



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

Renata **Martins**<sup>1</sup>; Lubiane Guimarães dos **Santos**<sup>2</sup>; Maria Luisa Teles M. F. **Alves**<sup>3</sup>; Dejair  
Message<sup>4</sup>; Érica Weinstein **Teixeira**<sup>5</sup>

**Nº 14301**

**RESUMO** - A nosemose é uma importante doença que afeta abelhas em todos os continentes, cujo agente etiológico, em *Apis mellifera*, é o fungo unicelular, *Nosema apis* e/ou *Nosema ceranae*. Nas últimas décadas, a busca pela elucidação das causas envolvidas com o declínio de populações de abelhas, tem sido intensificada e muitos patógenos têm sido apontados como possíveis responsáveis. O presente trabalho teve como objetivos determinar a intensidade de infecção natural do microsporídio *Nosema* spp. ao longo de um ano, em condições tropicais, avaliando ainda se há influência de condições climáticas (temperatura, precipitação e umidade do ar) e de local de instalação das colmeias (ambiente coberto ou descoberto) na intensidade de infecção. Semanalmente, por 43 semanas, foram coletadas amostras de abelhas campeiras de 20 colônias, das quais dez estavam localizadas ao ar livre e dez localizadas sobre marquise de alvenaria, com cobertura de telhas de barro. Os níveis de infecção foram quantificados através da contagem de esporos do microsporídio, em Câmara de Neubauer, por meio de microscopia de luz. Técnica molecular (PCR duplex) foi utilizada para confirmar a espécie de *Nosema* presente. O número de esporos por abelha foi, em média,  $6,64 \pm 6,40 \times 10^5$  e  $10,97 \pm 11,39 \times 10^5$ , em colmeias localizadas ao ar livre e em ambiente coberto, respectivamente. As características de local de instalação das colmeias, temperatura máxima e umidade do ar influenciaram ( $p < 0,01$ ) a intensidade de infecção do microsporidio *N. ceranae* (única espécie presente na localidade estudada) em abelhas africanizadas.

**Palavras-chaves:** *A. mellifera*, *Nosema ceranae*, *Nosema apis*, Patologia, microsporídio.

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

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

3 Colaborador, 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-** Nosemosis is an important disease that affects bees on all continents. The etiological agents in *Apis mellifera* are unicellular fungi of the species *Nosema apis* and/or *Nosema ceranae*. Because of the phenomenon called colony collapse disorder (CCD) prevalent in recent years, the search has intensified to elucidate the causes of the decline of bee populations, and many pathogens have been indicated as possible culprits. 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 to assess the possible influence of climate conditions (temperature, rainfall and relative humidity). We also evaluated whether there is an influence of the place where hives are kept (open air or a covered area) on the intensity of infection. For these purposes, samples of forager bees were collected from 20 colonies, 10 located under a roof and the other without any cover, at seven-day intervals during 43 weeks. The infection levels were quantified by counting the spores of the microsporidium in a Neubauer Chamber under a light microscope. The species identification as *Nosema* was confirmed by PCR. The bees collected presented averages of  $6.64 \pm 6.40 \times 10^5$  and  $10.97 \pm 11.39 \times 10^5$  spores/bee in the hives located in the uncovered and covered areas, respectively. The place, maximum temperature and humidity also had a significant influence ( $p < 0.01$ ) of the infection intensity of the microsporidium *N. ceranae* (only species present in the studied locality) in Africanized honey bees.

*Key-words:* *A. mellifera*, *Nosema ceranae*, *Nosema apis*, Pathology, microsporidium.

## 1. INTRODUÇÃO

A noselose é uma importante doença que afeta abelhas melíferas, causada por fungo unicelular do gênero *Nosema*. Duas espécies de microsporídio têm sido descritas como responsáveis pela infecção em abelhas *Apis mellifera*, *N. apis* e *N. ceranae*. A infecção é ocasionada através da ingestão de esporos pelas abelhas, os quais se alojam no trato digestivo, germinam nas células epiteliais e são liberados junto com as fezes, quando o ciclo se repete (Somerville e Hornitzky, 2007). A morfologia dos esporos destas duas espécies de *Nosema* é muito semelhante, quando vistos em microscopia de luz, sendo necessária análise molecular de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para diferenciação da espécie (Fries, 2010). A infecção causa distúrbios no sistema digestivo das abelhas (via de regra sem sinais clínicos), provocando redução na vida útil das abelhas, com impacto negativo sobre a colônia, afetando assim a rentabilidade da atividade e prejuízos à polinização efetuada pelas abelhas (Higes et al, 2008).



## 8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

Acreditava-se que *N. Apis* e era a única espécie a parasitar as abelhas *Apis mellifera*, no entanto, *N. ceranae*, foi detectada em abelhas *Apis cerana*, presente no continente asiático e também em abelhas melíferas europeias (Higes *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007) . A sua presença atualmente já foi detectada em quatro continentes (Klee *et al.*, 2007; Martín-Hernández *et al.*, 2007). No Brasil, esta espécie foi primeiramente relatada por Klee *et al.* (2007), porém, está presente em território nacional desde a década de 1970 (Teixeira *et al.*, 2013).

Investigações em clima temperado têm demonstrado que *N. ceranae* parece ter substituído, gradualmente, *N. apis* (Martín-Hernández *et al.*, 2011), sugerindo que é um parasita virulento, estando frequentemente associado a fenômenos de colapso da colônias (Higes *et al.*, 2007, 2013). Higes (2013) e Martín-Hernández (2009) sugeriram que a espécie *N. ceranae* pode estar mais adaptada a climas mais quentes e para Fries (2010) o clima pode ser um fator importante para explicar as diferenças de distribuição de espécies e de seus impactos.

Abelhas africanizadas são, reconhecidamente, mais resistentes a diversas patologias apícolas (Rosenkranz, 1999; Vandame *et al.*, 2002), a despeito da presença de diversos patógenos em território nacional. Todavia, nos últimos anos, tem-se observado elevada mortalidade de abelhas adultas e crias, com considerável queda de produção em diversas localidades da região sudeste do Brasil (Teixeira *et al.*, 2010). Nenhum patógeno foi ainda apontado, individualmente, como diretamente responsável pelo declínio de populações de abelhas, embora *N. ceranae* seja altamente prevalente em apiários do território nacional (acima de 85%) (Teixeira *et al.*, 2013). Em países tropicais, incluindo o Brasil, não há registro de nenhum estudo epidemiológico amplo da doença, após a confirmação da presença de *N. ceranae* parasitando abelhas africanizadas.

Dado que as diferenças climáticas regionais podem ser importantes para o impacto da noseose, este projeto 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 descoberta, além de avaliar se condições climáticas (temperatura, precipitação e umidade do ar) influenciam tais níveis de infecção.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Semanalmente, ao longo de doze meses, foram coletadas amostras de abelhas campeiras de 20 colônias que compõem os apiários da Área de Pesquisa em Apicultura PRDTA-VP, totalizando 860 amostras. Dentre essas 20 colônias, dez estavam localizadas ao ar livre, sobre cavaletes a 50 cm do solo e dez, em cavalete de mesmo tipo, porém sobre marquise de alvenaria



**8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2014**  
**12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo**

de (3,20 m de altura), coberta com telhas de barro. As coletas e as contagens de esporos de *Nosema* foram efetuadas de acordo com Teixeira e Message (2010) e Cantwell (1970), respectivamente. Todas as análises foram efetuadas no Laboratório de Sanidade Apícola do PRDTA-VP. Para confirmação da espécie de *Nosema* presente, foram preparadas amostras compostas, contendo abelhas de todas as colmeias, pertencentes a cada coleta semanal. O preparo das amostras para extração de DNA foi feito conforme Teixeira et al. (2013). Após a contagem do número de esporos, a suspensão aquosa obtida com as abelhas maceradas em água 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. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado submetido à extração de DNA utilizando-se o QiagenDNeasy® Plant Mini Kit, conforme indicações do fabricante. As amostras de DNA assim obtidas foram submetidas à reação de PCR duplex, onde as reações, com volume final de 20 µl foram conduzidas utilizando-se os primers descritos por Martín-Hernández et al (2007). As sequências dos primers utilizados para amplificar o fragmento de 218 pb referente ao gene ribossomal 16S de *N. ceranae* foram: F5'CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTA3'; R5'CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG3'. Já, as sequências dos primers utilizados para amplificar o fragmento de 321 bp referente ao gene ribossomal 16S de *N. apis* foram: F5'GGGGGCATGTCTTTGACGTACTATGTA3'; R5'GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACA ACTATG3'. O programa utilizado para PCR foi composto inicialmente de uma etapa de desnaturação a 94 °C por 2 min, em seguida, 35 ciclos de 94 °C por 30 seg., 58 °C por 30 seg. e 72 °C por 1 min., além de uma extensão final a 72 °C por 5 min.. Após o término da reação de PCR, 5µL da reação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% (m/v) corado com SYBR SAFE® em tampão TBE 1X (89mM Tris base, 89Mm ácido bórico e 2 Mm EDTA). Após a eletroforese, o gel foi visualizado em fotodocumentador E-Gel Imager (Life Technologies®). Foi utilizado marcador de 100pb (Invitrogen®) como referência para determinação do tamanho dos fragmentos de interesse. Como controle positivo utilizou-se DNA de abelha infectada com os dois patógenos (*N. apis* e *N. ceranae*), cedido pelo Bee Research Laboratory/USDA. Para o controle negativo utilizou-se água Ambion®, livre de DNase.

Dados meteorológicos de temperatura, umidade do ar e precipitação foram obtidos na estação meteorológica do PRDTA-VP.

A análise de variância foi feita considerando-se modelo estatístico cuja representação é dada por:

$$y_{ijklm} = \mu + L_i + b_1(T_{ijklm} - \bar{T}) + b_2(P_{ijklm} - \bar{P}) + b_3(U_{ijklm} - \bar{U}) + e_{ijklm}$$
, em que:  $y_{ijklm}$  = valor observado para o log do número de esporos;  $\mu$  = intercepto;  $L_i$  = efeito do <sup>iésimo</sup> local de instalação;



$T_{ijklm}$  = temperatura;  $\bar{T}$  = média de temperatura;  $P_{ijklm}$  = pluviosidade;  $\bar{P}$  = média de pluviosidade;  $U_{ijklm}$  = umidade;  $\bar{U}$  = média de umidade;  $b_1$  = coeficiente de regressão linear para a covariável temperatura;  $b_2$  = coeficiente de regressão linear para a covariável pluviosidade;  $b_3$  = coeficiente de regressão linear para a covariável umidade;  $e_{ijklm}$  = erro aleatório associado à cada observação. Os graus de liberdade para as fontes de variação estudadas assumidas como classificatórias foram decompostos em contrastes e avaliados através do teste de F ao nível de significância de 1%. Foi procedida ainda a análise de correlação entre as variáveis, para indicação de variações conjuntas. Todas as análises foram feitas utilizando-se o procedimento GLM do pacote estatístico do SAS (2001). As contagens de esporos foram transformadas para logaritmo, com vistas à obtenção da normalidade dos resíduos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras analisadas apresentaram resultados positivos para a espécie *Nosema ceranae*, não tendo sido detectada a espécie *Nosema apis*.

Colmeias localizadas ao ar livre apresentaram menor número de esporos ( $p < 0,01$ ) em relação àquelas localizadas em ambiente coberto (em média  $6,64 \pm 6,40 \times 10^5$  esporos por abelha e  $10,97 \pm 11,39 \times 10^5$  esporos por abelha, respectivamente). A temperatura média do período abrangido pelas coletas foi de  $23,16 \pm 2,88$  °C, já a média da temperatura máxima foi de  $29,31 \pm 3,36$  °C e a média da temperatura mínima de  $17,00 \pm 2,88$  °C. Os efeitos de temperatura máxima e de umidade do ar foram significativos ( $p < 0,01$ ), revelando influência desses fatores sobre o número de esporos por abelha. A umidade do ar foi o parâmetro meteorológico que apresentou maior correlação (27%) com a intensidade de infecção, variando de 34,71 a 77,17%. Todavia, a precipitação, que variou de 0 a 14 mm, com média de  $3,06 \pm 3,13$  mm no período não apresentou influência significativa em relação à variável dependente estudada.

Pesquisas recentes sugerem que *N. ceranae* é capaz de resistir a climas mais quentes e tem maior prevalência quando as temperaturas aumentam (Higes et al., 2013). No atual estudo, as maiores intensidades de infecção foram constatadas nos períodos onde as temperaturas são mais elevadas. No Brasil, como também relatado por Fries (2010) para a Europa, a infecção por *N. ceranae* parece produzir efeitos diferentes em diferentes regiões geográficas. Santos et al. (2010; 2011) identificaram maior intensidade de infecção pelo microsporídeo no período de outono – inverno no Estado de São Paulo (abril e maio no Vale do Paraíba e maio na região centro-oeste do

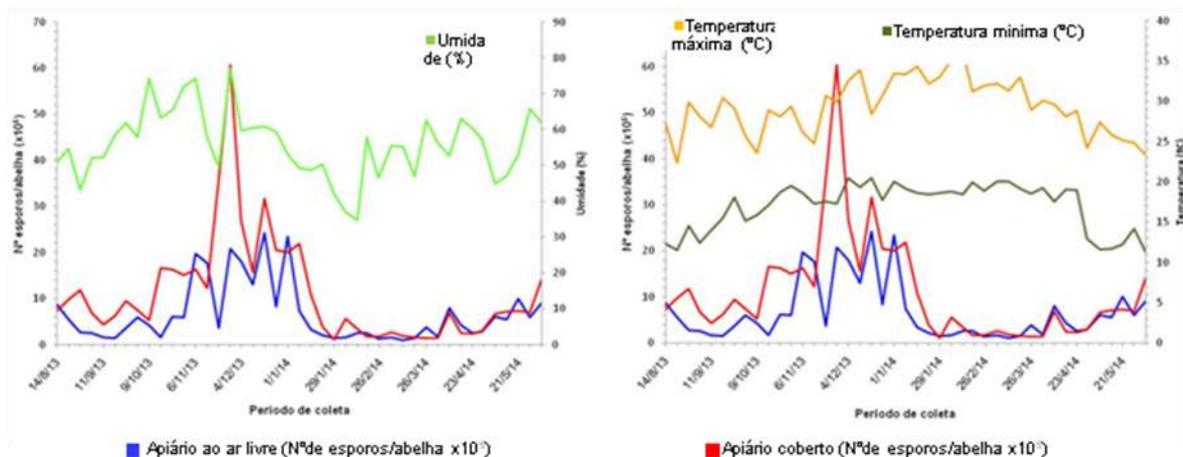


**8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2014**  
**12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo**

Estado). Na região de Altinópolis, SP, a prevalência de *N. ceranae* em 2007 foi de 100% em 1106 colmeias em 20 apiários, com picos de intensidade de infecção distribuídos ao longo do ano (D. Menssage, dados não publicados). Essas localidades têm clima subtropical úmido (Classificação climática de Köppen) com temperatura variando 15-29 °C ao longo do ano. Segundo Le Conte e Navajas (2008), as peculiaridades climáticas das regiões em análise devem ser consideradas, pois podem afetar a intensidade de infecção, mesmo que indiretamente. Chen et al. (2012) relataram correlação negativa significativa da carga de esporos de *N. ceranae* com temperatura e sugeriram que a temperatura média poderia prever a dinâmica de infecção de *N. ceranae*. No atual estudo as temperaturas médias não influenciaram significativamente a intensidade de infecção ( $p < 0,01$ ).

Na Figura 1 observa-se a flutuação da intensidade de infecção natural de *Nosema* em apiários instalados no campo e em área coberta, a temperatura máxima e a umidade do ar, de agosto de 2013 a junho de 2014. O número de esporos de *N. ceranae* nas amostras coletadas em apiários instalados em área coberta foi superior aos valores obtidos nas amostras de colmeias instalados no campo, em praticamente todo o período de coleta. Em novembro é possível observar um aumento do número de esporos em ambos os locais ( $55,56 \times 10^5$  e  $20,88 \times 10^5$  nas abelhas de colmeias cobertas e naquelas de colmeias ao ar livre, respectivamente) e os valores de temperatura máxima e, principalmente de umidade do ar também estão elevados (29,93 °C e 77,17 %, respectivamente). Nos meses de janeiro a junho, observa-se, para temperatura e umidade, dois picos de aumento de esporos, abril e maio (28,09 °C, 63,4 % e 25,16° C e 66%, respectivamente). Com temperatura e a umidade elevadas, o número de esporos aumentou. A equação de regressão linear obtida para tais fatores foi  $\text{Log}(\text{n}^\circ \text{ de esporos}) = -1,462 + 0,033X_1 + 0,04X_2$ , sendo a correlação observada entre número de esporos e umidade de moderada magnitude (27%).

Martín-Hernández et al. (2007), verificaram a ausência de efeito direto da precipitação sobre a prevalência de *N. ceranae*, isto vem a corroborar os dados obtidos neste estudo. A falta de sazonalidade com relação à intensidade de infecção por *N. ceranae* foi detectada ao longo do ano em diferentes latitudes (Martín-Hernández et al., 2007, 2012;). Embora *N. ceranae* seja amplamente presente no Brasil não parece haver padrão na intensidade da infecção deste microsporídio ao longo do ano em território nacional (Teixeira et al., 2013). Os resultados aqui obtidos, corroboram com afirmações de Martín-Hernández et al. (2009) de que a elevação da temperatura tende a aumentar o potencial biótico (capacidade reprodutiva máxima em condições ideais) apresentado pelo patógeno, favorecendo o crescimento populacional e aumentando assim as possibilidades de propagação dessa espécie.



**Figura 1.** Flutuação da intensidade de infecção natural de *N. ceranae* (número médio de esporos/abelha x10<sup>5</sup>) em colmeias localizadas no campo e em área coberta, temperatura máxima (°C) e umidade do ar (%), de agosto de 2013 a junho de 2014.

#### 4. CONCLUSÃO

As características do local de instalação das colmeias (coberto ou descoberto), temperatura máxima e umidade do ar influenciam a intensidade de infecção de *N. ceranae* em abelhas *A. mellifera* africanizadas, em clima tropical.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa concedida, a APTA- Regional do Vale do Paraíba. Aos funcionários Ronaldo e Carmen pelo auxílio. Ao Marcos V. G. B. da Silva (Embrapa), pelas análises estatísticas.

#### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CANTWELL, G. R. Standard methods for counting *Nosema* spores. **Am. Bee J**, v. 110, p. 222-223, 1970.
- CHEN, Y. W., CHUNG, W. P., WANG, C.H., SOLTER LF., HUANG, W. F. *Nosema ceranae* infection intensity highly correlates with temperature. **J. Invertebr. Pathol.** v.111, p. 264-267, 2012.
- FRIES, I. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). **J. Invertebr. Pathol.** v. 103 p. 573-579, 2010.
- HIGES, M., GARCÍA-PALENCIA, P., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., MEANA, A. Experimental infection of *Apis mellifera* with *Nosema ceranae* (Microsporidia). **J. Invertebr. Pathol.** v.94, p. 211-217, 2007.
- 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. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. **Environ. Microbiol.** v.10, p. 2659-2669, 2008.



**8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC2014**  
**12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo**

- HIGES, M., MARTÍN-HERNÁNDEZ R., MEANA, A. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. **J. Invertebr. Pathol.** v.92, p. 93-95, 2006.
- HIGES, M., MEANA, A., BARTOLOMÉ, C., BOTÍAS, C., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. **Environmental microbiology reports**, v.5, n. 1, p. 17-29, 2013.
- HUANG, W. F., JIANG, J. H., CHEN, Y. W., WANG, C. H. A *Nosema ceranae* isolaterom the honeybee *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 38, p. 30-37, 2007.
- 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*. **J. Invertebr.Pathol.** v. 96, p.1-10, 2007.
- LE CONTE, I. & NAVAJAS, M. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. **Rev. Sci. Tech.** v. 27, p. 499-510, 2008.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ R., MEANA, A., PRIETO, L., SALVADOR, A. M., GARRIDO-BAILON, E., HIGES, M. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*, Appl. **Environ.Microbiol.** v.73, p. 6331-6338, 2007.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ R., MEANA, A., GARCIA-PALENCIA, P., MARRIN, P., BOTIAS, C., GARRIDO-BAILÓN, E., BARRIOS, L., HIGES, M. Temperature effect on biotic potencial of honey bee microsporidia. **Appl. Eviron. Microbiol.** v. 75, p. 2554-2557, 2009.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ R., BOTÍAS, C., BAILÓN, E. G., MARTÍNEZ-SALVADOR, A., PRIETO, L., MEANA, A., HIGES, M. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? **Environmental Microbiology**, v.14, n. 8, p. 2127–2138, 2012.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ R., BOTÍAS, C., BARRIOS, L., Martínez-Salvador, A., Meana, A., Mayack, C., Higes, M. Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). **Parasitol Res.**, v. 190 p. 605–612, 2011.
- ROSENKRANZ, P. Honey bee (*Apis mellifera* L.) tolerance to *Varroa jacobsoni* Oud. in South America. **Apidologie**, v. 30, p. 159-172, 1999.
- SANTOS, L.G. TEIXEIRA, E. W. ; ALVES, M. L. T. M. F.; MESSAGE, D. ; SILVA, I. C ; BARRETO, L. M. R. C. Perfil Da Sanidade Apícola no Vale do Paraíba: Apta, gestão de produção com qualidade. In: **4º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica**, 2010, Campinas. <http://www.cnpm.embrapa.br/ciic/4ciic/Artigos/RE10304.pdf>. Acessado em 04 de junho de 2014.
- SANTOS, L. G., ALVES, M. L. T. M. F., MESSAGE, D., TEIXEIRA, E. W. Apicultura migratória: aspectos sanitários. In: **4º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica**, Campinas, 2011. <http://www.cnpm.embrapa.br/5ciic/anais/Artigos/RE11301.pdf>. Acessado em 04 de junho de 2014.
- SAS - Statistical Analysis System SAS User's Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. 2001.
- SOMERVILLE, D., HOMITZKY, M. *Nosema* Disease. **Primefact** 699, 2007. <[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)> Acessado em 04 de junho de 2014.
- 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., SATTTLER, 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. **J InvertebrPathol.**, v. 114, p. 250-254, 2013.
- VANDAME, R., MORAND, S., COLIN, M.E., BELZUNCES, L. P. Parasitism in the social bee *Apis mellifera*: quantifying costs and benefits of behavioral resistance to *Varroa destructor* mites. **Apidologie**, v.33, p. 433–44, 2002.