

Manual Veterinário de Colheita e Envio de Amostras



2010



**Organização
Pan-Americana
da Saúde**

Comitê Regional para as Américas da
Organização Mundial da Saúde

Saúde Pública Veterinária
Centro Pan-Americano de Febre Amarela

ABELHAS

Apis mellifera

Autores

Érica Weinstein Teixeira
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
(APTA, SAA-SP)

Dejair Message
Universidade Federal de Viçosa (UFV)

Material para colheita de amostras para diagnóstico de doenças que afetam *Abelhas Apis mellifera*

Kit EPI – Equipamento de proteção individual



Fumigador

IMPORTANTE
 "Sempre utilizar formão, facas e pinças devidamente desinfetados, entre colmeias e entre apiários" (lavar com água e sabão, realizar esfregação mecânica e depois submergir em álcool 70%)



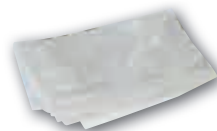
Formão



Faca



Caneta do tipo marcador permanente



Saco plástico



Caixa isotérmica com gelo reciclável



Lápiz e caneta esferográfica



Pinça



Jornal



Luvas de látex



Pincel/ trincha



Tubos tipo "Eppendorf"



Etiquetas



Envelope



Papel



Espuma



Pote plástico universal



Pote plástico universal perfurado



Pote plástico de 500 mL

Garantindo a segurança

Antes de dirigir-se ao apiário, o profissional deverá vestir-se adequadamente com o equipamento de proteção individual (EPI), acender o fumigador e pegar o formão

TRABALHAR EM DUPLA

O trabalho de colheita deverá ser executado sempre em dupla, um indivíduo controlando as abelhas com fumigador e outro colhendo as amostras



O fumigador é imprescindível, pois a fumaça, na quantidade certa, permite controlar a defensividade das abelhas.

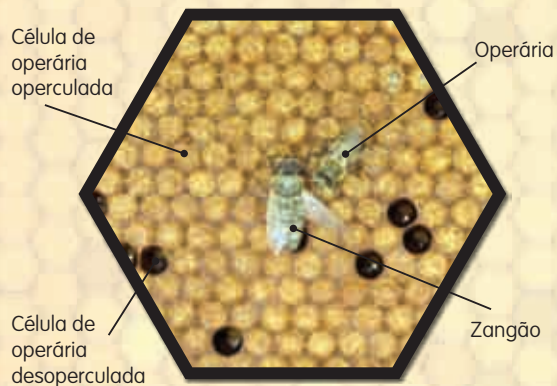


Reconhecendo as partes de uma colmeia



Colmeia Langstroth ou padrão, despovoada, em cavelete de madeira

Identificando os indivíduos da colônia, células de operárias, células de zangão e realeira



Abrindo e inspecionando uma colmeia

1º Passo

Abrindo a colmeia e controlando o comportamento defensivo das abelhas

- ✓ Fazer fumaça no alvado;
- ✓ Levantar a tampa;
- ✓ Fazer fumaça paralela à superfície dos quadros;
- ✓ Fechar a colmeia por 1 minuto;

Manter o fumigador cerca de 15 cm da colmeia



- ✓ Abrir a tampa novamente e fazer fumaça paralela à superfície dos quadros;



Certificar-se de que a rainha não está na tampa



- ✓ Apoiar a tampa no chão com a parte interna para cima, colocando sobre ela a(s) melgueira(s) ou qualquer outro aparato utilizado pelo apicultor (Ex.: Alimentador de topo, coletor de pólen, coletor de própolis, tela excludora etc.).

2º Passo - Inspeccionando a área de cria;

NOTA

Localização mais provável da área de cria.

Ninho



- ✓ Com o auxílio do formão, descolar os quadros do ninho (devido à propolização);
- ✓ retirar um quadro da área de cria.

- ✓ Realizar a inspeção dos quadros da área de cria.
Certificar-se de que a rainha não está presente nesse quadro e, caso esteja, transferi-la cuidadosamente para outro quadro ou permitir que ela o faça espontaneamente.



Para facilitar a visualização das crias, se necessário, chacoalhar o quadro suavemente para dentro da colmeia ou utilizar um pequeno ramo de planta para afastar as abelhas adultas que estão cobrindo a área de cria.

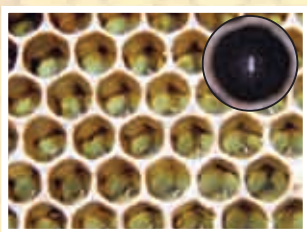
Fases do desenvolvimento das abelhas

Durante seu ciclo de vida, as abelhas passam por quatro diferentes fases: ovo, larva, pupa e inseto adulto

DIFERENTES FASES DO DESENVOLVIMENTO DAS ABELHAS – CRIAS NORMAIS

Ovo

No primeiro dia, encontra-se na posição vertical, no segundo dia inclinada e, no terceiro dia, passa a ficar na posição horizontal



H. Altobelli, PROTA-VP/APTA, SAA, SP

Larva

Fase larval

Pré-pupa



Diferentes sub-estágios do desenvolvimento larval, incluindo pré-pupa

M. Elias-Nêto, FCCB/USP

Diferentes estágios da fase larval. Crias desoperculadas e operculadas



Pupa

Fase de pupa



M. Elias-Nêto, FCCB/USP

Diferentes estágios da fase de pupa (pupa de olho branco, pupa de olho rosa, pupa de olho rosa-escuro e pupa de olho marrom com pigmentação torácica de leve a forte).



Pré-pupa e pupa em diferentes estágios, desoperculadas, para permitir a visualização.

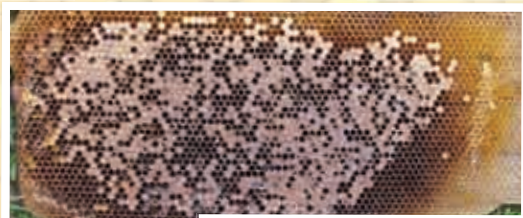
Crias saudáveis normalmente são vigorosas e apresentam-se na fase larval no fundo dos alvéolos, em forma de "C" (desoperculadas). Após 5 a 6 dias, essas larvas são operculadas com cera, mudando constantemente a sua posição até ficarem retas nos alvéolos, com o dorso do corpo na parede lateral do alvéolo (pré-pupa). Nessa fase, ela cessa seus movimentos e passa por modificações, transformando-se em pupa. Desde ovo, passando por todos os estágios de larva, até o estágio inicial de pupa, a cria apresenta-se com coloração branco-pérola em todo o corpo. Ao longo da fase de pupa, ocorrem mudanças gradativas na pigmentação dos olhos e dos segmentos do corpo.

Diferentes anomalias na fase de cria

Para reconhecer os sintomas das doenças é importante estar familiarizado com as características das diferentes fases do desenvolvimento das crias e com a aparência de um favo com crias saudáveis.



Quadro com área de cria normal

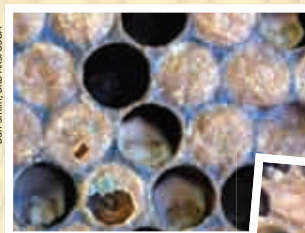


Quadro com área de cria falhada



Exemplos de possíveis alterações na aparência das crias

Barb Smith, BR/ASCUSA



Cria mumificada

Cria com alteração de cor e/ou ressecada



Cria contorcida na parede do alvéolo com alteração de cor e murcha



Cria no fundo da célula com alteração de cor e murcha



Cria com alterações de consistência (aquosa)

Principais doenças, intoxicações
e parasitoses que afetam
CRIAS DE ABELHAS - *Apis mellifera*

**Cria Pútrida Americana
ou Loque Americana**

Agente causador

Bactéria *Paenibacillus larvae*

Fase de desenvolvimento da cria afetada

Pré-pupa e pupa



VERONICA WILLIAMS / BR/AS/US/DA

VERONICA WILLIAMS / BR/AS/US/DA

Cria Pútrida Européia ou Loque Européia

Agente causador

Bactéria *Melissococcus plutonius*

Fase de desenvolvimento da cria afetada

Geralmente larva desoperculada em fase de
alimentação; algumas vezes cria operculada



Cria Giz

Agente causador

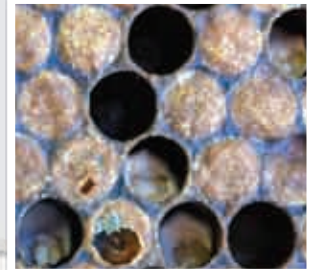
Fungo *Ascosphaera apis*

Fase de desenvolvimento da cria afetada

Crias já operculadas, pré-pupa e pupa
(ficam mumificadas)



BART SMITH / BR/AS/US/DA



BART SMITH / BR/AS/US/DA

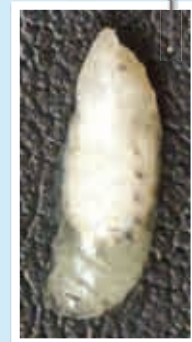
Cria Ensacada

Agente causador

Vírus SBV (*Sac Brood Virus*)

**Fase de desenvolvimento
da cria afetada**

Pré-pupa (não consegue
passar para pupa)



Cria Ensacada Brasileira

Agente causador

Pólen da planta barbatimão (*Stryphnodendron* spp)

Fase de desenvolvimento da cria afetada

Pré-pupa (não consegue passar para pupa)



Crias Anômalas

Agente causador

Causa indeterminada

Fase de desenvolvimento da cria afetada

Pupa



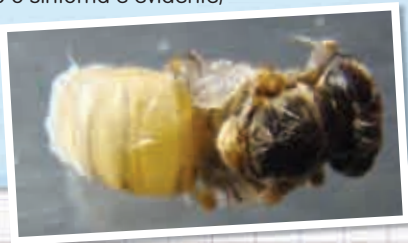
Cria com asa deformada

Agente causador

Vírus DWV (*Deformed Wing Virus*), ou, eventualmente, *Varroa* (por ação física)

Fase de desenvolvimento da cria afetada

Pupa, próximo à emergência ou nascimento (quando o sintoma é evidente)



Varroatose

Agente causador

Ácaro ectoparasita *Varroa destructor* (na fase de reprodução)

Fase de desenvolvimento da cria afetada

Cria já operculada



Amostras para diagnóstico das principais doenças que afetam **CRIAS DE ABELHAS - *Apis mellifera***

Antes de iniciar a colheita de amostra, faça uma observação minuciosa dos favos na área de cria. Nos quadros que apresentarem falhas (conforme apresentado na página 188), procure detectar a presença de crias com alterações na cor (mudança de branco-pérola para marrom claro a escuro); murchas; contorcidas nas paredes dos alvéolos ou mumificadas.

Colheita de crias para análise

Para diagnóstico da doença, colher **4 amostras diferentes**

Amostra 1

1. Onde colher

No ninho

2. O que colher

Favos falhados e com crias anormais, sem mel

3. Como colher

Com a faca, entre os arames do quadro, cortar pedaços de favo em uma região com crias suspeitas



NOTA

Realizar as colheitas de amostras utilizando luva descartável de látex sobre as de borracha e descartá-la, entre uma e outra colmeia, em saco de lixo, fechando-o em seguida.



4. Quantidade

Pedaços de favo contendo **o máximo possível de crias anormais** – 3 a 5 pedaços de favo de aproximadamente 3x3 cm a 3x10 cm, preferencialmente entre os arames do quadro. Pode também ser o favo inteiro

5. Recipiente

Envolver as amostras de favo em papel jornal ou outro tipo de papel não encerado.
Atenção: Nunca envolver em plástico ou papel alumínio, nem colocar em frasco fechado



6. Temperatura da amostra para transporte

Ambiente

7. Tempo crítico para chegada ao laboratório

Até 48 horas

8. Exames

Isolamento/identificação

Análise microscópica e/ou molecular, se o material estiver preservado

Amostra 2

1. Onde colher

No ninho

2. O que colher

Favos contendo crias operculadas (preferencialmente, sem mel e com pupas mais velhas, de olho escuro)

3. Como colher

Com uma faca, cortar um pedaço de favo com crias

4. Quantidade

Pedaço de favo de aproximadamente 3x10 cm (contendo pelo menos 100 crias operculadas)



5. Recipiente

Envolver os pedaços de favo em papel jornal ou outro tipo de papel não encerado.

Atenção: nunca envolver em plástico ou papel alumínio, nem colocar em frasco fechado



6. Temperatura da amostra para transporte

Ambiente

7. Tempo crítico para chegada ao laboratório

Até 48 horas

8. Exames

Avaliação da taxa de infestação de crias por *Varroa destructor* (varroatose)

Amostra 3

1. Onde colher

No ninho



2. O que colher

Crias anormais

3. Como colher

Com uma pinça, colher, individualmente, crias anormais



4. Quantidade

Efetuar colheita individual de aproximadamente 20 crias ou todas, se forem menos de 20

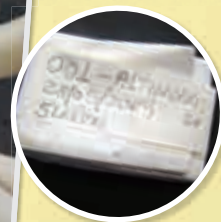
5. Recipiente

Dividir as amostras em 2 partes iguais e colocar em:

- 1) Tubos tipo "Eppendorf" de 1,5 ou 2,0 mL - colocar uma cria suspeita por tubo



- 2) Papel ofício comum - esmagar a amostra ao dobrar o papel (colocar o papel dentro de um envelope)



6. Temperatura da amostra para transporte

- 1) Congelada (-20°C). Congelar imediatamente as amostras, mantendo o material em freezer até o envio para o laboratório

- 2) Ambiente

7. Tempo crítico para chegada ao laboratório

Até 48 horas

8. Exames

Análise microscópica, microbiológica e/ou molecular

Amostra 4

1. Onde colher

No ninho

2. O que colher

Pedaco de favo contendo mel operculado (na parte superior de favos de cria - caso não encontre, colher mel desoperculado)

3. Como colher

Com uma faca, cortar a parte superior do favo contendo mel (entre o arame e a madeira do quadro)

4. Quantidade

Quatro pedaços de aproximadamente 3X7 cm (a amostra pode conter pólen)



Pólen armazenado

Mel operculado

Detalhe do favo contendo mel operculado e pólen armazenado no alvéolo (também chamado de "pão de abelha")

5. Recipiente

Colocar as amostras em frascos plásticos de 500 g a 1 kg. Fechar bem, colocando em seguida cada frasco em saco plástico

6. Temperatura da amostra para transporte

Ambiente

7. Tempo crítico para chegada ao laboratório

Até 48 horas

8. Exames

Análise para esporos de *P. larvae* e presença de pólen de barbatimão

Principais doenças, intoxicações e parasitoses que afetam **ABELHAS ADULTAS - *Apis mellifera***

Nosemose

Agente causador

Microsporídeos, *Nosema apis* e/ou *Nosema ceranae*

Sintomas clínicos

Diarréia, quando causada por *N. apis*;
Sintoma inespecífico, quando causada por *N. ceranae*

Acariose

Agente causador

Âcaros endoparasitas, *Acarapis woodi*,
dentre outras espécies

Sintomas clínicos

Inespecífico

Varroatose

Agente causador

Âcaro ectoparasita, *Varroa destructor*

Constatação visual da presença do ácaro sobre as abelhas



Viroses

Agente causador

Cerca de 18 diferentes vírus podem infectar abelhas, dentre os quais podem ser citados *Black Queen Cell Virus* (BQCV) - *Filamentous Virus* (FV) - *Deformed Wing Virus* (DWW) - *Chronic Bee Paralysis Virus* (CBPV) - *Acute Bee Paralysis Virus* (ABPV) - *Israeli Acute Paralysis Virus* (IAPV) e *Cloud Wing Virus* (CWV)

Sintomas clínicos

Inespecíficos, muito embora, alguns sintomas tenham sido associados a viroses, tais como: abelhas com asas deformadas dentro e na frente da colmeia, abelhas sem pelos e com aspecto brilhoso, abelhas com asas opacas e abelhas com tremores



Yanping Chen, BBV/ARS/USDA

Intoxicações por agrotóxicos

Agente causador

Constituintes químicos de inseticidas e de outros defensivos agrícolas

Sintomas clínicos

Grande quantidade de abelhas mortas fora e/ou dentro da colmeia



Osman Nobrega, CESP/UNESP

Amostras para diagnóstico das principais doenças que afetam **ABELHAS ADULTAS - *Apis mellifera***

Em abelhas adultas, geralmente, não ocorrem sintomas característicos de cada doença. O que se observa comumente é a presença de algumas abelhas adultas moribundas na entrada da colmeia (alvado) ou no chão, rastejando até morrerem. Quando ocorre mortalidade por algum tipo de inseticida, observa-se maior quantidade de abelhas mortas no chão na frente da colmeia e, algumas vezes, no fundo da colmeia. Eventualmente, certas viroses e parasitas podem produzir sintomas específicos (asas deformadas, ausência de pelos, entre outros)

Colheita de abelhas adultas para análise

Para diagnóstico das doenças e intoxicações de abelhas adultas, colher **5 amostras diferentes**

Amostra 1

1. Onde colher

Na frente da colmeia (no solo) e na entrada da colmeia (alvado)



NOTA

Se possível, um dia antes da colheita, capinar/limpar 2 a 3 metros na frente de cada colmeia, para facilitar a visualização das abelhas que estão moribundas

2. O que colher

Abelhas adultas ainda vivas e moribundas (rastejando e sem conseguir voar)

3. Como colher

Com o auxílio de uma pinça, colher as abelhas moribundas

4. Quantidade

Cerca de 30 abelhas ou mais por colmeia

5. Recipiente

Frascos de plástico tipo universal perfurado na tampa e nas laterais



6. Temperatura da amostra para transporte

Ambiente

7. Tempo crítico para chegada ao laboratório

Até 48 horas

8. Exames

Detecção de esporos de *Nosema* spp., ácaros endoparasitas e protozoários

Amostra 2

1. Onde colher

Na entrada da colmeia (alvado)

2. O que colher

Abelhas adultas campeiras que estão chegando

3. Como colher

Fechar a entrada da colmeia (alvado) com uma tira de espuma comum e colher as abelhas que estão chegando dentro de um frasco plástico tipo universal, contendo álcool 70%



NOTA

Para a colheita de abelhas no alvado, pode-se sugá-las, utilizando-se um sugador de abelhas ou, alternativamente, varrê-las com um pincel/trincha comum (de pintura) de 4 a 5 cm de largura



4. Quantidade

Cerca de 30 abelhas ou mais, por colmeia

5. Meio

Álcool 70%. No frasco, deixar 5mm de álcool acima das amostras de abelhas



6. Recipiente

Frasco plástico tipo universal (contendo álcool 70%)
Atenção: fechar bem o frasco, colocando cada frasco em um saco plástico. Em seguida, colocar em caixa de papelão com divisórias entre os frascos

7. Temperatura da amostra para transporte

Ambiente

8. Tempo crítico para chegada ao laboratório

Aiê 72 horas

9. Exames

Deteção de esporos de *Nosema* spp., ácaros endoparasitas e protozoários

Amostra 3

1. Onde colher

Dentro da colmeia

2. O que colher

Abelhas adultas que estão cobrindo a área de cria

3. Como colher

Suspender um favo de cria. Com o auxílio de um frasco de plástico tipo universal, posicionado obliquamente e arrastado de baixo para cima, colher as abelhas dentro do frasco



4. Quantidade

Cerca de 10 abelhas por colmeia

5. Recipiente

Frascos plástico tipo universal



6. Temperatura da amostra para transporte

Congelada (-20°C). Congelar imediatamente as amostras, mantendo o material em freezer até o envio para o laboratório

7. Tempo crítico para chegada ao laboratório

Até 24 horas

8. Exames

Análise molecular

Amostra 4

1. Onde colher

Dentro da colmeia



2. O que colher

Abelhas adultas que estão cobrindo a área de cria

3. Como colher

Susender um favo de cria. Com o auxílio de um frasco de plástico de 500 mL contendo 250 mL de álcool 70%, posicionado obliquamente e arrastado de baixo para cima, colher as abelhas dentro do frasco



4. Quantidade

Cerca de 200 a 300 abelhas por colmeia

5. Meio

Álcool 70%. No frasco, deixar 5mm de álcool acima das amostras de abelhas.



6. Recipiente

Frasco plástico de 500 mL (contendo álcool 70%)

Atenção: fechar bem o frasco, colocando cada frasco em um saco plástico. Em seguida, colocar em caixa de papelão com divisórias entre os frascos

7. Temperatura da amostra para transporte

Ambiente

8. Tempo crítico para chegada ao laboratório

Até 72 horas

9. Exames

Determinação da taxa de infestação de ácaros ectoparasitas

Amostra 5

1. Onde colher

Na frente e/ou no fundo de cada colmeia

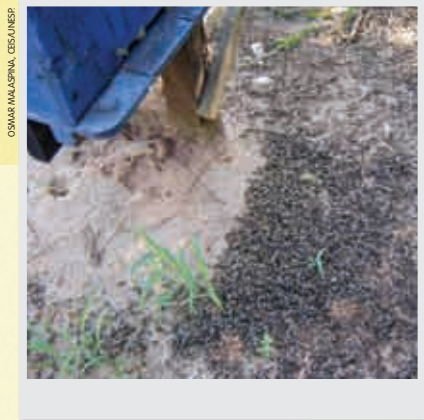
2. O que colher

Abelhas adultas moribundas e/ou mortas

Importante: Colher abelhas mortas somente se a mortalidade tiver ocorrido um dia antes da colheita

3. Como colher

Com o auxílio de uma pinça ou com a própria mão utilizando luvas descartáveis, colher as abelhas moribundas e/ou recentemente mortas



OSMAR MALUSPINA, CES/UNESP



OSMAR MALUSPINA, CES/UNESP

4. Quantidade

Cerca de 300 a 500 abelhas nas proximidades de cada colmeia

5. Recipiente

Frasco plástico com capacidade de 1 kg

6. Temperatura da amostra para transporte

Congelada (-20°C). Congelar imediatamente as amostras, mantendo o material em freezer até o envio para o laboratório

7. Tempo crítico para chegada ao laboratório

Até 24 horas

8. Exames

Deteção de inseticida e outros defensivos agrícolas

Ministério da Agricultura, Pecuária e
Abastecimento - MAPA
Departamento de Saúde Animal
Esplanada dos Ministérios – Bloco D, Anexo A,
Sala 301
70043-900 - Brasília, DF - Brasil
Tel.: 00 55 61 3218-2701 • Fax: 00 55 61 3226-3446
<http://www.agricultura.gov.br>
0800 - 7041995

Organização Pan-Americana
da Saúde – OPAS/OMS
Saúde Pública Veterinária
Centro Pan-Americano de Febre Aftosa -
PANAFTOSA
Av. Presidente Kennedy, 7778 – CEP: 25040-004
Duque de Caxias, Rio de Janeiro – Brasil
Tel.: 00 55 21 3661-9003 • Fax: 55 21 3661-9001
<http://www.panaftosa.org.br>

**Secretaria de
Defesa Agropecuária**

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**



**Organização
Pan-Americana
da Saúde**

*Escritório Regional para as Américas da
Organização Mundial da Saúde*

**Saúde Pública Veterinária
Centro Pan-Americano de Febre Aftosa**