



# Identificação molecular e nível de infecção de *Vairimorpha ceranae* em *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

Molecular identification and level of infection of *Vairimorpha ceranae* in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)

V. S. L. Neves<sup>1\*</sup>; C. M. Peixoto<sup>2</sup>; G. D. Sodr e<sup>2</sup>; C. A. L. Carvalho<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Gradua o em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 44380000, Cruz das Almas-Bahia, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 44380000, Cruz das Almas-Bahia, Brasil

\*vanessaneves2012@hotmail.com

(Recebido em 17 de janeiro de 2023; aceito em 22 de setembro de 2023)

Existem duas espécies de *Vairimorpha* spp. que pode acometer a *Apis mellifera*. *Vairimorpha apis* e *V. ceranae* são responsáveis por causar a doença nosebose, que   considerada uma das doenças mais prevalentes e economicamente devastadoras. Este trabalho teve como objetivo registrar a presença e o nível de infec o de *Vairimorpha* spp. em operárias de *A. mellifera* provenientes de colônias instaladas em apiários comerciais na Região da Bacia do Jacuípe, Bahia, Brasil. Foram realizadas coletas de abelhas em cinco apiários mensalmente durante um ano. As amostras foram transportadas para o laboratório de pesquisa Insecta na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, na cidade de Cruz das Almas, Bahia. Foram realizadas análises por meio de microscopia óptica para detec o de esporos fúngicos e determina o do nível de infec o por meio de contagem dos esporos utilizando câmara de Neubauer. Posteriormente, as amostras nas quais foram observadas a presença de esporos foram submetidas a técnica de Rea o em Cadeia da Polimerase (PCR), para identifica o do fungo a nível de espécie. Os resultados revelam a detec o apenas da espécie *V. ceranae* em todos os cinco apiários avaliados por meio da PCR. O nível de infec o variou de nulo a semi-forte, embora não seja uma infec o forte. A espécie *V. ceranae* foi detectada durante todos os meses do ano e quando as condi oes ambientais são favoráveis tendem a multiplicar-se rapidamente.

Palavras-chave: nosebose, fungo, esporos.

There are two species of *Vairimorpha* spp. that can affect *Apis mellifera*. *Vairimorpha apis* and *V. ceranae* are responsible for causing the disease nosemosis, which is considered one of the most prevalent and economically devastating diseases. This study aimed to record the presence and infection level of *Vairimorpha* spp. in *A. mellifera* workers from colonies located in commercial apiaries in the Jacuípe Basin Region, Bahia, Brazil. Bee samples were collected from five apiaries monthly for one year. The samples were transported to the Insecta research laboratory at the Federal University of Recôncavo da Bahia, in the city of Cruz das Almas, Bahia. Analysis was conducted using optical microscopy to detect fungal spores and determine the infection level through spore counting using a Neubauer chamber. Subsequently, samples in which the presence of spores was observed underwent Polymerase Chain Reaction (PCR) for fungus identification at the species level. The results reveal the detection of only *V. ceranae* species in all five evaluated apiaries through PCR. The infection level ranged from none to semi-strong, although it is not a strong infection. The *V. ceranae* species was detected throughout all months of the year, and when environmental conditions are favorable, they tend to multiply rapidly.

Keywords: nosemosis, fungus, spores.

## 1. INTRODU O

A poliniza o   um servi o ecossist mico essencial para o desenvolvimento das espécies vegetativas, a manuten o da diversidade genética e reprodu o da flora [1]. Embora existam muitos insetos que realizam a poliniza o, as abelhas são os principais polinizadores, sendo que algumas espécies de vegetais dependem diretamente delas para sua manuten o [2].

As abelhas *Apis mellifera* no Brasil são conhecidas também como abelhas africanizadas e são poli-hibridos resultantes do cruzamento das subespécies europeias (*A. m. mellifera* e *A. m. ligustica*) com a subespécie africana (*A. m. scutellata*) [3]. Essas abelhas além de contrib rem

com a polinização são muito importantes por gerarem renda através dos produtos das colônias, que são extraídos e comercializados por apicultores [4].

Assim, diante da importância econômica e social das abelhas africanizadas estudos que monitorem e detectem fatores que contribuem no enfraquecimento e perda de colônias são necessários. O declínio desse grupo polinizador na natureza acarreta prejuízos socioeconômicos como também contribui com uma perda substancial da flora mundial [5]. Diante disso, muitos pesquisadores buscam entender o que pode estar associado a perdas de colônias de abelhas, pois diversos fatores que podem influenciar nesse fenômeno, como o uso indiscriminado de agrotóxicos, patógenos, parasitos, manejo inadequado de colônias, poluição, entre outros [6, 7].

Dentre os patógenos responsáveis por perdas de colônias, existe o fungo do gênero *Vairimorpha*, revisado recentemente por Tokarev et al. (2020) [8], responsável pela doença nosemose, que é considerada uma das mais prevalentes e economicamente devastadoras na apicultura mundial [9]. Existem duas espécies de *Vairimorpha* que podem acometer *A. mellifera*, a *V. apis* e *V. ceranae*, sendo ambas responsáveis por causar a doença [10]. Porém, *V. ceranae* tem se demonstrado mais prevalente tanto a nível individual, quanto da colônia [11].

A infecção por este fungo pode prejudicar o intestino médio e aumentar o consumo de energia pelas abelhas, além de afetar a fisiologia e o comportamento da colônia, caso essa infecção ocorra combinada com fatores abióticos, como a precipitação ou com a presença de parasitos, esse índice pode aumentar e levar a morte dessas abelhas [12].

Diante disso, esse trabalho tem como objetivo registrar a presença e determinar o nível de infecção de *Vairimorpha* spp. em operárias de *A. mellifera* provenientes de colônias instaladas em apiários comerciais na Região da Bacia do Jacuípe, Bahia.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem

As amostras foram provenientes de cinco apiários situados em dois municípios pertencentes a Bacia do Jacuípe: São José do Jacuípe, Bahia (11°25'17" S; 39°52'15" O) e Capim Grosso, Bahia (11°22'54" S; 40°0'46" O) (Figura 1). As coletas foram realizadas sob autorização (número 80448) do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade, durante o período de um ano (janeiro a dezembro de 2021), em apiários com condições populacionais semelhantes. Em cada apiário foram avaliadas vinte colônias, sendo analisadas 150 abelhas por apiário mensalmente, para o nível de infestação. Para a análise molecular foram avaliadas 90 abelhas por apiário nos meses com maior infestação. As abelhas coletadas foram acondicionadas em recipientes contendo álcool 70% e transportadas para o laboratório de pesquisa (INSECTA) na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), em caixas térmicas contendo gelo. Após as abelhas foram conservadas em ultra-freezer a -80°C.

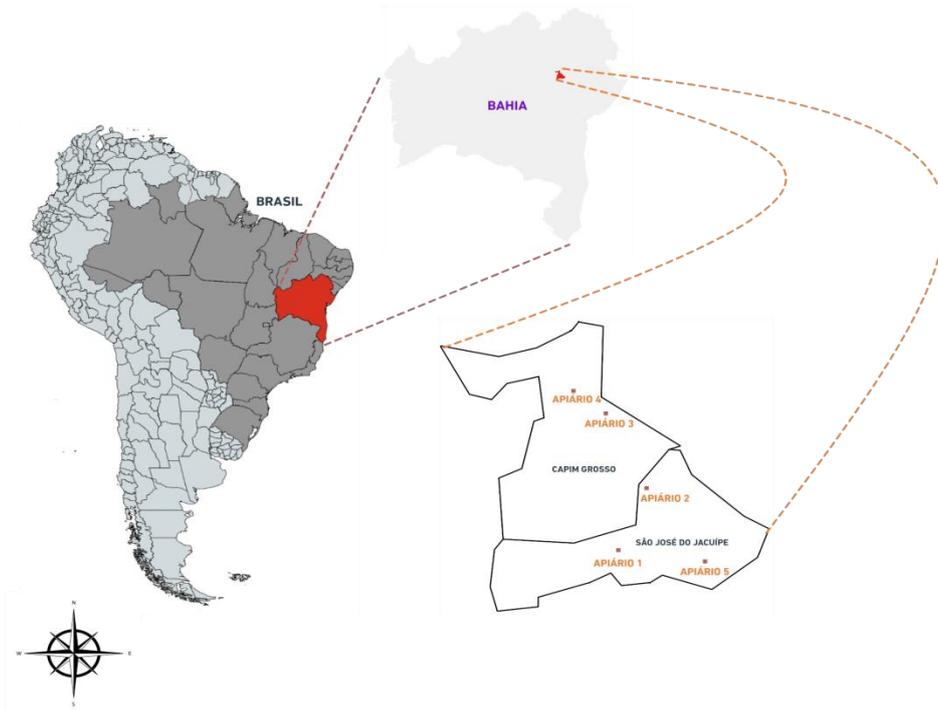


Figura 1: Apiários localizados na região da Bacia do Jacuípe, Bahia, onde foram realizadas as coletas de *Apis mellifera*.

## 2.2 Detecção e nível de infestação do microsporídio *Vairimorpha* spp.

A detecção do microsporídio *Vairimorpha* spp. foi realizada de acordo com o protocolo recomendado pelo Manual de Testes, Diagnósticos e Vacinas para Animais Terrestres (OIE) (2013) [13]. Por apiário foram separadas 150 abelhas mensalmente, das quais foram analisadas em pool de 30 abelhas (Figura 2A), que foram dissecadas individualmente, separando-se a cabeça e tórax do abdômen (Figura 2B). Este último foi macerado em cadinho de porcelana com o auxílio de pistilo (Figura 2C). Após a maceração, foi acrescentado 1 mL de água destilada por abelha, diluindo o macerado, que em seguida foi homogeneizado e separado a parte grosseira da líquida (Figuras 2D e 2E). Após, foi retirado 10  $\mu$ L da mistura e colocado em Câmara de Neubauer coberto por lamínula, deixando descansar por dois minutos (Figuras 2F e 2G). Para a contagem dos esporos foi utilizado um microscópio óptico na objetiva de 40x (Figura 2H).

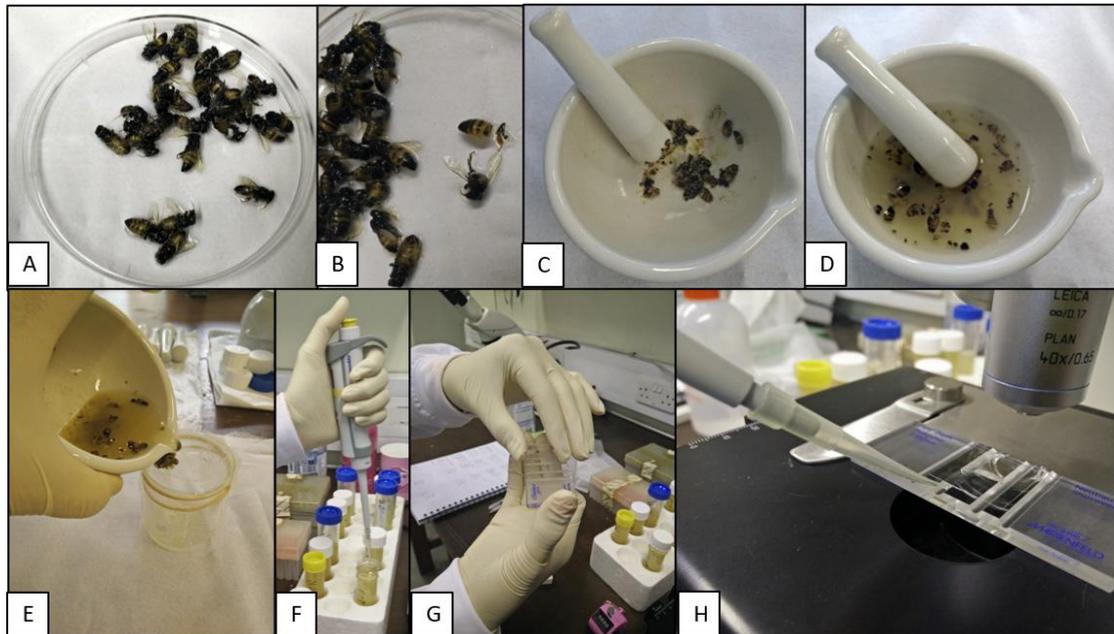


Figura 2: Procedimento para detecção e contagem de esporos de *Vairimorpha* spp.: (A) separação do pool de 30 abelhas, (B) remoção dos abdomens, (C) maceração dos abdomens, (D) acréscimo de 1 mL de água destilada por abelha, (E) remoção do macerado, (F) retirada de 10  $\mu$ L do macerado para leitura, (G) câmara de Neubauer, (H) leitura em Câmara de Neubauer com objetiva de 40x.

A contagem na câmara de Neubauer foi realizada de acordo com o protocolo recomendado pelo Manual de Testes, Diagnósticos e Vacinas para Animais Terrestres (OIE) (2013) [13], em cinco áreas (Figura 3), com objetivo de evitar a recontagem dos mesmos esporos. Por amostra, a contagem foi feita em triplicatas. Nos casos em que possam ser encontrados mais de 50 esporos por área quadrada, é realizada a diluição da amostra com água destilada. O resultado obtido foi submetido à equação:

$$Z = \frac{\alpha}{\beta} * \delta * 250.000 = \text{número de esporos por mL.}$$

Onde:

Z = Número de esporos por abelha;

$\alpha$  = Número de esporos contados;

$\beta$  = Número de quadrados contados;

$\delta$  = Fator de diluição (se houver);

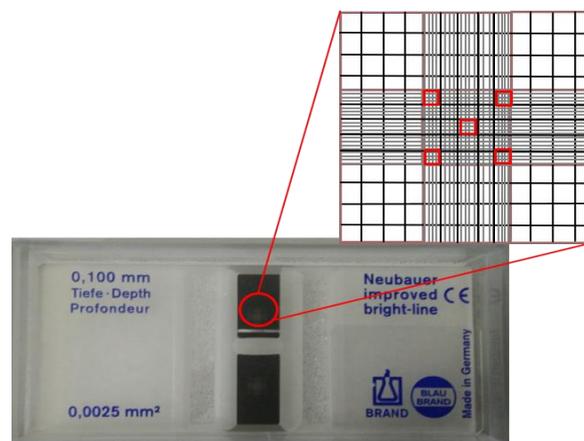


Figura 3: Câmara de Neubauer, com as cinco áreas de contagem em vermelho.

Após o cálculo, o nível de infecção foi determinado utilizando a classificação da intensidade de infecção de nosemose em abelhas conforme tabela Jaycox (Tabela 1) [14].

Tabela 1: Nível de infecção, intensidade da infecção e quantidade de esporos (mL) de *Vairimorpha* spp. em abelhas.

Nível de infecção	Intensidade	Quantidade de esporos (mL)
Nulo	0	Menos de 10.000
Muito leve	1	10.000 – 1.000.000
Leve	2	1.000.001 – 5.000.000
Moderado	3	5.000.001 – 10.000.000
Semi-forte	4	10.000.001 – 20.000.000
Forte	5	Acima de 20.000.000

Fonte: Molina et al. (1990) [14].

Os apiários foram observados mensalmente, para a identificação de sintomas visíveis da doença e morte das colônias ou abandono.

### 2.3 Análise estatística

Os conjuntos de dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. No entanto, devido aos níveis de normalidade e homogeneidade, testes não paramétricos como Kruskal-Wallis foram aplicados em determinados grupos de dados, além da correlação de Spearman para o nível de infestação, precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar e temperatura. Todas as análises foram realizadas no software estatístico *RStudio*® (2015) [15].

### 2.4 Maceração das amostras, extração do DNA e PCR

O processo de maceração para extração do DNA foi realizado utilizando 90 abdomens de abelhas por apiário, nos meses com maior índice de infestação. Os abdomens foram macerados com o auxílio de pistilo e cadinho de porcelana estéreis e nitrogênio líquido, até a formação de uma pasta uniforme. O macerado foi transferido para criotubos de 2 mL e armazenado em ultra-freezer -80°C até o momento da extração do DNA.

A extração do DNA foi realizada utilizando o DNAzol (Invitrogen, Carlsbad, California, US). Uma amostra de 100 mg do macerado foi adicionada a 1000 µL de DNAzol e 10 µL da proteinase K solution (Invitrogen, Carlsbad, California, US). A amostra foi mantida em repouso a 37 °C em incubadora tipo BOD por 18h, para que ocorresse a lise celular. Após, foi adicionado 2,5 µL de RNase (Invitrogen, Carlsbad, California, US) para redução de contaminação por RNA. Foram feitas quatro lavagens prévias com clorofórmio para a precipitação do DNA. Posteriormente, o DNA foi eluído com 50 µL de água ultrapura, com repouso por 12 horas a 37 °C em BOD. Após extração, foi feita a quantificação e avaliação da qualidade do DNA utilizando Biophotometer®30D (Eppendorf), com valores de absorbância  $A_{260/280\text{ nm}}$  variando entre 1,6 a 1,9 e posteriormente foi realizada a diluição do DNA para a concentração de 100 ng/µL.

As análises de PCR foram realizadas utilizando o kit PCR Supermix Brasil (Invitrogen®), conforme protocolo do fabricante, utilizando primers específicos para cada microrganismo estudado (Tabela 2), sendo a reação realizada em termociclador modelo Veriti 96-Well ThermalCycler, 0,2mL, AppliedBiosystems®. O ciclo de temperatura utilizado no termociclador foi de 94°C por 2 minutos no processo de desnaturação inicial (1x), 94°C por 30 segundos na desnaturação (35x), 61°C por 30 segundos no anelamento (35x) e 72°C por 30 segundos no processo de extensão (35x).

Tabela 2: Lista de primers específicos utilizados para a detecção e identificação de *Vairimorpha* spp. em *Apis mellifera*.

Primer	Sequência	PB	Espec.	Ref.
218MITOC-F	5'-CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA-3'	218-219	<i>V. ceranae</i>	9
218MITOC-R	5'-CCC GGTCATTCTCAAACA AAAAACCG-3'			
321APIS-F	5'-GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA-3'	321	<i>V. apis</i>	9
321APIS-R	5'-GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACA AACTATG-3'			

Primer: iniciadores; PB: pares de base; Espec.: especificidade do primer; Ref.: referência do primer.

Após a realização da PCR, foi feita eletroforese em gel de agarose a 2%. O resultado foi visualizado em transiluminador UV para gel (LTB HE) e fotodocumentador para gel de eletroforese – L-PIX da marca Locus®.

## 2.5 Sequenciamento

Os resultados positivos foram confirmados pelo sequenciamento do DNA. Foi realizado o sequenciamento Sanger (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA) pela empresa ACTgene Análises Moleculares Ltda. Após as amostras serem sequenciadas, os eletroferogramas foram lidos com auxílio do software Chromas 2.6.6 (Technelysium, South Brisbane, QLD, AU). A similaridade da sequência de DNA foi realizada com auxílio da ferramenta básica de busca de alinhamento local (BLAST) do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) [16].

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi constatada a presença de esporos de *V. ceranae* em todos os apiários (n = 5) (Figura 4) e meses analisados (Figura 5). O nível de infecção variou de nulo a semi-forte, segundo tabela de Jaycox. Durante a primavera foi observado uma maior quantidade de esporos, se comparado com outras estações do ano, com médias de 63% na primavera e 6% no verão. Apesar da quantidade de esporos não ser considerada uma infecção forte, estes podem ser encontrados durante todo o ano, em condições ambientais favoráveis, como na primavera as abelhas têm maior contato externo, pois é o período que tem mais flores para visitar e esses esporos tendem a multiplicar-se rapidamente entre as colônias. A infecção por *V. ceranae* é altamente e causa diminuição na produtividade da colônia e na taxa de sobrevivência das abelhas [17].

A diferença da quantidade de esporos de *Vairimorpha* spp. entre os meses estudados para cada apiário, é altamente significativa ( $P = 8.107e-09$ ) pelo teste Kruskal-Wallis, para todos os apiários estudados. Diante disso, comparou-se as médias dos apiários comparadas par a par pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), sendo encontrada uma discrepância significativa entre os apiários 4 e 1 ( $p = 1.0528e-03$ ), 5 e 1 ( $p = 9.5258e-03$ ), 4 e 2 ( $p = 2.1470e-03$ ) e 5 e 2 ( $p = 1.73637e-02$ ). Não foi observado sintomas da doença, redução de produtividade das colônias, diminuição da expectativa de vida das campeiras ou mesmo a morte da colônia nos apiários estudados. Contudo, é necessário atenção, uma vez que no início da infecção por *Vairimorpha* spp. os sinais podem não ser evidentes, mas podem causar colapso súbito da colônia [18].

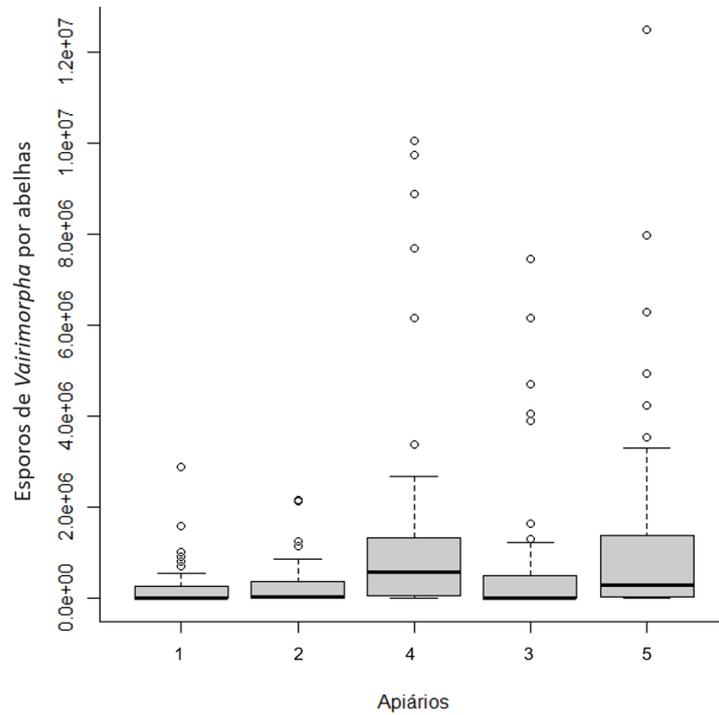


Figura 4: Mediana do número de esporos de *Vairimorpha* spp. em *Apis mellifera* em cada apiário analisado na Bacia do Jacuípe, Bahia.

A média de infecção por mês variou de 69.333 (dezembro) a 4.346.667 (outubro) esporos/abelha. Para três dos cinco apiários analisados, o mês de maior infecção foi outubro (Figura 5), mês de maior florada, em que as abelhas têm maior contato com outras colônias. De acordo com Higes et al. (2008) [18], pode ocorrer a contaminação quando se tem uma colônia saudável próximo a uma infectada.

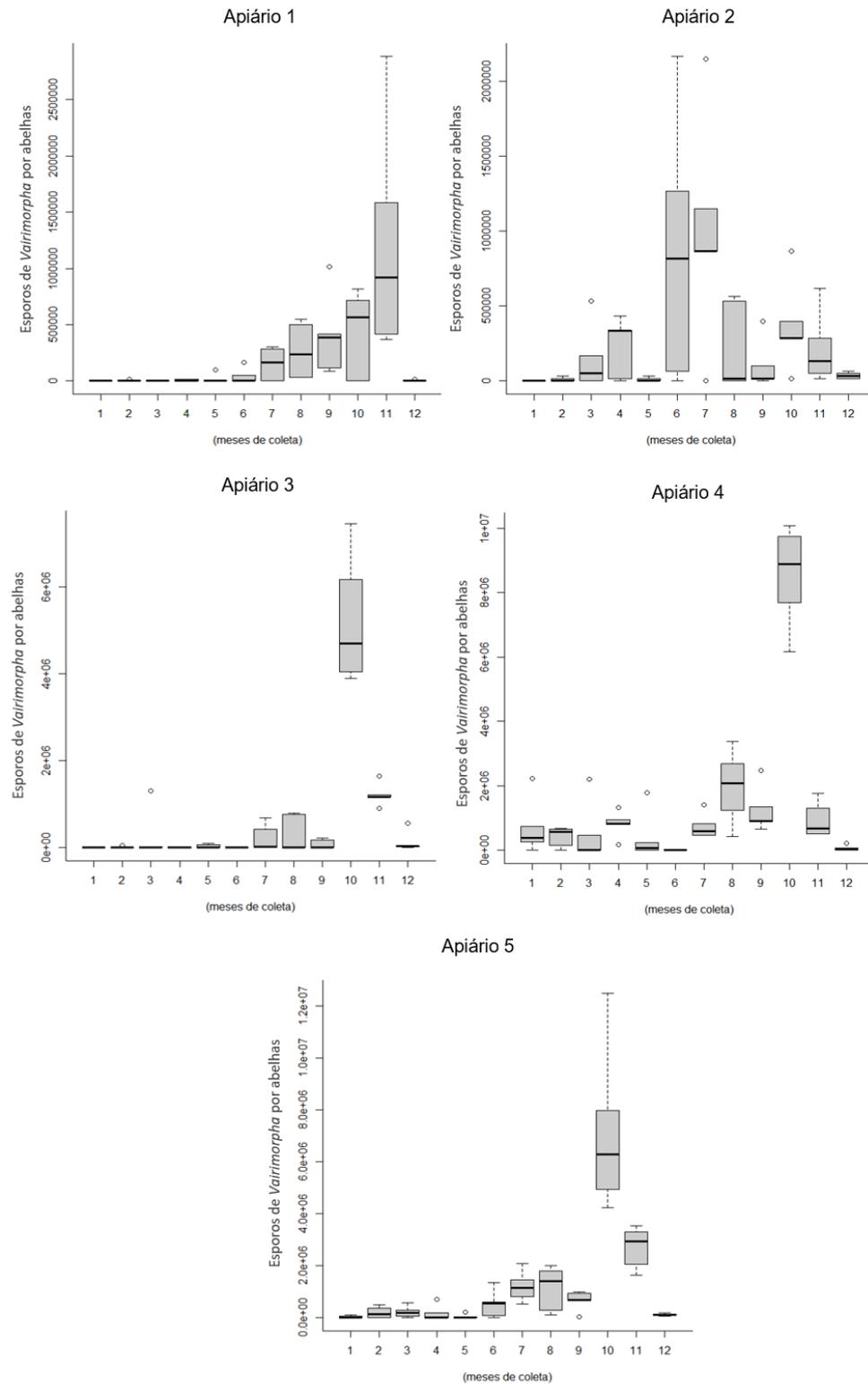


Figura 5: Variação da quantidade de esporos de *Vairimorpha* spp. em *Apis mellifera* para cada apiário dentro do período de um ano na região Bacia do Jacuípe, Bahia.

Fatores ambientais como a precipitação pluviométrica, umidade relativa do ar e temperatura podem influenciar no desenvolvimento de doenças ou diminuir a resistência das abelhas [19]. Com base nisso, foram avaliadas as correlações entre esses parâmetros e o nível de infecção por *Vairimorpha* spp.

Na figura 6 é possível observar que durante o mês de novembro, houve uma significativa precipitação pluviométrica e um percentual de umidade relativa do ar consideravelmente elevado. No entanto, essas condições não se traduziram em níveis mais altos de infecção nas colmeias. Esse achado é coerente com os resultados apresentados no estudo de Calderón-Fallas e Moreno-Morales (2022) [20], que também identificou taxas de infecção menos elevadas em períodos com aumento de precipitação e umidade.

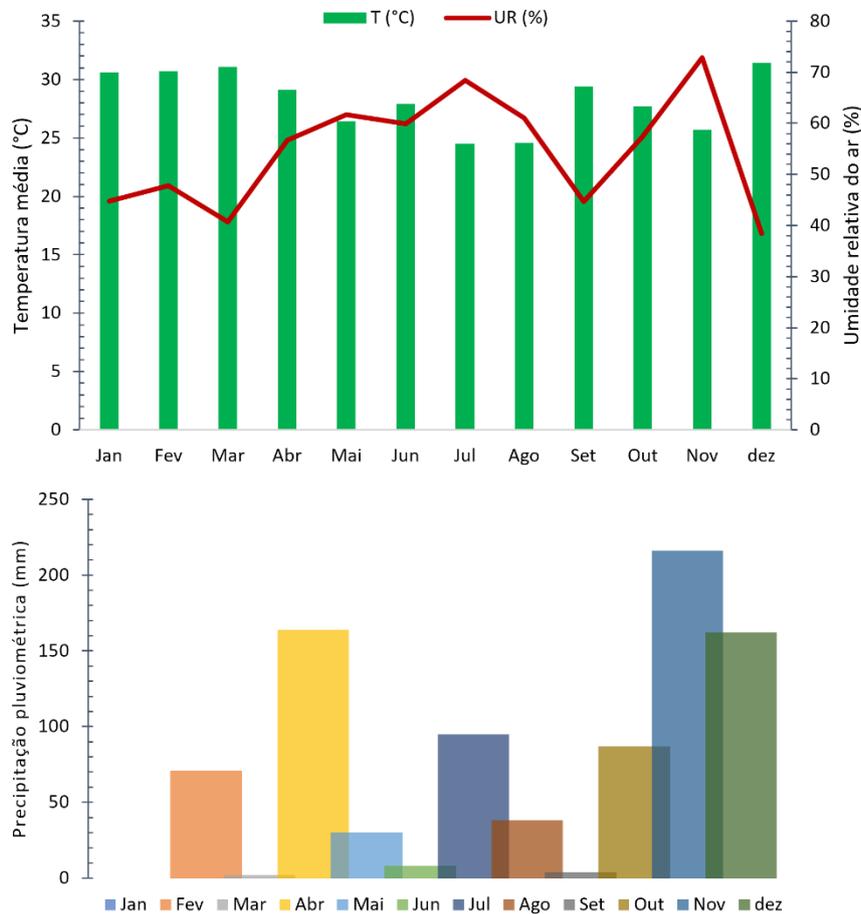


Figura 6: Dados de temperatura média (°C), precipitação pluviométrica (mm) e umidade relativa do ar (%) para o período de um ano (2021) na região Bacia do Jacuípe, Bahia. Fonte: INMET, 2021 [21].

A partir da correlação de Spearman dos níveis de infecção com a precipitação pluviométrica para cada apiário, foi possível observar que o nível de infecção do apiário 1 ( $r = 0,27$ ;  $P < 0,035$ ), 2 ( $r = 0,35$ ;  $P < 0,012$ ), 3 ( $r = 0,38$ ;  $P < 0,002$ ) e 5 ( $r = 0,35$ ;  $P < 0,005$ ), correlacionou-se positivamente com a precipitação pluviométrica. Não houve correlação para o apiário 4 ( $r = 0,19$ ;  $P < 0,15$ ). A precipitação é um parâmetro importante, pois quando chuvas persistentes ocorrem ao longo do dia, as abelhas tendem a reduzir suas saídas das colônias, optando por permanecer em seu interior. Essa aglomeração, por sua vez, pode levar a um ambiente mais estressante, aumentando a probabilidade de comportamentos atípicos, como a defecação dentro da colônia [22]. Esse comportamento, que não é comum em situações de clima seco, pode representar um desafio adicional para a higiene e a saúde da colônia, bem como para a disseminação de patógenos entre as abelhas.

Houve uma correlação negativa significativa ( $P < 0,05$ ) entre a temperatura e o nível de infecção para todos os apiários, com valores para o 1 ( $r = -0,5$ ;  $P < 5.8e-05$ ), 2 ( $r = -0,3$ ;  $P < 0,019$ ), 3 ( $r = -0,26$ ;  $P < 0,048$ ) 4 ( $r = -0,35$ ;  $P < 0,0057$ ) e 5 ( $r = -0,48$ ;  $P < 0,00011$ ). Conforme a temperatura aumenta, o nível de infecção diminui, sendo que para quatro dos apiários estudados

obteve-se uma correlação negativa altamente significativa ( $P < 0,01$ ). O nível de infecção é mais elevado em temperaturas mais baixas, pois as abelhas permanecem mais tempo dentro da colônia, sendo obrigadas a defecar no interior da colônia, resultando em fonte de inóculo [23]. Esses resultados cooperam com os resultados de Chen et al. (2012) [24] que encontraram níveis de infecção maiores em períodos em que a temperatura foi menor. No estudo desenvolvido foram encontrados níveis de infecção maiores na estação da primavera e com temperaturas mais baixas, então ambos fatores podem ter contribuído para elevar o nível de infecção dentro da colônia.

Ao analisar a relação entre a umidade relativa do ar e os níveis de infecção nos apiários sob investigação, podemos inferir que os apiários 2 ( $r = 0,25$ ;  $P < 0,05$ ), 3 ( $r = 0,24$ ;  $P < 0,07$ ) e 4 ( $r = 0,19$ ;  $P < 0,15$ ) não demonstraram correlações estatisticamente significativas com os indicadores avaliados. Já o apiário 1 ( $r = 0,4$ ;  $P < 0,0015$ ) e 5 ( $r = 0,39$ ;  $P < 0,002$ ) apresentam uma correlação positiva moderada ( $P < 0,01$ ). Esse achado salienta a relevância da umidade como um potencial catalisador das infecções nas colônias de abelhas nesses locais específicos. Visto que, a umidade dentro da colônia pode influenciar diretamente na disseminação de patógenos e, conseqüentemente, afetar a sobrevivência e o desenvolvimento das colônias [25]. Portanto, compreender como a umidade do ar se relaciona com as infecções nas colmeias é essencial para implementar medidas de manejo adequadas e garantir colônias saudáveis e prósperas, especialmente nos apiários onde essa correlação se manifesta de maneira mais evidente.

Calderón e Ramírez (2010) [26] destacaram em sua pesquisa que apiários situados em ambientes úmidos e sombreados têm uma tendência a exibir níveis de infecção mais significativos quando comparados àqueles estabelecidos em regiões onde prevalecem condições secas e ensolaradas. Isso ressalta a influência crítica do ambiente local nas taxas de infecção nas colônias de abelhas, sugerindo que as condições climáticas desempenham um papel fundamental na suscetibilidade das colmeias a patógenos.

Todas as amostras analisadas por meio da PCR, apresentaram resultados positivos para a espécie *V. ceranae*, ou seja, não houve registros de *V. apis*. Embora não existam estudos anteriores sobre a detecção dessas espécies na Região Bacia do Jacuípe, Bahia, estudos demonstram que existe a possibilidade de sobreposição da espécie *V. ceranae* com *V. apis*, pois essa espécie está amplamente distribuída no Brasil [27, 28]. No estudo conduzido por Lage et al. (2022) [29], na Bahia, foi identificado o patógeno *V. ceranae*, além disso, a pesquisa abordou a avaliação da presença de *V. apis*, contudo, não houve detecção dessa espécie, o que respalda os achados do nosso estudo atual. Vale destacar que essa ausência de *V. apis* é relevante para entender a dinâmica dos patógenos em populações de abelhas na região.

#### 4. CONCLUSÃO

*Vairimorpha ceranae* está distribuída em todos os apiários estudados da Região Bacia do Jacuípe, Bahia. Embora os níveis de infecção variem de nulo a semi-forte, é necessária atenção por parte dos apicultores, uma vez que, em condições favoráveis, o microsporídio pode rapidamente se multiplicar e causar sérios danos às colônias na região.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processos 406973/2021-0 e 305950/2021-5), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão da bolsa de mestrado número BOL0624/2021.

#### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Garibaldi LA, Carvalheiro LG, Vaissière BE, Gemmill-Herren B, Hipólito J, Freitas BM, et al. Mutually beneficial pollinator diversity and crop yield outcomes in small and large farms. Science. 2016 Jan;351(6271):388-91. doi: 10.1126/science.aac7287

2. Khalifa SAM, Elshafiey EH, Shetaia AA, El-Wahed AAA, Algethami AF, Musharraf SG, et al. Overview of bee pollination and its economic value for crop production. *Insects*. 2021 Jul;12(8):688. doi: 10.3390/insects12080688
3. Pedroso LG, Feitosa CO. Contrastes da produção de mel de abelhas na região Sul e Nordeste do Brasil: possibilidade de expansão da atividade no Nordeste. In: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural - Sober Nordeste. Paraíba (PB): UFPI; 2013. p. 20.
4. Teixeira LV, Veríssimo SADO. Mel e derivados: a inspeção dos produtos apícolas é responsabilidade do médico veterinário. *Cad Téc Vet Zoot*. 2015 Set;(77):115-29.
5. Ollerton J, Winfree R, Tarrant S. How many flowering plants are pollinated by animals?. *Oikos*. 2011 Feb;120(3):321-6. doi:10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x
6. Beringer J, Maciel FL, Tramontina FF. O declínio populacional das abelhas: causas, potenciais soluções e perspectivas futuras. *Rev Eletr Cient UERGS*. 2019;5(1):18-27. doi: 10.21674/2448-0479.51.18-27
7. da Rosa JM, Arioli CJ, Nunes-Silva P, Garcia FRM. Desaparecimento de abelhas polinizadoras nos sistemas naturais e agrícolas: Existe uma explicação? *Rev Ciênc Agrov*. 2019;18(1):154-62. doi: 10.5965/223811711812019154
8. Tokarev YS, Huang WF, Solter LF, Malysh JM, Becnel JJ, Vossbrinck CR. A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics. *J Invertebr Pathol*. 2020 Jan;169:107279. doi: 10.1016/j.jip.2019.107279
9. Fries I, Chauzat MP, Chen YP, Doublet V, Genersch E, Gisder S, et al. Standard methods for *Nosema* research. *J Apicultural Res*. 2013 Abr;52(1):1-28. doi: 10.3896/IBRA.1.52.1.14
10. Paşca C, Mărghitaş LA, Şonea C, Bobiş O, Buzura-Matei IA, Dezmirean, DS. A review of *Nosema ceranae* and *Nosema apis*: Characterization and impact for beekeeping. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Anim Sci Biotechnol*. 2019;76(2):77-87.
11. Higes M, Meana A, Bartolomé C, Botías C, Martín-Hernández R. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environ Microbiol Rep*. 2013 Dez;5(1):17-29. doi: 10.1111/1758-2229.12024
12. Paris L, El Alaoui H, Delbac F, Diogon M. Effects of the gut parasite *Nosema ceranae* on honey bee physiology and behavior. *Curr Opin Insect Sci*. 2018 Abr;26:149-54. doi: 10.1016/j.cois.2018.02.017
13. Stear MJ. OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). 8nd ed. World Organization for Animal Health; 2013. Chapter 3.2.4, Parasitology. Cambridge University Press [Internet]. p. 727-727. doi: 10.1017/S0031182005007699
14. Molina A, Guzmán E, Message D, De Jong D, Pesante D, Mantilla C, Meneses G: Enfermedades y plagas de la abeja melífera occidental. Salvador (BA): Organismo Internacional Regional de Sanidade Agraria; 1990.
15. Greg Wilson, Alison Hill, Mine Çetinkaya-Rundel, Garrett Grolemond, Sarah Lin, Carl Howe.. RStudio: Ambiente de desenvolvimento integrado para R; 2015. Disponível em: <http://www.rstudio.com/>
16. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997;25(17):3389-402.
17. Botías C, Martín-Hernández R, Barrios L, Meana A, Higes M. *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Vet Res*. 2013 Abr;44(1):1-15. doi:v10.1186/1297-9716-44-25
18. Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, Bailón EG, González-Porto AV, Barrios L, et al. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ Microbiol*. 2008 Set;10(10):2659-69. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x
19. de Almeida CT, Lorenzon MCA, de Souza Tassinari W. Identificação de fatores associados à ocorrência de doenças de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) em apiários do estado do Rio de Janeiro. *Braz J Vet Med*. 2013 Jan/Mar;35(1):33-40.
20. Calderón-Fallas RA, Moreno-Morales E. Nivel de infección del microsporidio *Nosema* spp. en colmenas de abejas africanizadas y su relación con la precipitación y humedad relativa. *Agron Costarricense*. 2022 Jan;46(1):65-75. doi: 10.15517/rac.v46i1.49869
21. Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) [Internet]; 2021 [acesso em 05 jan 2022]. Disponível em: <https://portal.inmet.gov.br/>
22. Fries I, Chauzat MP, Chen YP, Doublet V, Genersch E, Gisder S, et al. Standard methods for *Nosema* research. *J Apic Res*. 2013 Abr;52(1):1-28. doi: 10.3896/IBRA.1.52.1.14
23. Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, García-Palencia P, Meana A, et al. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ Microbiol Rep*. 2009 Mar;1(2):110-3. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00014.x

24. Chen YW, Chung WP, Wang CH, Solter LF, Huang WF. *Nosema ceranae* infection intensity highly correlates with temperature. *J Invertebr Pathol.* 2012 Nov;111(3):264-7. doi: 10.1016/j.jip.2012.08.014
25. Doull KM. The effects of different humidities on the hatching of the eggs of honeybees. *Apidologie.* 1976;7(1):61-6.
26. Calderón RA, Ramírez F. *Enfermedades de las abejas melíferas, con énfasis en abejas africanizadas.* Heredia (CR): Editorial Universidad Nacional de Costa Rica; 2010.
27. Teixeira EW, dos Santos LG, Sattler A, Message D, Alves MLTMF, Martins MF, et al. *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. *J Invertebr Pathol.* 2013 Nov;114(3):250-4. doi: 10.1016/j.jip.2013.09.002
28. Özgör E, Güzerin E, Keskin N. Determination and comparison of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in terms of geographic and climatic factors. *Hacettepe J Biol Chem.* 2015 Mar;43(1):9-15.
29. Lage VMGB, Santana CD, Patrocínio E, Noronha RP, Melo RLD, Barbosa CDJ, et al. Prevalence of *Nosema ceranae* in apiculture regions of Bahia State, Brazil. *Ciência Rural.* 2022 Nov;52(9):e20210473. doi: 10.1590/0103-8478cr20210473.