribuição das espécies de microsporídios e de seus impactos, pois tanto no continente norte-americano como na Europa a infecção de *N. ceranae* parece prevalecer em climas mais quentes quando comparadas com regiões temperadas de clima mais frio. *N. apis* é frequente nestas regiões. As peculiaridades climáticas das regiões em análise devem ser consideradas, pois podem afetar a intensidade de infecção, mesmo que indiretamente (Le Conte e Navajas, 2008).



**Figura 2.** Flutuação da intensidade de infecção natural de *Nosema ceranae* em colmeias localizadas em área coberta e ao ar livre (número médio de esporos/abelha  $\times 10^5$ ), precipitação (mm) no período de agosto de 2014 a maio de 2015 e produção de pólen (g) de novembro de 2014 a maio de 2015.

Na localidade onde foram instaladas as colmeias do presente estudo, entre o segundo decêndio de novembro e o terceiro decêndio de dezembro, observou-se ausência de pólen na flora natural que é visitada pelas abelhas (Figura 2). Higes et al., 2008a, detectou esporos viáveis de *N. ceranae* no pólen retirado das corbículas das abelhas e nos coletores de pólen. Considerando o pólen apícola como fonte de contaminação, a escassez deste recurso na natureza pode ter influenciado a diminuição da intensidade de infecção de *Nosema ceranae* no período citado. Por outro lado, umidade relativa do ar e precipitação influenciaram a intensidade de infecção do microsporídio ( $P < 0,01$ ) e os maiores valores coincidem com a época de maior produção de pólen na localidade estudada.

#### 4 CONCLUSÃO

As características do local de instalação das colmeias (ao ar livre e em área coberta) não influenciam a intensidade de infecção de *N. ceranae* em abelhas *A. mellifera* africanizadas em clima tropical, no período estudado. Por outro lado, umidade relativa do ar e precipitação





**9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015  
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo**

influenciaram a intensidade de infecção do microsporídio e os maiores valores coincidiram com a época de maior produção de pólen na localidade estudada.

## **5 AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq pela bolsa concedida, a APTA- Regional do Vale do Paraíba. Aos funcionários Carmen e Ronaldo pelo auxílio prestado.

## **6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- CALDERÓN, R. A., SANCHEZ, L. A., YÁÑEZ, O., FALLAS, N. Presence of *Nosema ceranae* in Africanized honey bee colonies in Costa Rica. **Journal of Apicultural Research**, v. 47, p. 328–329, 2008.
- CANTWELL, G. R. Standard methods for counting *Nosema* spores. **American Bee Journal**, v. 110, p. 222-223, 1970.
- CHEN, Y. W., CHUNG, W. P., WANG, C.H., SOLTER L. F., HUANG, W. F. *Nosema ceranae* infection intensity highly correlates with temperature. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.111, p. 264-267, 2012.
- FRIES, I., FENG, F., SILVA, A., SLEMENDA, S. B., PIENIAZEK, N. J. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). **European Journal of Protistology**, v. 32, p. 356-365, 1996.
- FRIES, I. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 103, p. 573-579, 2010.
- HIGES, M., MARTÍN-HERNÁNDEZ R., MEANA, A. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.92, p. 93-95, 2006.
- HIGES, M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., BOTÍAS, C., GARRIDO BAILÓN, E., GONZÁLEZ-PORTO, A. V., BARRIOS, L., DEL NOZAL, M. J., BERNAL, J. L., JIMENEZ, J. J., PALENCIA, P.G., MEANA, A. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. **Environmental Microbiology**, v.10, p. 2659-2669, 2008.
- HIGES, M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., GARRIDO-BAILÓN, E., PALENCIA, P.G., MEANA, A. Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, p. 76 - 78, 2008a.
- 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. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, p.1-10, 2007.
- LE CONTE, I., NAVAJAS, M. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. **Revue Scientifique et Technique**, v. 27, p. 499-510, 2008.



**9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015**  
**10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo**

MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., MEANA, A., GARCÍA-PALENCIA, P., MARRIN, P., BOTÍAS, C., GARRIDO-BAILÓN, E., BARRIOS, L., HIGES, M. Temperature effect on biotic potential of honey bee microsporidia. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, p. 2554-2557, 2009.

MARTINS, R., SANTOS, L. G., ALVES, M. L. T. M. F., MESSAGE, D., TEIXEIRA, E. W. Epidemiologia da nosemose sob condições tropicais em abelhas *Apis mellifera* L. Africanizadas. In: 8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, Campinas, 2014. Disponível: <<http://www.iac.sp.gov.br/areadoinstituto/ciiciac/resumo2014/RE14301.pdf>> Acesso em: 18 jun. 2015.

MATHESON, A. World Bee Health Update. **Bee World**, v.74, n. 4, p. 176-212, 1993.

MORITZ, R.; DE MIRANDA, J.; FRIES, I.; LE CONTE, Y.; NEUMANN, P., PAXTON, R. J. Research Strategies to Improve Honeybee Health in Europe. **Apidologie**, v. 41, n.3, p. 227-242, 2010.

PAXTON, R. J., KLEE, J., KORPELA, S., FRIES, I. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. **Apidologie**, v.38, 558–565. 2007.

SANTOS, L. G., ALVES, M. L. T. M. F., MESSAGE, D., TEIXEIRA, E. W. Apicultura Migratória, aspectos sanitários. ANAIS, 5º CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA- CIIC, Campinas, 2011. **Anais do Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica**. Campinas, 2011.

SANTOS, L. G., ALVES, M. L. T. M. F., MESSAGE, D., F. A. PINTO,, SILVA, M. V. G. B., TEIXEIRA, E. W. Honey bee health in apiaries in the Vale do Paraíba, São Paulo state, southeastern Brazil. **Sociobiology**, v. 61, p. 307-312, 2014.

SAS - Statistical Analysis System SAS User's Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 2001.

SOMERVILLE, D., HORNITZKY, M. *Nosema* Disease. **Primefact** 699, 2007. Disponível em: [http://www.dpi.nsw.gov.au/\\_data/assets/pdf\\_file/0003/177519/nosema-disease.pdf](http://www.dpi.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0003/177519/nosema-disease.pdf) Acesso em: 18 jun. 2015.

TEIXEIRA, E. W., MESSAGE, D. Abelhas. In: **Manual Veterinário de Colheita e Envio de Amostras**. São Paulo, Ed. Horizonte, OMS/OPAS/MAPA. p.175-213, 2010.

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. *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honeybees. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 114, p. 250-254, 2013.

WEISS, L. M., VOSSBRINCK, C. R. Molecular biology, molecular phylogeny, and molecular diagnostic approaches to the microsporidia. In: WITTNER, M., WEISS, L.M. (Eds.), **The Microsporidia and Microsporidiosis**. American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 129–171.