

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**U LISBOA**

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



RASTREIO DE AGENTES PATOGÉNICOS PRESENTES NA POPULAÇÃO ADULTA DA  
ESPÉCIE *Apis mellifera* NO EFETIVO APÍCOLA NACIONAL

MARIANA MARGARIDA DA SILVA CAMPOS

ORIENTADORA:  
Doutora Isabel Maria Soares Pereira da  
Fonseca de Sampaio

TUTORA:  
Dra. Maria José Lisboa Valério da Silva

2023

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



RASTREIO DE AGENTES PATOGÉNICOS PRESENTES NA POPULAÇÃO ADULTA DA  
ESPÉCIE *Apis mellifera* NO EFETIVO APÍCOLA NACIONAL

MARIANA MARGARIDA DA SILVA CAMPOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

VOGAIS:

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da  
Fonseca Sampaio

Doutor José Alexandre Costa Perdigão  
Cameira Leitão

ORIENTADORA:

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da  
Fonseca de Sampaio

TUTORA:

Dra. Maria José Lisboa Valério da Silva

## DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Mariana Margarida da Silva Campos

Título da Tese ou Dissertação: Rastreo de agentes patogénicos presentes na população adulta de *Apis mellifera* no efetivo apícola nacional.

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2023

Designação do curso de

Mestrado ou de

Doutoramento:

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

Clínica

Produção Animal e Segurança Alimentar

Morfologia e Função

Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de  6 meses,  12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial\*;

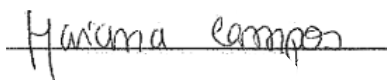
\* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 5 de abril de 2023

Assinatura:



“Para ser grande, sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive.”

Ricardo Reis

## **Agradecimentos**

À minha orientadora, Professora Doutora Isabel Fonseca, pelo apoio constante, presença e paciência. Obrigada por me ajudar a crescer “cientificamente” e por puxar por mim!

À minha tutora, Dra. Maria José Valério, por me acolher neste mundo das abelhas, por todos os ensinamentos acerca de todos os campos da vida e pela confiança que me transmitiu. Escolhi uma tutora e recebi uma amiga, obrigada!

Ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), com um agradecimento especial à Dra. Maria Leonor Orge, a Alice Santos e João Silva, por me receberem e por me apoiarem na realização do meu estágio.

Ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA), pelo apoio na realização deste projeto que espero que seja um grande contributo para a sanidade apícola.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL) e a todo o seu pessoal docente e não-docente que influenciou o meu percurso académico.

À Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), na pessoa da Dra. Sofia Quintans, pela ajuda e esclarecimento de dúvidas.

À Laura e ao Gonçalo, companheiros neste mundo das abelhas, pela ajuda, companhia e conselhos ao longo deste caminho.

Ao Sr. Antero Gomes, por me ter recebido e me ter mostrado a beleza da abelha e da apicultura e por todos os seus ensinamentos e histórias partilhadas.

Aos meus pais e irmãos, por fazerem de mim o que sou hoje e por todo o apoio e carinho que me deram ao longo de toda a minha vida. Sem vocês nada disto seria possível!

Aos meus avós, por serem peças fundamentais da minha vida e por me ensinarem o valor da perseverança, da fé e do trabalho árduo.

Aos meus sobrinhos, que apesar de não saberem ler nem escrever (ainda), me deram a motivação e força para fazer este caminho e terminá-lo.

Aos amigos que a faculdade me deu, Ana, Inês, Marta, Rúben, Sofia, que fizeram este caminho mais leve e feliz, e com quem vivi alguns dos melhores momentos da minha vida. São a família que eu escolhi, obrigada por me escolherem também.

Às amigas que trouxe da minha infância e adolescência, Catarina, Fátima, Bruno e Carolina, por terem crescido comigo e por me acompanharem em mais uma fase da minha vida. Que venham as próximas, sempre juntos.

Ao meu namorado, Jorge, por ser o meu pilar e força nos últimos anos. Obrigada pelo amor e apoio incondicionais e por nunca me deixares desistir.

## Financiamento

Este estudo foi financiado por fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia, I.P., no âmbito do projeto UIDB/00276/2020 (CIISA), LA/P/0059/2020 (AL4Animals), e MSC22Jul-08.



## Resumo

### RASTREIO DE AGENTES PATOGENICOS PRESENTES NA POPULAÇÃO ADULTA DA ESPÉCIE *Apis mellifera* NO EFETIVO APÍCOLA NACIONAL

A presente dissertação de mestrado visa contribuir para o conhecimento do panorama sanitário do efetivo apícola português, fornecendo ferramentas importantes para o compreender.

O primeiro objetivo foi determinar a prevalência nacional, regional e sazonal dos principais agentes patogénicos que afetam a abelha adulta com base na amostra em estudo, e o segundo foi averiguar a interação entre os mesmos. Assim, 493 e 226 amostras de abelhas adultas recolhidas em 2021 e de janeiro a junho de 2022, respetivamente, foram enviadas para o Posto Apícola, INIAV, provenientes de Portugal Continental e Arquipélago dos Açores. Foram analisadas utilizando técnicas macroscópicas e microscópicas estabelecidas pelo laboratório, tendo sido observados *Varroa destructor*, *Nosema* spp., *Acarapis woodi*, *Senotainia tricuspis* e *Braula coeca*. Em 2021, o agente mais prevalente foi *V. destructor* (35,29%, 174/493), seguido por *Nosema* spp. (26,98%, 133/493), sendo que esta tendência se inverteu em 2022, com valores de 23,89% (54/226) e 25,22% (57/226), respetivamente. O Arquipélago dos Açores foi a única região nacional onde se diagnosticaram casos de parasitismo por *A. woodi* e por *B. coeca*, sendo adicionalmente a única zona sem qualquer caso positivo de *V. destructor*. O terceiro agente mais diagnosticado, *S. tricuspis* (2021: 21,30%, 105/493 | 2022: 11,06%, 25/226), apresentou o seu padrão sazonal característico em 2022, com maior prevalência no Verão, embora não se tenha observado o mesmo no ano anterior. *Aethina tumida* e *Tropilaelaps* spp., agentes etiológicos de doenças emergentes exóticas, não foram detetados. A infeção mista por *V. destructor* e *S. tricuspis* foi a mais comum em 2021 (48,96%, 47/96), enquanto em 2022 foi *Nosema* spp. e *S. tricuspis* (43,75%, 7/16). Apesar de não ser a mais frequente, a combinação de *V. destructor* e *Nosema* spp. revelou-se também muito relevante (2021: 29,17%, 28/96 | 2022: 37,60%, 6/16). Por fim, o terceiro objetivo foi avaliar o impacto da pandemia do Covid-19 no envio de amostras para o laboratório, procedendo-se, para esse fim, à comparação do número de amostras de abelhas adultas processadas no Posto Apícola entre o início do ano de 2018 e junho de 2022, a nível anual e trimestral. De 2019 para 2020 ocorreu uma queda de cerca de 60% no número de amostras enviadas, sendo que uma avaliação trimestral revelou que a diminuição ocorreu no início do segundo trimestre de 2020, coincidindo com início da pandemia de Covid-19 e respetivas medidas de controlo sanitárias.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, Portugal, *Varroa destructor*, *Nosema* spp., Covid-19.

## Abstract

### SCREENING OF PATHOGENS PRESENT IN THE ADULT POPULATION OF THE SPECIES *Apis mellifera* IN THE NATIONAL BEEKEEPING POPULATION

The present Masters's dissertation aims to contribute to the knowledge of the sanitary panorama of the Portuguese beekeeping population, providing important tools to understand it.

The first objective was to determine the national, regional and seasonal prevalence of the main pathogens that affect the adult bee in this study's sampling, and the second was to investigate the interaction between them. Thus, 493 and 226 samples of adult bees collected in 2021 and from January to June 2022, respectively, were sent to the Posto Apícola, INIAV, from mainland Portugal and the Azores Islands. They were analyzed using macroscopic and microscopic techniques established by the laboratory, and *Varroa destructor*, *Nosema* spp., *Acarapis woodi*, *Senotainia tricuspis* and *Braula coeca* were observed. In 2021, the most prevalent agent was *V. destructor* (35.29%, 174/493), followed by *Nosema* spp. (26.98%, 133/493), and this trend reversed in 2022, with values of 23.89% (54/226) and 25.22% (57/226), respectively. The Azores islands was the only national region where cases of parasitism by *A. woodi* and *B. coeca* were diagnosed, and it was also the only area without any positive case of *V. destructor*. The third most diagnosed agent, *S. tricuspis* (2021: 21.30%, 105/493 | 2022: 11.06%, 25/226), showed its characteristic seasonal pattern in 2022, with higher prevalence in summer, although it was not observed in the previous year. *Aethina tumida* and *Tropilaelaps* spp., etiologic agents of exotic emerging diseases, were not detected. The mixed infection by *V. destructor* and *S. tricuspis* was the most common in 2021 (48.96%, 47/96), while in 2022 it was *Nosema* spp. and *S. tricuspis* (43.75%, 7/16). Although it was not the most frequent, the combination of *V. destructor* and *Nosema* spp. was also very relevant (2021: 29.17%, 28/96 | 2022: 37.60%, 6/16). Finally, the third objective was to evaluate the impact of the Covid-19 pandemic on the sending of samples to the laboratory and, for this purpose, the number of samples of adult bees processed at the Posto Apícola between the beginning of the year 2018 and June 2022 was compared, on an annual and quarterly basis. From 2019 to 2020, there was a drop of around 60% in the number of samples sent, with a quarterly assessment revealing that the decrease occurred at the beginning of the second quarter of 2020, coinciding with the start of the Covid-19 pandemic and respective sanitary control measures.

Keywords: *Apis mellifera*, Portugal, *Varroa destructor*, *Nosema* spp., Covid-19.

## Índice

Agradecimentos .....	iv
Financiamento .....	v
Resumo.....	vi
Abstract .....	vii
Índice de figuras .....	x
Índice de tabelas.....	xi
Índice de gráficos .....	xii
Lista de abreviaturas .....	xiii
Parte I.....	xiv
Terminologia apícola .....	xiv
1. Relatório de estágio.....	1
2. Introdução .....	4
3. Revisão bibliográfica .....	5
3.1. <i>Apis mellifera</i> .....	5
3.2. Anatomia externa e interna de <i>A. mellifera</i> .....	7
3.3. Principais agentes patogénicos em adultos de <i>A. mellifera</i> .....	11
3.3.1. Artrópodes.....	11
3.3.1.1. Ácaros .....	11
3.3.1.1.1. <i>Varroa destructor</i> .....	11
3.3.1.1.2. <i>Acarapis woodi</i> .....	17
3.3.1.1.3. <i>Tropilaelaps</i> spp. ....	20
3.3.1.2. Dípteros .....	22
3.3.1.2.1. <i>Braula coeca</i> .....	22
3.3.1.2.2. <i>Senotainia tricuspis</i> .....	23
3.3.1.3. Coleópteros.....	24
3.3.1.3.1. <i>Aethina tumida</i> .....	24
3.3.2. Fungos .....	26
3.3.2.1. <i>Nosema</i> spp.....	26
3.4. Contexto legislativo / sanitário português .....	30
Parte II – Rastreio de agentes patogénicos presentes na população adulta da espécie <i>Apis mellifera</i> no efetivo apícola nacional.....	32
4. Objetivos do estudo.....	32
5. Materiais e métodos.....	32
5.1. Contexto geográfico e apícola de Portugal.....	32
5.1.1. Clima e flora portuguesa.....	32
5.1.2. Setor apícola português.....	33

<b>5.2.</b>	<b>Caracterização das amostras.....</b>	<b>35</b>
<b>5.3.</b>	<b>Metodologia da colheita.....</b>	<b>36</b>
<b>5.4.</b>	<b>Conservação .....</b>	<b>37</b>
<b>5.5.</b>	<b>Técnicas de processamento para diagnóstico laboratorial.....</b>	<b>37</b>
5.5.1.	Pesquisa de artrópodes.....	37
5.5.1.1.	Diagnóstico de <i>V. destructor</i> , <i>Tropilaelaps</i> spp., <i>B. coeca</i> e <i>A. tumida</i> 37	
5.5.1.2.	Diagnóstico de <i>A. woodi</i> e <i>S. tricuspis</i> .....	38
5.5.2.	Pesquisa de fungos .....	39
5.5.2.1.	Diagnóstico de <i>Nosema</i> spp. ....	39
<b>5.6.</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>40</b>
<b>6.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>42</b>
<b>6.1.</b>	<b>Estudo das análises do ano de 2021 e 2022 .....</b>	<b>42</b>
6.1.1.	Distribuição das análises por ano e região .....	42
6.1.2.	Resultados da pesquisa de agentes patogénicos .....	43
6.1.2.1.	Prevalência nacional, regional e sazonal de <i>V. destructor</i> .....	43
6.1.2.2.	Prevalência nacional, regional e sazonal de <i>A. woodi</i> .....	45
6.1.2.3.	Prevalência nacional, regional e sazonal de <i>B. coeca</i> .....	45
6.1.2.4.	Prevalência nacional, regional e sazonal de <i>S.tricuspis</i> .....	45
6.1.2.5.	Prevalência nacional, regional e sazonal de <i>Nosema</i> spp.....	47
6.1.3.	Tipologias de infeção e proporção das mesmas .....	48
<b>6.2.</b>	<b>Número de análises por ano .....</b>	<b>49</b>
<b>7.</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>50</b>
<b>7.1.</b>	<b>Prevalências dos agentes patogénicos em estudo em 2021 e 2022.....</b>	<b>50</b>
7.1.1.	<i>Varroa destructor</i> .....	52
7.1.2.	<i>Nosema</i> spp.....	54
7.1.3.	<i>Acarapis woodi</i> e <i>Braula coeca</i> .....	56
7.1.4.	<i>Senotainia tricuspis</i> .....	58
7.1.5.	<i>Tropilaelaps</i> spp. e <i>Aethina tumida</i> .....	59
<b>7.2.</b>	<b>Tipologias de infeção e proporção das mesmas.....</b>	<b>60</b>
<b>7.3.</b>	<b>Impacto da pandemia de Covid-19 no envio de amostras .....</b>	<b>61</b>
<b>7.4.</b>	<b>Considerações gerais .....</b>	<b>63</b>
<b>8.</b>	<b>Conclusões e perspectivas futuras .....</b>	<b>64</b>
<b>9.</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>66</b>
<b>10.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>76</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Avaliação de um favo com criação. Original. ....	1
Figura 2. Exemplar de <i>Tropilaelaps</i> spp. alvo de identificação no ensaio inter-laboratorial. Original. ....	2
Figura 3. Osteoteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Ghent. Original. ....	3
Figura 4. Anatomia externa de <i>A. mellifera</i> . Adaptado de Faux (2021). ....	9
Figura 5. Anatomia interna da <i>A. mellifera</i> , com foco no aparelho digestivo. Adaptado de Faux (2021) ....	10
Figura 6. Efeitos da infecção por DWV: asas curtas e deformadas. Fonte: Rosenkranz et al. (2010). ....	15
Figura 7. "Criação em mosaico" (A) e criação com um padrão saudável (B). Fonte: Faux (2021). ....	15
Figura 8. Fêmea adulta em vista dorsal (A) e ventral (B); Macho adulto em vista dorsal (C). Fonte: A e B - IZSLT (2015); C- Rosenkranz et al. (2010). ....	17
Figura 9. Ácaro <i>Acarapis woodi</i> adulto (seta vermelha) e ovo (seta verde) dentro do lúmen traqueal. Original. ....	20
Figura 10. Ácaro <i>Tropilaelaps</i> spp. adulto em decúbito ventral. Original. ....	22
Figura 11. <i>Braula coeca</i> em decúbito dorsal observado ao microscópio ótico. Original. ....	23
Figura 12. Larva de <i>Senotainia tricuspis</i> (A) e pormenor dos ganchos bocais do aparelho bucal (B). Originais. ....	24
Figura 13. <i>Aethina tumida</i> adulto em decúbito ventral (A) e dorsal (B), e em fase larvar (C). Fonte: OIE (2018d). ....	26
Figura 14. Esporos (setas vermelhas) de <i>Nosema</i> spp. Original. ....	29
Figura 15. Montagem de preparações para diagnóstico de <i>A. woodi</i> e <i>S. tricuspis</i> . Originais. ....	39
Figura 16. Montagem de preparações para diagnóstico de <i>Nosema</i> spp. Originais. ....	40

## Índice de tabelas

Tabela 1. Funções das obreiras dependo da sua idade. Adaptado de Fundación Amigos de las Abejas (c2008-2021).....	6
Tabela 2. Número de colónias a amostrar consoante o tamanho do apiário (INIAV).	37
Tabela 3. Proporção de apiários em estudo, por região e por ano.....	42
Tabela 4. Distribuição das amostras por mês e por ano.....	43
Tabela 5. Prevalência de <i>V. destructor</i> por região e ano.....	44
Tabela 6. Prevalência de <i>S. tricuspis</i> por região e ano.....	46
Tabela 7. Prevalência de <i>Nosema</i> spp. por região e ano.....	47
Tabela 8. Proporção do tipo de infeção composta, em 2021.....	48
Tabela 9. Proporção do tipo de infeção composta, em 2022.....	48
Tabela 10. Síntese das proporções de infeções simples e compostas, por agente etiológico e por ano.....	49
Tabela 11. Distribuição do número de amostras recebidas no laboratório de 2018 a 2022.....	49

## Índice de gráficos

Gráfico 1. Prevalência sazonal de <i>V. destructor</i> por ano.....	44
Gráfico 2. Prevalência sazonal de <i>S. tricuspis</i> por ano.....	46
Gráfico 3. Prevalência sazonal de <i>Nosema</i> spp. por ano.....	48
Gráfico 4. Distribuição do número de amostras recebidas no laboratório de 2018 a 2022.....	50

## **Lista de abreviaturas**

cm - centímetro

DGAV - Direção Geral de Alimentação e Veterinária (antiga DGV)

GPP - Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral

IC - Intervalo de confiança

IFAP - Instituto de Financiamento da Agricultura e Pescas

INE - Instituto Nacional de Estatística

IPMA - Instituto Português do Mar e da Atmosfera

Kg - quilograma

Km - quilómetro

m – metro

mm – milímetro

mL - mililitro

µm - micrómetro

NUTs - Nomenclatura das Unidades Territoriais para Fins Estatísticos

PCR (*polimerase chain reaction*) - reação em cadeia da polimerase

RA - Região Autónoma

## Parte I

### Terminologia apícola

Segundo o Decreto-Lei nº203/2005 de 25 de novembro, entende-se por:

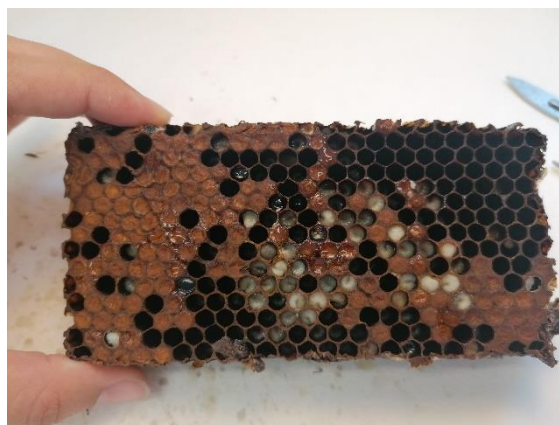
1. “Abelha” o indivíduo de espécie produtora de mel pertencente ao género *Apis* sp., designadamente os da espécie *Apis mellifera*;
2. “Atividade apícola” a detenção de exploração apícola, com finalidade de obtenção de produtos apícolas, reprodução e multiplicação de enxames, polinização, didática, científica ou outra;
3. “Alimentação artificial” a administração de alimento pelo apicultor tendo por objetivo reforçar as provisões ou estimular o desenvolvimento da colónia;
4. “Apiário” o conjunto de colónias de abelhas nas condições adequadas de produção, incluindo o local de assentamento e respetivas infra-estruturas, pertencente ao mesmo apicultor, em que as colónias não distem da primeira à última mais de 100 m;
5. “Apiário comum” o local de assentamento de colónias de abelhas que pertencem a vários apicultores que acordaram nessa partilha, com determinação de parte, e que não distem da primeira à última mais de 100m;
6. “Apicultor” a pessoa singular ou coletiva que possua uma exploração apícola;
7. “Autoridade sanitária veterinária nacional” a Direção-Geral de Veterinária (DGV);
8. “Colmeia” o suporte físico em que os quadros de sustentação dos favos são amovíveis, que pode ou não albergar uma colónia e a sua produção;
9. “Colónia” o enxame, suporte físico e respetivos materiais biológicos por si produzidos;
10. “Cortiço” o suporte físico desprovido de quadros de fixação dos favos, sendo estes inamovíveis, que pode ou não albergar uma colónia e a sua produção. Segundo o artigo 6º, para a contagem de colónias, cada núcleo ou cortiço equivale a 0,5 colmeia móvel, sendo o total arredondado para o número inteiro imediatamente superior;
11. “Enxame” a população de abelhas, que corresponde à futura unidade produtiva, com potencialidade de sobrevivência, produção e reprodução autónomas em meio natural, sem qualquer suporte físico;
12. “Exploração apícola” o conjunto de um ou mais apiários, incluindo as respetivas infraestruturas de apoio pertencentes ao mesmo apicultor, com exclusão dos locais de extração do mel;
13. “Núcleo” a colmeia de quadro movíveis com capacidade superior a três quadros e inferior a seis quadros;
14. “Nucléolo” a colmeia de quadros móveis com capacidade máxima até três quadros cujo objetivo é a multiplicação de colónias ou a fecundação;
15. “Quadro” o caixilho que suporta o favo;

16. “Transumância” a metodologia de atividade apícola com recurso a transporte para aproveitamento de produções específicas com melhores florações;
17. “Zona controlada” a área geográfica reconhecida pela autoridade sanitária veterinária nacional e que cumpra os requisitos previstos no presente decreto-lei.

## 1. Relatório de estágio

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa realizou-se no Posto Apícola do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), localizado na Tapada da Ajuda, Lisboa, tendo-se iniciado no dia 24 de janeiro de 2022 e terminado no dia 1 de julho de 2022. Após o término oficial do período de estágio, a aluna continuou a participar de forma voluntária nas atividades de laboratório até ao final do ano civil de 2022.

Sob a tutoria da Dra. Maria José Valério, a mestranda integrou a equipa do Serviço de Patologia Apícola, focando-se na temática da Sanidade Apícola. Aqui, participou nas atividades diárias do laboratório, nomeadamente na receção, ordenamento, processamento e análise de todas as amostras recebidas. As principais atividades realizadas foram a análise de favos de criação (Figura 1) e de abelhas adultas, passando por diferentes técnicas de deteção de ácaros de *Varroa destructor* nos dois tipos de amostra mencionados, disseção de abelhas, maceração de abdómens, preparação de esfregaços para deteção de esporos de *Nosema* spp. e de *Paenibacillus larvae*, e preparação de lâminas para a observação de larvas de *Senotainia tricuspis* e ácaros da espécie *Acarapis woodi* ao microscópio. Através da análise rotineira de lâminas, favos de criação de abelhas, a mestranda aperfeiçoou as capacidades de diagnóstico de agentes etiológicos de doenças como a Nosemose, a Varroose e a Loque Americana. Adicionalmente, com o apoio do técnico superior João Silva, participou na execução da técnica de PCR para a diferenciação das espécies de *Nosema* spp., em amostras em que se confirmou a infeção.



**Figura 1. Avaliação de um favo com criação (Original).**

A mestranda participou, ainda, em dois ensaios inter-laboratoriais organizados pelo Laboratório de Referência Europeu para a Sanidade Apícola. O primeiro, denominado de “CLI Identification of *Tropilaelaps* spp. by morphological examination” decorreu em março de 2022 e teve como objetivo a identificação morfológica de ácaros do género *Tropilaelaps* com base em critérios morfológicos enviados pela organização (Figura 2). O segundo realizou-se em

junho do mesmo ano com o título de “ILPT Quantitation of six honey bee viruses by RT-PCR”, cujo propósito era detetar, identificar e quantificar a infeção viral de várias amostras enviadas, através da técnica molecular RT-PCR, de uma gama de seis vírus, bem como avaliar a sensibilidade e especificidade do método.



**Figura 2. Exemplar de *Tropilaelaps* spp. alvo de identificação no ensaio inter-laboratorial. Original.**

Ocasionalmente, a aluna acompanhou um apicultor nas suas atividades diárias, nomeadamente na verificação do estado de saúde das colmeias, troca de quadros, desinfeção do material apícola, captura de enxames e divisão de colónias, em dois apiários nos concelhos de Oeiras e Sintra, na Região de Lisboa e Vale do Tejo, de modo a expandir o seu conhecimento em apicultura.

No que concerne a participação em palestras e eventos de formação, a aluna esteve presente na XLI Feria Apícola Internacional em Pastrana, Espanha, em março de 2022, assistindo a várias palestras sobre diferentes temáticas do mundo apícola. Em maio de 2022, na sede do INIAV, participou no Fórum *Vespa velutina* Lisboa Atlantic POSitive.

Como resultado do trabalho desenvolvido durante o estágio, a mestranda teve oportunidade de apresentar alguns resultados no CIISA Congress 2022, decorrido a 11 e 12 de novembro de 2022 na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, sob a forma de poster com o título “Bee or not to Bee? Present and future of Portugal’s honeybee colonies”, o qual foi vencedor do prémio de Melhor Poster de Aluno de Mestrado.

Apesar de não se integrar na temática da Sanidade apícola, durante o seu estágio, a aluna assistiu a necrópsias de animais de companhia realizadas pela Dra. Maria Leonor Orge e Dra. Paula Mendonça, do laboratório de Patologia do INIAV, em Oeiras, como complemento da sua formação contínua.

### **Estágio extra-curricular**

De setembro a dezembro de 2021, a aluna realizou um estágio em Clínica de Animais de Companhia na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Ghent, Bélgica, ao abrigo do programa ERASMUS+ (Figura 3). Neste período, para além de viver uma experiência única de estudar e viver num país culturalmente rico e diferente, foi também possível adquirir uma experiência valiosa de trabalho num hospital de referência com uma elevada e variada casuística, com contacto com variadas especialidades e com oportunidade de praticar a língua inglesa. Aqui foi possível participar ativamente em consultas de referência, cirurgias, procedimentos de diagnóstico imagiológico, atividades de internamento e no serviço de patologia.



**Figura 3. Osteoteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Ghent. *Original.***

## 2. Introdução

Desde os primórdios da civilização que o Homem está ligado à abelha do mel, sendo que o registo mais antigo desta interação se encontra desenhado numa gruta denominada Cueva de Araña, em Espanha, datando cerca de 10 000 a 15 000 anos. Desde cedo, a coleta de mel fez parte das atividades dos nossos antepassados, que rapidamente descobriram e estabeleceram a apicultura. Esta atividade foi evoluindo até aos dias de hoje, à medida que os estudos sobre a abelha e os seus produtos foram sendo desenvolvidos (Farinha et al. 2019).

Os produtos apícolas como o própolis, a cera, a apitoxina, a geleia real e, principalmente, o mel, apresentam um elevado peso na economia mundial, sendo a sua produção a principal motivação para a prática da apicultura (Botías et al. 2013). Para além de serem uma fonte de rendimento, são produtos particularmente valorizados na indústria farmacêutica (FNAP 2017). No entanto, é na atividade polinizadora da abelha que está o seu maior valor. Juntamente com outros insetos, mamíferos, e aves, as abelhas asseguram o equilíbrio nos ecossistemas, promovendo a biodiversidade. Além disso, a qualidade e segurança alimentar dependem fortemente destes agentes, bem como a produção de matérias-primas para outros objetivos como a indústria, como é o caso do algodão. Estima-se que cerca de 5 a 8% das colheitas de vegetais e frutas indispensáveis para a alimentação humana a nível mundial seriam perdidas sem a sua atividade (Khalifa et al. 2021). Paralelamente, o seu valor económico é muito elevado a nível global (OPERA Research Center 2013; Khalifa et al. 2021). *Apis mellifera* é o inseto polinizador mais eficiente, mas também o mais relevante devido à apicultura e, conseqüentemente, à sua dispersão (Khalifa et al. 2021). O seu papel polinizador leva a que seja um agente indispensável no ecossistema terrestre, à sobrevivência humana e à prosperidade económica, mas o seu papel de produtor direto de alimentos e outros produtos torna-o o centro de uma atividade que tem um grande valor sociocultural também (Etxegarai-Legarreta e Sanchez-Famoso 2022).

Nas últimas décadas, tem sido evidente o declínio dos insetos polinizadores e, particularmente, da abelha *A. mellifera* (OPERA Research Center 2013; Etxegarai-Legarreta e Sanchez-Famoso 2022). Desde o início do século XXI tem-se assistido à morte de colónias em larga escala por todo o mundo, em que se observa o declínio rápido do número de obreiras, mas com a criação e a rainha presentes sem alterações e ausência de sinais de doença. A este fenómeno sem causa aparente identificada foi dado o nome de Síndrome do Colapso de Colónias (em inglês, *Colony Collapse Disorder*) (vanEngelsdorp et al. 2009). Apesar do mistério que rodeia este fenómeno, estão apontadas algumas causas bióticas e abióticas que atuam de forma sinérgica e complexa, nomeadamente a presença de agentes patogénicos como *Varroa* spp. e *Nosema* spp. (vanEngelsdorp et al. 2009; Galajda et al. 2021), as alterações climáticas, perda de biodiversidade e habitats e, conseqüentemente, falta

de fontes de alimento, e os pesticidas (Evans and Chen 2021; Galajda et al. 2021; Nikita et al. 2022).

Tendo em conta a importância deste tema, através da presente dissertação de mestrado a aluna procurou respostas para melhor compreender o panorama da saúde das abelhas em Portugal. Não sendo (ainda) possível saber na totalidade quais os fatores que estão a promover a morte das abelhas em todo o mundo, este trabalho visa contribuir para esta investigação tão complexa e relevante nos dias de hoje.

### **3. Revisão bibliográfica**

#### **3.1. *Apis mellifera***

##### **Origem e distribuição**

A abelha europeia – *Apis mellifera* - pertence ao reino Animal, filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Hymenoptera, subordem Apocrita, superfamília Apoidea, família Apidae, subfamília Apinae, género *Apis* e espécie *Apis mellifera* (Martínez 2018).

As abelhas produtoras de mel pertencem ao género *Apis*, com origem na Ásia (Farinha et al. 2019), existindo cinco espécies: *Apis mellifera*, *Apis dorsata*, *Apis laboriosa*, *Apis cerana*, *Apis florea* (Fundación Amigos de las Abejas c2008-2021). *Apis mellifera* teve origem, mais especificamente, no Sudoeste Asiático, expandindo posteriormente para o Noroeste Asiático e para os continentes Africano e Europeu, sendo que neste último o seu limite a norte é o Sul da Escandinávia (Farinha et al. 2019). No entanto, pela ação do Homem, esta espécie chegou aos restantes continentes, à exceção da Antártida (Faux 2021). Hoje em dia conhecem-se várias subespécies desta abelha, sendo que a que está presente na Península Ibérica é *Apis mellifera iberiensis*. Assim, trata-se de um inseto adaptado a vários tipos de clima, geografia e ecossistemas (Farinha et al. 2019).

##### **Organização da colónia**

Esta espécie organiza-se em colónia, funcionando como um superorganismo, em que cada indivíduo tem uma função. As colónias incluem a criação e as abelhas adultas, que podem ser em número de 10 000 a 40 000. Existem três castas dentro da colmeia: a rainha, as obreiras e os zangãos (Farinha et al. 2019).

A rainha, uma única na maioria das situações, coordena toda a atividade da colónia e é mãe de todos os seus membros, interagindo com os mesmos através de estímulos químicos ou físicos. Através de feromonas consegue influenciar o comportamento das obreiras e zangãos. Além disso, é a única fêmea sexualmente madura e que acasala com os machos. O seu tempo de vida é, normalmente, entre dois e cinco anos (Farinha et al. 2019; Fundación Amigos de las Abejas c2008-2021).

As obreiras correspondem ao grupo mais numeroso da colónia, cujo número varia ao longo do ano a nível dos milhares de indivíduos. São fêmeas estéreis e apresentam variadas funções, diferentes ao longo da sua vida. O seu tempo de vida é variável consoante a altura do ano e a atividade da colónia: pode ir de 15 a 40 dias na Primavera, época de grande atividade devido à floração, a vários meses durante o Inverno, estação em que quase não existe atividade. As funções destes indivíduos são o cuidar e alimentar a criação e a rainha adulta, a limpeza e construção do ninho, defesa do mesmo e a procura e armazenamento de alimento (Farinha et al. 2019) (Tabela 1).

**Tabela 1. Funções das obreiras dependo da sua idade. Adaptado de Fundación Amigos de las Abejas (c2008-2021).**

<b>Idade</b>	<b>Funções</b>
Dias 2-3	Limpeza das células e aquecimento da criação
Dias 4-12	Alimentação da rainha e da criação
Dias 13-18	Produção de cera e construção das células
Dias 19-20	Defesa da colmeia
Dias 21-38/42	Saída para o exterior e colheita de néctar, água, pólen e própolis

Os zangãos são os machos da colmeia e podem ser milhares durante a Primavera. Resultam do desenvolvimento de um ovo não fecundado. Começam a voar fora da colmeia quando atingem a maturidade sexual (Fundación Amigos de las Abejas c2008-2021). A sua única função é fecundar a rainha durante o seu voo de acasalamento, morrendo após a cópula. Caso não acasalem com a rainha, são expulsos da colónia no Inverno pelas obreiras. Vivem entre 20 e 90 dias, dependendo da altura do ano (Farinha et al. 2019).

A abelha passa por quatro fases distintas: ovo, larva, pupa e adulto. Dependendo da célula onde rainha vai pôr o ovo, o tempo de desenvolvimento da abelha na criação e a casta à qual irá pertencer será diferente. Caso o ovo seja colocado num alvéolo real, este será fertilizado e a alimentação será à base de geleia real, dando origem a uma rainha, durando o processo de desenvolvimento 16 dias. No caso em que a ovoposição ocorra numa célula hexagonal pequena, o ovo será também fertilizado, mas, como a alimentação será apenas à base de mel e pólen, irá nascer uma obreira ao fim de 21 dias. Por último, numa célula hexagonal grande será colocado um ovo não fertilizado e irá nascer um macho, com um período de desenvolvimento de 24 dias. Entre o 8º e 9º dia a célula é operculada (Pascoal 2012; Farinha et al. 2019).

### **3.2. Anatomia externa e interna de *A. mellifera***

#### **Anatomia externa**

Sendo um inseto, a morfologia externa da abelha *A. mellifera* é muito semelhante aos restantes seus pares, apesar de haver, naturalmente, diferenças.

Sendo um artrópode invertebrado, apresenta um exoesqueleto quitinoso, que confere estabilidade e protege o interior do organismo. Na face interna do esqueleto, encontramos uma membrana basal, a contactar com a hemolinfa, onde se inserem os músculos. O corpo da abelha pode ser dividido em cabeça, tórax e abdómen encontrando-se coberto de pelos. A cabeça é triangular na obreira, mas mais arredondada nos zangãos. Na cabeça observam-se os olhos, as antenas e as peças bucais (Martínez 2018).

A abelha tem um par de olhos compostos, dispostos lateralmente, formados por milhares de omatídeos em forma de hexágono. Estes omatídeos comportam-se como um único olho e, no seu conjunto, são responsáveis pela visão da abelha propriamente dita (Figura 4). Em comparação com o Homem, têm melhor acuidade visual na região do espectro ultravioleta, sendo praticamente cegas na região do infravermelho. Conseguem discernir as cores azul, amarela e verde-azulada (Martínez 2018). Adicionalmente, estão presentes três olhos simples, ou ocelos, entre os dois olhos compostos e na região dorsal da cabeça. Estes são sensíveis à intensidade da luz, não participando na receção de imagem. Cada ocelo apresenta cerca de 800 fotoreceptores e permitem que a abelha detete as variações de luminosidade (Martínez 2018; Faux 2021). Ambos os tipos de olhos são cobertos por pelos táteis muito sensíveis (Faux 2021) (Figura 4).

As antenas são estruturas segmentadas enraizadas na face frontal, entre os olhos compostos. Na sua composição estão presentes inúmeros órgãos sensoriais, em forma de pelos ou de placas. Os primeiros são particularmente responsáveis pelo tato, enquanto as placas garantem o sentido do olfato (Martínez 2018). Adicionalmente, as antenas são responsáveis por recolher informação acerca de humidade e temperatura, e por detetar vibrações e feromonas presentes no ar (Faux 2021) (Figura 4).

O aparelho bucal da abelha é constituído pelas mandíbulas e pela probóscide, sendo do tipo lambedor-sugador. Apresenta diferentes características consoante a casta: na obreira as mandíbulas são mais estreitas na base e terminam em forma de colher, fazendo movimentos horizontais. Nesta linhagem, as mandíbulas são usadas para manipular as lâminas de cera produzidas nas respetivas glândulas e para conseguir colher o pólen das flores. A probóscide é uma estrutura tubular composta por várias peças bucais separadas, usada por este inseto para sugar líquidos como o néctar, água ou o alimento artificial fornecido pelos apicultores (Martínez 2018; Faux 2021) (Figura 4).

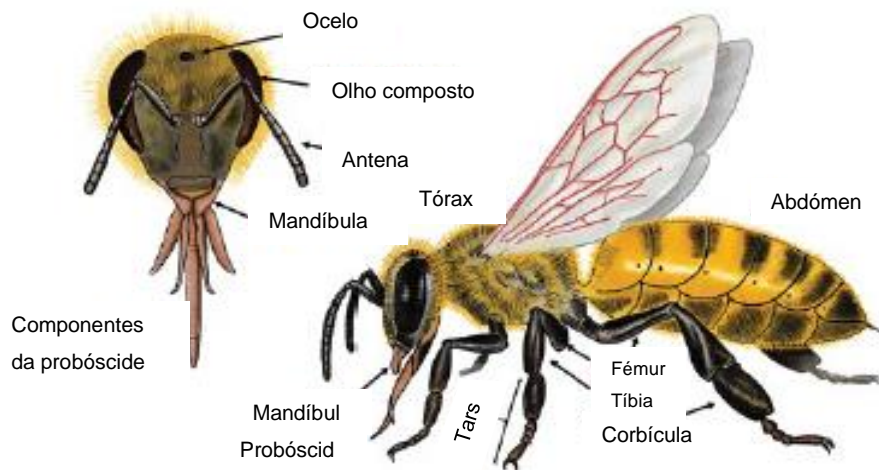
O tórax está coberto de pelos e divide-se três segmentos, no sentido crânio-caudal: protórax, mesotórax e metatórax. Em cada um deles articula-se um par de patas. Cada pata

é dividida em anca ou coxa, trocânter, fêmur, tíbia e tarso. O par de patas ligado ao protórax apresenta principalmente funções de limpeza, nomeadamente dos pelos corporais, olhos e antenas. Para a limpeza destas últimas, a abelha dispõe de uma estrutura em forma de pente especialmente para este efeito. Em conjunto com o segundo par de patas e com os pentes presentes no terceiro, as obreiras usam as patas para escovar o corpo, de modo a recolher o pólen acumulado e armazenar numa estrutura denominada corbícula (Figura 4), uma bolsa presente no terceiro par de patas na face exterior das tíbias, até chegar à colmeia. Adicionalmente, também se pode acumular própolis nesta estrutura (Martínez 2018; Faux 2021).

As lâminas de cera produzidas nas glândulas cerígenas, presentes no abdómen, são recolhidas por estruturas em forma de pinça presentes no terceiro par de patas e posteriormente transferidas para as mandíbulas para serem trabalhadas (Martínez 2018; Faux 2021).

No tórax articulam-se também as asas, membranosas e com nervuras quitinosas, em número de quatro: o primeiro par liga-se ao mesotórax e o segundo ao metatórax (Martínez 2018). As asas ipsilaterais estão conectadas por pequenos ganchos presentes no limite cranial da asa traseira que se ligam ao limite caudal da asa da frente (Faux 2021). Num voo de maior distância, a ligação entre os pares mantém-se, conferindo estabilidade e velocidade, enquanto se for um voo mais curto e de precisão, como quando vai pousar numa flor, há uma interrupção da ligação (Martínez 2018).

O abdómen está coberto de pelos, à semelhança do tórax, e é diferente consoante a casta em questão. Enquanto a rainha tem um abdómen mais alongado que a obreira, o do zangão é mais arredondado e volumoso. Nesta região do corpo encontra-se o ferrão, um órgão de defesa ligado a uma glândula de veneno e a um reservatório de veneno, em forma espigado na obreira e liso na rainha (Faux 2021). Pela relação íntima com o intestino, quando a obreira ferra já não consegue retirar o ferrão e, ao tentar fazê-lo, perde este órgão e parte do intestino, acabando por morrer. A rainha pode ferrar indefinidamente (Martínez 2018).



**Figura 4. Anatomia externa de *A. mellifera*. Adaptado de Faux (2021).**

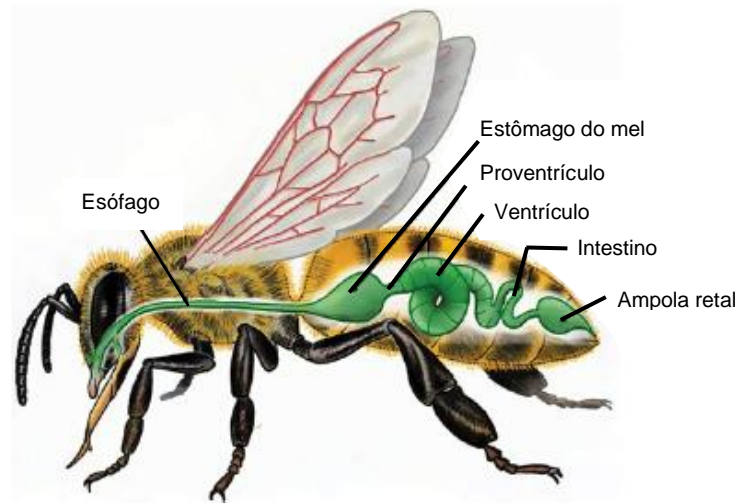
### **Anatomia interna**

À semelhança de outros insetos, as abelhas possuem um sistema circulatório aberto, ou seja, em vez de sangue possuem hemolinfa e esta circula livremente. Só existe um vaso sanguíneo, presente na linha média na parte dorsal do abdómen e composto por ventrículos unidos entre si, designado por coração (Faux 2021). Os ventrículos estão interligados por válvulas unidirecionais designadas por ostíolos e a hemolinfa é bombeada cranialmente para a aorta torácica. Posteriormente, após irrigar os órgãos da cabeça, abandona esta estrutura e flui pelo tórax e abdómen de modo a voltar a entrar na circulação. Aqui existem ainda dois diafragmas, o ventral e o dorsal, encarregues da circulação da hemolinfa no abdómen. O aporte de oxigénio e nutrientes efetua-se por difusão. A hemolinfa é constituída por plasma, linfócitos com capacidade fagocitária e hemócitos com um papéis importantes na imunidade do inseto: fagocitose, encapsulação e formação de nódulos aquando da invasão de bactérias ou parasitas (Martínez 2018).

No que concerne ao aparelho respiratório, a abelha possui dez pares de estigmas ou espiráculos alinhados bilateralmente no abdómen e tórax, que dispõem de válvulas, à exceção do segundo par. Estas abrem-se em resposta a baixas tensões de oxigénio e a altas concentrações de ácido carbónico. A válvula do primeiro par de estigmas não fecha completamente. O ar entra por estes orifícios e passa para as traqueias, que, por sua vez, se ligam a sacos traqueais e traquíolas (Martínez 2018). Aqui ocorrem as trocas gasosas, sendo que é através da contração abdominal que o ar se movimenta através dos sacos aéreos para o sistema de traqueias (Faux 2021).

O aparelho digestivo começa no aparelho bucal, seguido pelo esófago. Este faz o alimento avançar através de movimentos de contração, guiando-o para o estômago do mel, um saco de paredes elásticas na porção cranial do abdómen. Neste órgão fica armazenado

o néctar das flores, bem como a água e o mel, até a chegada à colmeia, onde será regurgitado. A estrutura seguinte denomina-se proventrículo, constituído por uma válvula que impede que os conteúdos passem para a estrutura seguinte do sistema, o ventrículo ou intestino médio. A digestão propriamente dita e a absorção dos nutrientes ocorrem nesta porção, cuja parede interna está coberta por uma membrana peritrófica. No sentido distal do tubo digestivo, surge o intestino, que termina no reto. A ampola retal tem como funções a absorção de água e a retenção do material fecal até que a abelha saia da colmeia, que pode demorar meses devido ao Inverno (Martínez 2018; Faux 2021) (Figura 5).



**Figura 5. Anatomia interna da *A. mellifera*, com foco no aparelho digestivo. Adaptado de Faux (2021)**

O aparelho excretor das abelhas é constituído pelos túbulos de Malpighi, que filtram a hemolinfa, encaminhando os produtos de excreção para o intestino, para serem eliminados através do material fecal. As substâncias filtradas são principalmente derivados nitrogenados.

Dispersas pelas paredes do abdómen encontram-se as células adiposas, com funções semelhantes ao fígado dos vertebrados. Estão encarregues da produção de proteínas para a hemolinfa, acumulação de lípidos, proteínas e glicogénio, e garantem a sobrevivência da abelha durante o Inverno (Martínez 2018; Faux 2021).

No que concerne ao sistema nervoso, este é composto por um cérebro, onde se liga um cordão nervoso ventral, composto por um gânglio subesofágico e por mais sete gânglios, ao longo da porção ventral do tórax e abdómen (Martínez 2018).

A abelha possui um grande e variado número de glândulas dispostas pelo corpo.

Na cabeça das obreiras encontramos as glândulas hipofaríngeas, especialmente desenvolvidas nas abelhas-ama, que produzem a geleia-real, alimento exclusivo das rainhas e alimento dado às larvas nos primeiros três dias de vida. Regridem à medida que a idade da abelha aumenta. As glândulas mandibulares localizam-se também na cabeça e, para além de produzirem uma parte da geleia-real nas abelhas-ama, produzem feromonas no caso da rainha (Martínez 2018).

Na cabeça e no tórax, encontram-se as glândulas salivares, cujo produto é a saliva, que tem pH básico e possui enzimas para transformação do néctar em mel (Martínez 2018).

Na parte dorsal do abdómen encontra-se a glândula de Nassanof, que produz um odor característico quando a abelha está em “posição de chamada”, isto é, a bater as asas e com o abdómen direcionado para cima. Esta substância atrai as abelhas da mesma colónia que estão desorientadas (Martínez 2018).

As glândulas da cera, localizadas na região ventral do abdómen, produzem escamas de cera que, posteriormente, são moldadas e amassadas pelo segundo par de patas e mandíbulas das abelhas. Estas glândulas começam a funcionar aos 12 dias de vida e param aos 20 dias. Para produzir 1 kg de cera, as abelhas têm de consumir entre 10 e 15 kg de mel e pólen (Martínez 2018).

O aparelho reprodutor da rainha é constituído por dois ovários, dois ovidutos e espermateca, local onde ficam acumulados os espermatozoides. O aparelho reprodutor do macho é constituído por dois testículos, dois tubos deferentes, duas vesículas seminais, duas glândulas de muco e endofalo. Este último é o órgão copulador e está invaginado quando em repouso. No entanto, aquando da cópula, este evagina-se e quebra-se no final da mesma, resultando na morte do zangão (Martínez 2018).

### **3.3. Principais agentes patogénicos em adultos de *A. mellifera***

Este trabalho foca-se principalmente no diagnóstico de artrópodes e fungos enquanto agentes patogénicos pelo que os vírus não serão abordados, apesar de haver uma grande número de vírus específicos de *A. mellifera*.

#### **3.3.1. Artrópodes**

##### **3.3.1.1. Ácaros**

###### **3.3.1.1.1. *Varroa destructor***

O ácaro *V. destructor* é o agente etiológico da Varroose, a doença com maior impacto sanitário e económico nas colónias de *A. mellifera* e no setor apícola a nível mundial (OIE 2021). Pertence à classe Arachnida, ordem Parasitiformes e família Varroidae (Martínez 2018).

A alargada distribuição do parasita e o facto da abelha do mel não estar adaptada ao mesmo promove o colapso das colónias, o aumento dos custos com produtos sanitários e o aumento dos prejuízos a nível dos produtos apícolas e, ainda mais importante, a nível da polinização (Rosenkranz et al. 2010). Segundo Traynor et al. (2020), o ácaro apresenta uma grande capacidade de adaptação, com facilidade em se adaptar a novos hospedeiros, o que

explica a dispersão e a dificuldade em controlar, estabelecendo rapidamente resistência aos acaricidas.

### **Distribuição geográfica**

Estão identificadas mais três espécies que parasitam a abelha: *V. rindereri*, *V. underwoodi* e *V. jacobsoni*. Esta última foi a primeira do género a ser identificada em *A. cerana*. *V. destructor* é a espécie que provoca mais danos nas colónias e aquela que mais se espalhou globalmente. Iniciou a sua expansão a partir da Ásia e Oceânia, sendo que se acredita que terá começado a parasitar *A. mellifera* na década de 60 do século XX. Na altura era identificado como *V. jacobsoni*, até ao início do século XXI, altura em que se concluiu que eram espécies diferentes. Dentro da espécie existem vários haplogrupos, sendo os dois mais relevantes a estirpe coreana (K1), dispersa globalmente e mais prevalente, e a estirpe japonesa/tailandesa (J1), limitada ao arquipélago do Japão (Rosenkranz et al. 2010; Traynor et al. 2020).

Nos anos 80, alcançou o continente europeu, tendo chegado a Portugal em 1986 (Pires et al. 2005), continuando a sua expansão até aos dias de hoje (Noël et al. 2020). No início de 2020, apenas a Austrália, alguns países africanos e ilhas asiáticas eram considerados territórios sem qualquer registo deste parasita (Noël et al. 2020; Traynor et al. 2020). No entanto, em junho de 2022, foi detetado um surto de *V. destructor* em colmeias em Nova Gales do Sul, Austrália, tendo sido ativado o plano de emergência. À data de escrita desta dissertação, o surto ainda não estava controlado (Australian Government - Department of Agriculture 2022).

Em Portugal, a Varroose existe de Norte a Sul do país. Todavia, as ilhas de São Miguel, Santa Maria, Terceira, Graciosa, São Jorge e Corvo, pertencentes à Região Autónoma dos Açores são consideradas indemnes (Decisão de Execução (UE) nº2019/1895 da Comissão).

### **Ciclo de vida**

O ciclo de vida tem duas fases distintas: a fase reprodutiva e a fase forética.

A fase reprodutiva ocorre dentro das células da criação operculadas. Este parasita afeta a obreira e o zangão, tendo preferência pela criação deste último. As células de zangão apresentam as condições ideais para a reprodução do ácaro, nomeadamente uma temperatura menor, por se encontrarem à periferia dos quadros (Martínez 2018); maior tamanho, permitindo uma postura mais abundante; e maior potencial reprodutivo por permitir um maior tempo de invasão. Adicionalmente, são cuidadas pelas abelhas-ama de forma mais intensiva. A criação de rainhas raramente é parasitada (OIE 2021).

Um dia antes da operculação da larva, a fêmea fertilizada faz a seleção da célula a invadir e esconde-se, imóvel, na acumulação de mel, pólen e geleia real do fundo do alvéolo, dos quais se vai alimentando e respirando através do peritrema. A imobilidade tem como objetivo minimizar a probabilidade de ser removida pelas obreiras quando fazem a limpeza do

favo. Após a operculação, a fêmea perfura a pré-pupa de modo a formar um local de alimentação para si e para a descendência, que permanece aberto devido aos anticoagulantes e ação supressiva de cicatrização presente na saliva do ácaro (Traynor et al. 2020).

Inicialmente, o ácaro *Varroa* alimenta-se da gordura corporal da abelha para poder iniciar a ovoposição. O primeiro ovo, não fertilizado e haploide, é depositado cerca de 60 a 70 horas depois da invasão, dando origem a um macho, seguido da ovoposição de ovos diploides a cada 30 horas, que irão dar origem a fêmeas (Traynor et al. 2020). Durante os cinco a seis dias após a eclosão, os ácaros alimentam-se de hemolinfa e gordura no local de alimentação e atravessam dois estádios ninfaís e três mudas até se tornarem adultos. Os machos atingem a maturidade mais rapidamente e aguardam que a primeira fêmea amadureça para acasalarem. À medida que chegam ao estado adulto, as fêmeas vão acasalando com o “irmão” e acumulam os espermatozoides na espermateca (Rosenkranz et al. 2010).

A fase forética inicia-se quando a abelha emerge da célula, carregando a fêmea fundadora e as filhas fertilizadas inseridas no abdómen ou, menos frequentemente, na transição entre o tórax e a cabeça ou abdómen (OIE 2021). Estas apresentam preferência pelas abelhas-ama, por visitarem a criação com mais regularidade (Del Piccolo et al. 2010). O parasitismo das abelhas adultas permite ativar os ovários dos ácaros fêmea, amadurecer as células reprodutoras masculinas na espermateca das fêmeas fertilizadas e alimentarem-se da hemolinfa e gordura corporal. O ácaro identifica o hospedeiro, quer larvar quer adulto, através da deteção de feromonas. Quando a abelha visita a criação, os varroas invadem a mesma e o ciclo recomeça (Rosenkranz et al. 2010; Traynor et al. 2020). No entanto, existe evidência que é possível que uma fêmea não fertilizada inicie a fase forética, acasalando com o seu filho macho quando invadir a criação (Häußermann et al. 2020).

Esta fase torna-se um meio de transmissão entre colónias. Podem surgir, assim, picos de *Varroa* numa determinada colónia quando as vizinhas colapsam ou em caso de pilhagem (Rosenkranz et al. 2010).

### **Fisiopatologia**

Este ácaro é um parasita que afeta tanto a abelha adulta como a criação e os danos causados pelo mesmo devem-se, não só à sua ação direta, como indireta (Martínez 2018).

O hospedeiro original, a abelha *A. cerana*, apresenta mecanismos de defesa face a este parasita, que estão ausentes em *A. mellifera*, sendo eles o comportamento higiénico exacerbado e a impossibilidade do ácaro se reproduzir em criação de obreiras. Assim, neste novo hospedeiro, o ácaro *V. destructor* provoca danos mais graves (Traynor et al. 2020).

Nas abelhas adultas parasitadas só se observam alterações de maior importância em caso de infestações graves, no entanto, a criação é muito mais sensível.

Ao alimentar-se da criação existe espoliação de água, gordura corporal e hemolinfa, fazendo com que a abelha, ao emergir, se apresente com menor peso corporal, deformada e mais frágil, estando por isso mais suscetível a outras doenças. Nos zangãos, observa-se a diminuição na capacidade de voo e a redução do número de espermatozoides produzidos, proporcional ao tamanho corporal, e, conseqüentemente, a diminuição do potencial reprodutivo (Rosenkranz et al. 2010).

As obreiras começam a recolha de néctar e pólen de forma mais precoce (OIE 2021) e existe uma alteração a nível neural que afeta a capacidade da abelha em voar e orientar-se no exterior. Em ambas as castas, existe uma diminuição da imunidade devido não só a depleção de reservas corporais, nomeadamente de gordura, mas também devido à supressão de genes ligados à resposta imunitária. Esta imunossupressão surge na forma de redução do número de hemócitos e interrupção da produção de melanina, essencial para o inseto se defender de agentes patogénicos e para a cicatrização de lesões (Applegate e Petritz 2020; Noël et al. 2020). Além disso, o tempo de vida diminui (OIE 2021).

O ácaro *Varroa* interage com vários fatores bióticos e abióticos que influenciam o impacto na abelha do mel. A interação com outros agentes patogénicos, como *Nosema* spp., reduz a capacidade de combater a infeção por parte de hospedeiro (Noël et al. 2020). Além disso, o artrópode atua como vetor biológico. Existem variados vírus associados a *A. mellifera* parasitada por *V. destructor*. No entanto, apenas o vírus da paralisia aguda (ABPV- *acute bee paralysis virus*) e o vírus das asas deformadas (DWV – *deformed wing virus*) têm *V. destructor* como vetor comprovado. Os vírus são adquiridos ou transmitidos pelo ácaro durante a alimentação nas pupas e abelhas adultas (Remnant et al. 2019; Traynor et al. 2020).

Por sua vez, os fatores ambientais desempenham um papel bastante relevante. A interação com neonicotinóides, um tipo de pesticida, promove a diminuição da população no Inverno e altera a capacidade de voo. As alterações climáticas aumentam o tempo de criação e o tempo de recolha de néctar e pólen, aumentando o tempo de reprodução do parasita, e, conseqüentemente, da sua população (Noël et al. 2020). Na abelha *A. mellifera* existe tipicamente diapausa na criação quando as temperaturas atmosféricas são mais baixas. Caso não ocorra este fenómeno podem surgir ciclos contínuos de Varroose, visto não serem naturalmente interrompidos (van Dooremalen et al. 2012; Traynor et al. 2020).

A nível da colónia, o impacto causado depende muito do grau de infestação, podendo passar despercebida no caso de ser leve a moderada. No entanto, a Varroose promove a diminuição da população e da sua viabilidade, enfraquecendo-a, visto que a criação está afetada, e conseqüentemente, as abelhas adultas também. Como tal, as funções da colmeia são interferidas a vários níveis (OIE 2021), havendo redução do alimento dentro da colónia (Martínez 2018).

Adicionalmente, diminui o número de enxames produzidos. Estima-se que uma colônia infestada morre em um a quatro anos, se não for tratada de forma sistemática (Rosenkranz et al. 2010; Noël et al. 2020).

Esta doença leva a consequências a nível sanitário, mas também a nível económico, com perdas de colônias e quebras nas produções de produtos apícolas (Rosenkranz et al. 2010).

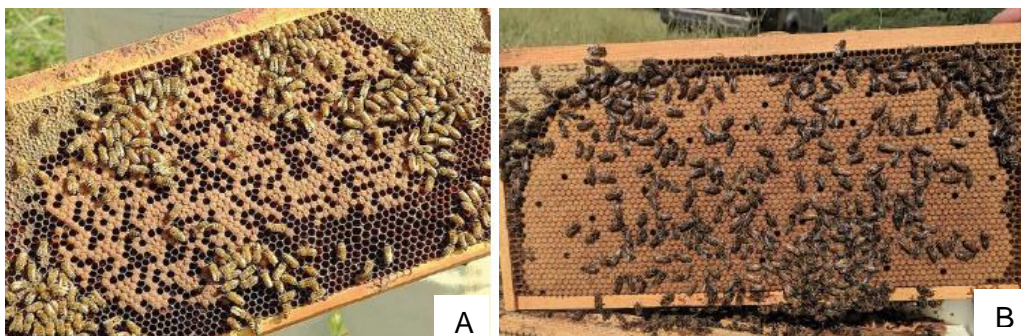
### **Sinais clínicos**

Os sinais mais comuns, ainda que não específicos da Varroose, são a presença de abelhas atrofiadas, a rastejar e desfiguradas, apresentando as asas deformadas e abdômens reduzidos, devido à interação com o DWV (Figura 6). É possível observar os ácaros a parasitar os indivíduos adultos e cadáveres de abelhas adultas à entrada da colmeia (Rosenkranz et al. 2010).



**Figura 6. Efeitos da infeção por DWV: asas curtas e deformadas. Fonte: Rosenkranz et al. (2010).**

A criação apresenta-se dispersa, com a cera dos alvéolos operculados perfurada, afundada ou mesmo ausente, a chamada "criação em mosaico" (Figura 7). Adicionalmente, é possível observar larvas mortas (Rosenkranz et al. 2010).



**Figura 7. "Criação em mosaico" (A) e criação com um padrão saudável (B). Fonte: Faux (2021).**

## **Controlo**

Até aos dias de hoje não foi encontrada uma solução eficaz e sustentável para o combate à *Varroa destructor*. Atualmente, são utilizados métodos farmacológicos e métodos biotécnicos (Rosenkranz et al. 2010).

Os fármacos utilizados podem ser sintéticos, ácidos orgânicos ou óleos essenciais. Os primeiros incluem o tau-fluvalinato, flumetrina e amitraz, e são económicos e de fácil aplicação. No entanto, podem deixar resíduos no mel e outros produtos apícolas e podem ser tóxicos para as abelhas. Além disso, têm vindo a surgir resistências a estes acaricidas. Os ácidos orgânicos, como o ácido oxálico, ácido láctico, ácido fórmico, e óleos essenciais, como o timol, cânfora e mentol deixam menos resíduos nos produtos apícolas e são menos suscetíveis a criar resistências. No entanto, os dois primeiros ácidos só são eficazes em períodos em que não há criação. O ácido fórmico é o único composto eficaz na fase reprodutiva e na fase forética (Rosenkranz et al. 2010).

Em Portugal, a DGAV recomenda não só a higienização e desinfeção dos materiais apícolas, substituição regular de ceras e rainhas, mas também a aplicação de “pelo menos dois tratamentos obrigatórios por ano em cada colónia, sendo que um tratamento poderá ser constituído por duas ou mais aplicações” com os medicamentos homologados aprovados (DGAV 2022a).

No que respeita aos métodos zootécnicos, a aplicação de quadros para criação exclusiva de zangãos e posterior remoção dos mesmos é bastante eficaz (Applegate e Petritz 2020), sendo que também se pode proceder à remoção completa da criação e aprisionamento da rainha durante o tratamento, de modo a eliminar o parasita da criação (Vilas-Boas 2008; Rosenkranz et al. 2010)

A apicultura em modo de produção biológico constitui uma situação excecional, na medida em que os únicos acaricidas permitidos são os ácidos orgânicos e os óleos essenciais, sendo que os métodos zootécnicos e seleção genética de linhagens resistentes também são permitidos (Vilas-Boas 2008).

Tendo em conta a relevância desta doença na atividade apícola existe muita investigação com o objetivo de encontrar métodos sustentáveis e eficazes de a combater. O controlo biológico através de fungos entomopatogénicos específicos de *Varroa* spp. apresenta resultados promissores em laboratório, embora em condições de campo não se demonstre bem sucedido. Além disso, selecionar populações de abelhas com mecanismos de defesa e tolerância a este ácaro parece ser a opção mais sustentável e eficaz a longo prazo, sendo atualmente alvo de muitos estudos (Noël et al. 2020).

## Diagnóstico

Para efetuar o diagnóstico correto deste ácaro é necessário conhecer a sua morfologia, de modo a estabelecer o diagnóstico diferencial com outros agentes, como o *Braula coeca* e o *Tropilaelaps* spp. (OIE 2021).

*V. destructor* apresenta acentuado dimorfismo sexual (Figura 8). A fêmea adulta apresenta um corpo achatado, elipsoidal, com a largura superior ao comprimento, com cerca de 1,1 mm em comprimento, 1,5 mm de largura e cerca de 0,5 mm em altura (OIE 2021). É, ainda, dotada de um escudo dorsal e vários ventrais, esclerotizados, patas curtas com estruturas especializadas para aderir ao hospedeiro e de coloração vermelha acastanhada. Por sua vez, o macho, de menor tamanho que a fêmea em todos os estados, tem forma de pêra, com patas mais longas e pouco esclerotizados (Rosenkranz et al. 2010) e de cor branca a amarela, tal como os estados ninfais (OIE 2021).

O diagnóstico da doença pode ser clínico, farmacológico ou laboratorial (Martínez 2018). No que respeita a este último, pode ser feito de forma barata e célere identificando morfologicamente o agente em amostras de abelhas adultas e favos a olho nu, com recurso a lupa ou ao microscópio ótico. Para fazer o diagnóstico na criação é preferível utilizar amostras de criação de zangão (Costa 2021; OIE 2021).



**Figura 8. Fêmea adulta em vista dorsal (A) e ventral (B); Macho adulto em vista dorsal (C). Fonte: A e B - IZSLT (2015); C- Rosenkranz et al. (2010).**

### 3.3.1.1.2. *Acarapis woodi*

Originalmente denominado *Tarsonemus woodi* por Rennie (1921), este ácaro pertence à família Tarsonemidae e é o agente causal da Acarapisose. O ácaro *A. woodi* foi identificado pela primeira vez na Grã-Bretanha, mas atualmente está disperso por todo o mundo, à exceção da Austrália. Apesar de ter causado uma grande taxa de mortalidade das colónias há cerca de cem anos, atualmente o seu impacto é muito reduzido nos países desenvolvidos. Os tratamentos usados para o combate a *V. destructor* têm também impacto neste ácaro, resultando na sua baixa prevalência (Martínez 2018).

O ácaro *A. woodi* é um parasita específico dos membros do género *Apis*, que invade o aparelho respiratório das abelhas adultas, e que penetra nas mesmas pelo primeiro par de

traqueias, por apresentarem um calibre de dimensões maiores. Podem ser visualizados em várias traqueias da abelha e, inclusive, nos sacos aéreos da cabeça, do tórax e abdómen. Medem cerca de 150 µm (OIE 2018a). Existe dimorfismo sexual, entre o macho e fêmea: o primeiro é mais pequeno, com o primeiro par de patas mais largas e apresenta três segmentos dorsais, enquanto a fêmea apresenta cinco. O ácaro apresenta aparelho bucal picador-sugador, utilizado para perfurar a traqueia e alcançar a hemolinfa do hospedeiro (Martínez 2018).

### **Ciclo de vida**

O ciclo biológico começa quando uma fêmea fecundada entra na traqueia da abelha, particularmente através do primeiro par de espiráculos, visto que a válvula deste não cerra completamente, e realiza a postura cerca de quatro a cinco dias depois. Larvas com apenas o primeiro par de patas desenvolvido eclodem dos ovos quatro dias após a postura. Estas larvas vão alimentar-se da hemolinfa do hospedeiro e convertem-se em deutoninfas com quatro pares de patas dez a onze dias após a eclosão, passando posteriormente a adultos. Os adultos tornam-se sexualmente maduros após seis dias (Martínez 2018). No total, o ciclo dura cerca de 11 a 12 dias para o macho e 13 a 16 dias para a fêmea. Existem cerca de duas a quatro vezes mais fêmeas que machos (OIE 2018a). A fecundação ocorre na traqueia da abelha e, após a mesma, a fêmea abandona o local e passa para outras abelhas. Por contacto, o processo recomeça.

O ciclo de vida deste agente patogénico é muito influenciado por fatores ambientais e bióticos, podendo ter uma fase de latência. O ácaro tem uma baixa taxa de multiplicação e, associado ao tempo de vida tendencialmente mais curto das abelhas no Verão, a doença acaba por regredir espontaneamente. Pelo contrário, no Inverno afeta muito mais a saúde da colónia, porque o tempo médio de vida do hospedeiro aumenta, apesar do parasita ter mais dificuldade em lidar com temperaturas mais baixas do que com o calor. Além disso, as abelhas passam mais tempo na colmeia nesta altura do ano, pelo que aumenta a transmissão entre as mesmas (Martínez 2018).

O ácaro *A. woodi* afeta todas as castas da colónia, com preferência pelos zangões (OIE 2018a), sendo que os elementos mais jovens são mais suscetíveis à infestação. São alimentadas por abelhas mais velhas, que transmitem o ácaro. Após os cinco dias de vida, diminui drasticamente a possibilidade de se infetarem. Esta resistência advém dos pelos que rodeiam os estigmas torácicos, que se tornam mais espessos e duros ao longo do tempo, fazendo efeito barreira à entrada do ácaro (Martínez 2018).

### **Fisiopatologia**

Os efeitos patogénicos deste agente dependem do número de parasitas no aparelho respiratório (OIE 2018a). A ocupação do lúmen traqueal pelo ácaro leva a obstrução física da passagem do ar e, conseqüentemente, da chegada do oxigénio aos diferentes tecidos,

especialmente músculos e sistema nervoso. Além disso, a ação perfuradora na traqueia permite a passagem de outros agentes, como bactérias e vírus, para a hemolinfa, e conduz à destruição dos tecidos musculares (Martínez 2018).

### **Sinais clínicos**

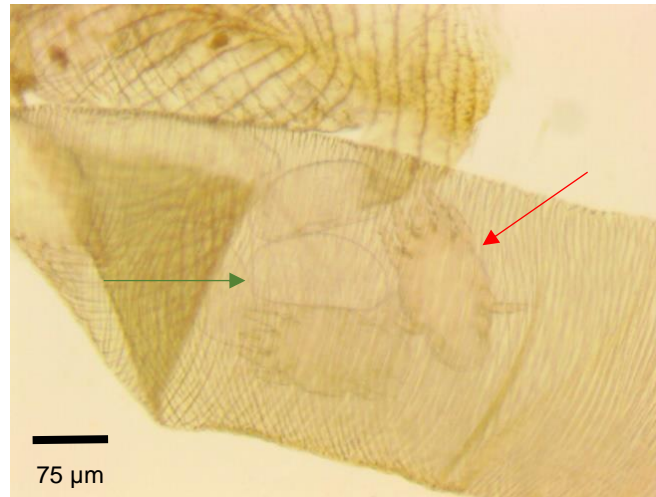
Em termos de sinais de doença, os mesmos são altamente inespecíficos e começam principalmente na Primavera, após o final do período de latência (Martínez 2018; OIE 2018a). A capacidade de voo das abelhas diminui bastante, devido à destruição da articulação das asas, e quando conseguem voar, fazem-no de modo lento. As asas surgem deslocadas, caídas e em posição anormal. Paralelamente, a entrada em circulação de bactérias e vírus que podem conduzir a septicémia e o consumo precoce de reservas corporais levam a repleção da ampola retal, dilatação abdominal e, conseqüentemente, disenteria (Martínez 2018). O rastejar em frente à colmeia é também um indicador que algo está a afetar a colónia (OIE 2018a).

### **Controlo**

Em relação ao tratamento, o alvo é o ácaro adulto, visto que os ovos e formas imaturas não reagem aos acaricidas. É muito importante ainda ter em conta o tipo de produtos utilizados, tendo em conta a biologia de *A. woodi*. Por ser um endoparasita da abelha, devem ser escolhidos acaricidas de ação sistémica ou que atuem por evaporação, pois os que atuam por contacto não chegam ao local onde o ácaro se aloja. Mesmo com os produtos adequados, é necessário escolher a altura certa para efetuar o tratamento da colónia, pois idealmente será quando a maior quantidade de indivíduos estiver dentro da colmeia e quando as temperaturas forem as ideais, visto que, no caso dos produtos que atuam por evaporação, as temperaturas elevadas levam a uma evaporação demasiado rápida e potencialmente prejudicial à colónia, e temperaturas demasiado baixas não promovem a evaporação (Martínez 2018).

### **Diagnóstico**

O diagnóstico pode ser clínico, embora seja difícil porque o quadro clínico é muito inespecífico. A melhor maneira de detetar o agente é através de diagnóstico laboratorial, através da observação das traqueias ao microscópio e deteção de adultos, ovos e formas imaturas no interior das vias respiratórias (Figura 9) (Martínez 2018). A ação dos ácaros promove o escurecimento das áreas traqueais afetadas, por deposição de crostas de melanina, para além do seu enfraquecimento (OIE 2018a).



**Figura 12. Ácaro *Acarapis woodi* adulto (seta vermelha) e ovo (seta verde) dentro do lúmen traqueal. Original.**

### **3.3.1.1.3. *Tropilaelaps* spp.**

Estes ácaros pertencem à classe Arachnida, subclasse Acari, superordem Parasitiformes, ordem Mesostigmata e família Laelapidae. Atualmente estão identificadas quatro espécies, duas que afetam *A. mellifera* – *Tropilaelaps clareae* e *Tropilaelaps mercedesae* – enquanto outras duas são inofensivas para a mesma – *Tropilaelaps thaii* e *Tropilaelaps koenigerum* (OIE 2018b).

As características morfológicas do ácaro variam consoante a espécie, no entanto o comprimento corporal ronda entre os 0,6 e 1 mm e o corpo é alongado, pelo que o comprimento é maior que a largura, em oposição a *Varroa* spp. (OIE 2018b). Os adultos apresentam uma cor vermelha-acastanhada, e os estados imaturos apresentam uma cor esbranquiçada (de Guzman et al. 2017).

#### **Distribuição geográfica**

O ácaro *Tropilaelaps* spp. é um agente etiológico de declaração obrigatória na União Europeia (Decisão da Comissão 2008/650/CE, de 30 de julho).

Neste momento, este parasita está restrito ao continente asiático e afeta as espécies de abelha locais, como *Apis dorsata breviligula*, *A. dorsata binghami* e *A. cerana*. Originalmente era um parasita exclusivo de *A. dorsata* (OIE 2018b). Neste capítulo abordamos o impacto deste parasita em *A. mellifera*.

#### **Ciclo de vida**

Este ácaro apresenta muitas semelhanças com *V. destructor*, a começar pelo seu ciclo de vida. A fêmea grávida invade o alvéolo que possua uma larva madura, com preferência pela criação de zangão, pouco tempo antes ser operculado. Cerca de 48 horas depois, começa a postura, sendo depositados entre um e quatro ovos, ao ritmo de um ovo por dia.

Um macho e várias fêmeas emergem em cerca de 12 horas e começam a alimentar-se da hemolinfa da larva. Dentro de uma semana, os ácaros passam por três estádios ninfais e atingem a idade adulta e, quando a abelha adulta abandona o opérculo, os parasitas procuram outro hospedeiro (de Guzman et al. 2017; OIE 2018b).

Uma das diferenças mais importantes entre o ciclo deste ácaro e o de *Varroa* spp. é o facto de aquele não conseguir alimentar-se da abelha adulta, uma vez que não tem a capacidade de perfurar a cutícula do inseto. Assim, a fase forética é muito curta, apesar de ser a principal forma de disseminação deste parasita (OIE 2018b). Além disso, a fêmea fundadora de *Tropilaelaps* spp. não necessita de se alimentar de hemolinfa larvar para iniciar a ovoposição (de Guzman et al. 2017). Por fim, devido à duração mais curta do seu ciclo de vida, a população de *Tropilaelaps* spp. aumenta muito mais rapidamente (OIE 2018b).

### **Fisiopatologia**

As abelhas que conseguem emergir das células apresentam um peso reduzido e deformações (Khongphinitbunjong et al. 2016; Ma et al. 2019), não só por ação do parasita, mas também devido ao vírus DWV, do qual *Tropilaelaps* spp. é um vetor biológico (Chantawannakul et al. 2018; OIE 2018b; Ma et al. 2019). Adicionalmente a estas deformações, existe uma diminuição do tempo médio de vida e a resposta imunitária fica bastante comprometida (Khongphinitbunjong et al. 2016; de Guzman et al. 2017; Pakwan et al. 2018). Segundo Pakwan et al. (2018), infestações mais graves aumentam a suscetibilidade à traça-da-cera.

Ao contrário de *A. cerana* e *A. dorsata*, que apresentam comportamentos de resistência a esta doença (Chantawannakul et al. 2018), *A. mellifera* é muito suscetível, pelo que uma forte infestação pode resultar em graves danos na colónia, não só pelos impactos diretos do ácaro, mas também pela potencial transmissão de vírus (OIE 2018b).

### **Sinais clínicos**

Os sinais clínicos apresentados pelos indivíduos e pela colónia são muitos semelhantes aos apresentados quando existe uma infestação por *Varroa* spp. Existe uma elevada taxa de mortalidade nas larvas afetadas, sendo que poucas abelhas emergem e, as que o fazem, apresentam-se deformadas (OIE 2018b). Observam-se abelhas adultas com abdómens distorcidos, asas encurtadas e membros deformados ou mesmo ausentes (Martínez 2018; OIE 2018b). Na criação, observa-se um padrão irregular, opérculos perfurados e morte de pupas e larvas (Chantawannakul et al. 2018; OIE 2018b).

### **Controlo**

Não se conhecem métodos de controlo específicos para este ectoparasita, no entanto os métodos aplicados para o controlo de *V. destructor* demonstram alguma eficácia, nomeadamente o recurso a acaricidas sintéticos, os ácidos orgânicos e óleos essenciais. As boas práticas de manejo e higiene apícolas são também bastante relevantes (de Guzman et

al. 2017). O facto de a fase forética ser muito curta neste parasita diminui a eficácia dos produtos utilizados na Varroose (Martínez 2018).

### **Diagnóstico**

No que concerne ao diagnóstico laboratorial deste ácaro, a técnica é muito semelhante à de diagnóstico da Varroose: identificação morfológica à lupa ou microscópio ótico (Figura 10). Também é possível efetuar o diagnóstico por técnicas moleculares, como a PCR, que permite identificar a espécie em questão (OIE 2018b).



**Figura 13. Ácaro *Tropilaelaps* spp. adulto em decúbito ventral. Original.**

### **3.3.1.2. Dípteros**

#### **3.3.1.2.1. *Braula coeca***

*Braula coeca* é o agente etiológico da ectoparasitose denominada Braulose. Pertence à ordem Diptera, subordem Cyclorrhapha e família Braulidae. Atualmente estão reconhecidas cinco espécies e duas subespécies de um mesmo género, diferenciadas pelos órgãos genitais, presença de um sexto segmento abdominal e número de dentes nos pentes podais (Martínez 2018). Os adultos têm até 1,5 mm de comprimento e são cobertos por pelos (Ellis e Nalen [data desconhecida]). Apesar de ser considerado um díptero, apresenta várias modificações face aos seus pares, nomeadamente a ausência de asas e presença de pentes de dentes finos nas extremidades podais, que lhe permitem fixar-se aos pelos torácicos das abelhas. Assim, foi-lhe atribuída a designação “piolho das abelhas”, embora não seja um piolho (Martínez 2018).

Está disperso por todo o mundo (Martínez 2018; Ellis e Nalen [data desconhecida]), ainda que esteja a desaparecer das colónias das abelhas do mel devido aos tratamentos sistemáticos contra *V. destructor* (Alfallah e Mirwan 2018; Martínez 2018).

No início do seu ciclo biológico, a fêmea ovovivípara deposita os ovos na face interna dos opérculos que cobrem as células cheias de mel ou nas suas paredes. Aqui dá-se o

desenvolvimento larvar, sendo que as larvas escavam túneis quando eclodem e se alimentam de mel e pólen. Depois dá-se a passagem a pupa e, já em adulto, fixa-se ao corpo da abelha adulta. Afeta todas as castas, no entanto, apresenta preferência pelas obreiras que alimentam as jovens larvas e pela rainha, pois esta apresenta uma alimentação mais rica em termos de qualidade e quantidade, e movimenta-se menos (Martínez 2018).

Sobre o tórax, provoca a regurgitação por parte da abelha com os pentes das suas extremidades e consegue alcançar o alimento da abelha com o seu aparelho do tipo sugador (Martínez 2018; Ellis e Nalen [data desconhecida]). Também se pode alimentar da secreção das glândulas hipofaríngeas – a geleia real (Martínez 2018).

O díptero *B. coeca* raramente provoca problemas numa colónia, à exceção de casos de grande infestação. As abelhas parasitadas podem apresentar sinais nervosos, sacudindo as patas para tentar retirar os parasitas, e, devido ao incómodo, a postura da rainha diminui (Martínez 2018). Por sua vez, os quadros com mel apresentam túneis construídos pelas larvas e é possível observar-se mel fermentado, o que resulta em perdas económicas (Martínez 2018; Ellis e Nalen [data desconhecida]).

O diagnóstico deste parasita (Figura 11) é feito através da observação e identificação morfológica de forma direta ou através da lupa ou microscópio ótico (Martínez 2018).



**Figura 11. *Braula coeca* em decúbito dorsal observado ao microscópio ótico. Original.**

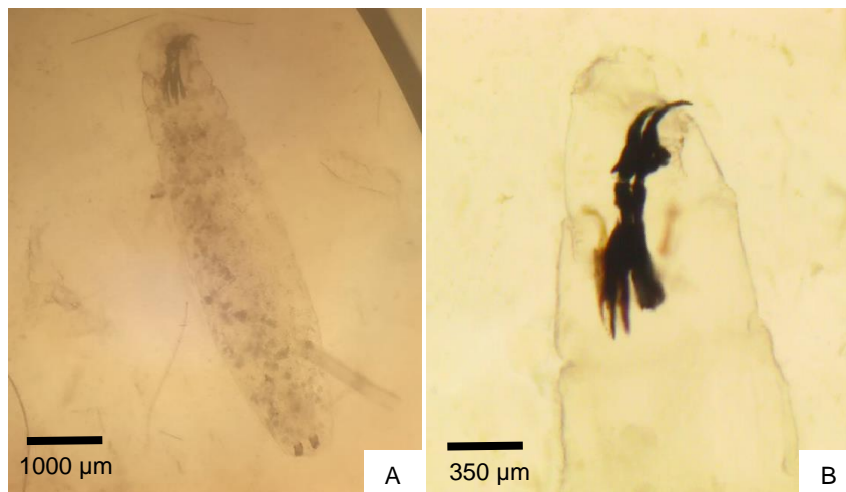
#### **3.3.1.2.2. *Senotainia tricuspis***

O inseto *Senotainia tricuspis* pertence à ordem Diptera e família Sarcophagidae sendo o agente causal da Apimíase nas abelhas adultas. Atualmente, está disperso pela zona mediterrânea da Europa e Norte de África, sendo particularmente prevalente nos meses de Verão e observáveis a voar perto das colmeias nas horas de maior exposição solar. Morfologicamente, os adultos apresentam manchas cinzentas triangulares no abdómen e uma faixa branca entre os olhos compostos, sendo critérios de distinção com a mosca doméstica (Haddad et al. 2015; Martínez 2018).

A fêmea, larvívora, ataca as abelhas forrageiras fora da colmeia, depositando uma larva de primeiro estado no tórax do hospedeiro. Esta penetra no corpo, desenvolve-se e alimenta-se de hemolinfa numa primeira instância. Posteriormente, alimenta-se dos músculos das asas, sendo que a obreira acaba por morrer cerca de dois a cinco dias após a infeção. A larva continua a desenvolver-se e, no terceiro estado migra para o abdómen para continuar a alimentar-se, de onde acaba por eclodir. Depois penetra no solo, onde evoluirá para pupa e, posteriormente, para inseto adulto cerca de 20 dias depois, no final da Primavera ou início do Verão (Haddad et al. 2015; Martínez 2018). Quando as larvas passam a pupa no final do Verão, normalmente sofrem uma diapausa até à próxima Primavera (Haddad et al. 2015).

Em termos de sinais clínicos, está descrito que as abelhas parasitadas não conseguem voar e apresentam asas deslocadas, podendo evidenciar também diarreia e tremores. A nível de colmeia, a atividade diminui (Martínez 2018). No entanto, normalmente este agente não afeta a colmeia de forma grave.

O diagnóstico é efetuado através de técnicas laboratoriais, observando-se a forma larvar, com cerca de 5 mm, quando se observa o material do tórax ao microscópio (Figura 12) ou quando se observa a forma adulta à lupa (Martínez 2018; Costa 2021).



**Figura 12. Larva de *Senotainia tricuspis* (A) e pormenor dos ganchos bocais do aparelho bucal (B). *Originais*.**

### **3.3.1.3. Coleópteros**

#### **3.3.1.3.1. *Aethina tumida***

O pequeno escaravelho da colmeia, *Aethina tumida*, é o agente etiológico da Aethinose (Martínez 2018). Pertencente à ordem Coleoptera e família Nitidulidae, é originário de África Subsariana. É um parasita das subespécies de abelhas africanas, no entanto, pode

também alimentar-se de fruta em decomposição, não sendo, assim, um parasita obrigatório (Neumann e Elzen 2004).

Inicialmente estava limitado ao continente africano, mas, em 1996, foi detetado nos Estados Unidos da América (EUA) e, posteriormente, na Austrália e Canadá em 2002 (Hood 2004; Martínez 2018). Em 2004, em Portugal, foram detetados larvas e ovos em rainhas importadas do Texas (EUA), mas as colmeias foram destruídas imediatamente (Silva 2014).

Em 2014 chegou a Itália, às regiões da Calábria e Sicília, onde continua até hoje (Mutinelli et al. 2014; Martínez 2018), sendo o único país europeu em que o coleóptero está presente. Até então era considerada uma doença exótica na União Europeia (Mutinelli et al. 2014), sendo atualmente uma doença de notificação obrigatória nesta comunidade (Decisão da Comissão 2008/650/CE, de 30 de julho). Já foi detetada também nas Filipinas, Coreia e, recentemente, na Colômbia (2020), Guatemala (2021) e Bolívia (2022) (WOAH c2020).

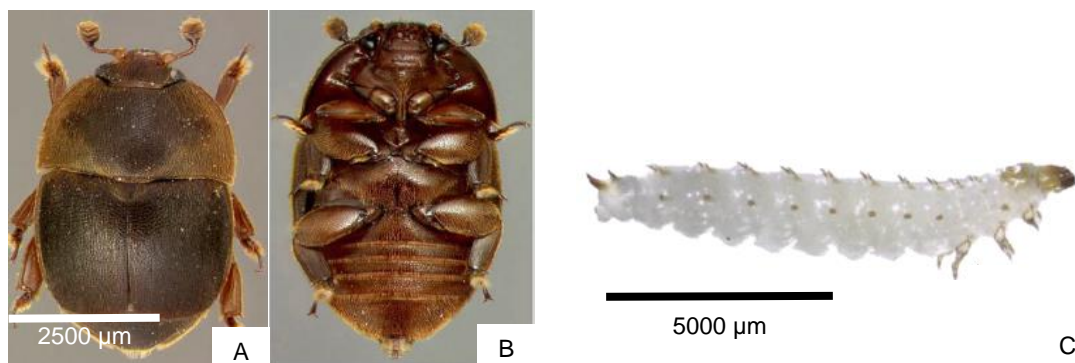
Este escaravelho passa por quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto (Martínez 2018). Os adultos têm cerca de 5 a 7 mm de comprimento e cerca de 3 mm de largura (OIE 2018c). As antenas são muito características da espécie, em forma de maço. As fêmeas são maiores que o macho (Martínez 2018; OIE 2018c). Esta espécie apresenta uma cor vermelho-escura a negra. O corpo é dividido em três partes, apresentando três pares de patas e dois élitros, que não cobrem todo o abdómen (Figura 13). As larvas apresentam cerca de 1 cm de comprimento, cor branca-nacarada, três pares de patas e duas fileiras de espinhos na face dorsal do corpo (Figura 12) (OIE 2018c).

O acasalamento dos adultos maduros ocorre dentro da colmeia e, passados seis a sete dias, a fêmea inicia a ovoposição em massas que podem chegar aos 2000 ovos (Hood 2004) em fendas da colmeia e na criação operculada (Ellis et al. 2004; Cuthbertson et al. 2013; OIE 2018c). Ao fim de um a seis dias, as larvas emergem (Martínez 2018). Durante as suas duas semanas de desenvolvimento, estas alimentam-se de mel, pólen e criação (Ellis 2005). Por fim, as larvas saem da colmeia, passam a pupas no solo, onde escavam túneis (Martínez 2018). Duas a doze semanas depois, emergem os adultos, que voam em busca de novos hospedeiros. O ciclo deste escaravelho é dependente da humidade e do tipo de solo (Ellis et al. 2004). A disseminação da doença pode ocorrer por voo do adulto, transumância de colmeias, comércio de produtos apícolas como rainhas, obreiras, e outro material e comércio de fruta e legumes. As próprias abelhas funcionam como agente de disseminação ao transportarem ovos e larvas no seu corpo. As colónias débeis são mais suscetíveis e, paralelamente, as colmeias com excesso de mel tornam-se apelativas (Martínez 2018).

Nas abelhas africanas o impacto desta espécie é negligenciável, no entanto, as abelhas europeias não apresentam mecanismos de resistência (Ellis et al. 2003). A fase larvar é o estadio mais prejudicial às abelhas, devido não só à sua alimentação, mas também devido à ação fermentativa das suas fezes no mel (Martínez 2018). Isto impede que o mel seja

consumido pelas abelhas e também a sua comercialização (Hood 2004). Estes danos podem acontecer dentro da colmeia ou já nas instalações de coleta de mel, se as condições ambientais o permitirem. Assim, este parasita causa elevadas perdas económicas (Martínez 2018). Adicionalmente, a presença dos adultos pode provocar a enxameação dos insetos (Ellis et al. 2003).

O diagnóstico definitivo deste coleóptero é feito em laboratório, através da identificação morfológica de exemplares de larvas e/ou adultos, sendo possível também recorrer a técnicas de biologia molecular (OIE 2018c).



**Figura 13. *Aethina tumida* adulto em decúbito ventral (A) e dorsal (B), e em fase larvar (C). Fonte: OIE (2018d).**

### 3.3.2. Fungos

#### 3.3.2.1. *Nosema* spp.

Os agentes do género *Nosema* spp. inserem-se no grupo dos microsporídeos, fungos formadores de esporos e são parasitas intracelulares obrigatórios de seres eucariotas (Galajda et al. 2021; Marín-García et al. 2022).

Atualmente são conhecidas três espécies associadas à infeção de abelhas do mel, designadamente *Nosema apis*, *N. ceranae* e *N. neumannii* (Galajda et al. 2021). No entanto, apenas as duas primeiras são reconhecidas como agente etiológico de nosebose, que pode ser de dois tipos: *N. apis* é responsável pela Nosebose tipo A e *N. ceranae* pela Nosebose tipo C (Applegate e Petritz 2020; Marín-García et al. 2022). Ambas as espécies invadem as células epiteliais da porção posterior do ventrículo da abelha adulta e as infeções mistas são comuns (OIE 2018d; Applegate e Petritz 2020).

#### **Distribuição**

Apesar de, originalmente, *N. ceranae* ser parasita de *A. ceranae* e *N. apis* de *A. mellifera*, *N. ceranae* afeta também as abelhas europeias. Atualmente, ambas as espécies de microsporídeos podem infetar *A. mellifera* e *A. ceranae* (OIE 2018d; Applegate e Petritz 2020; Galajda et al. 2021).

Assim, inicialmente, *N. apis* estava limitado ao continente Europeu e Americano e *N. ceranae* à Ásia. No entanto, o primeiro acabou por se disseminar devido, principalmente, à ação do Homem, tornando-se dominante (Grupe e Quandt 2020). Nos dias de hoje, a Nosemose está dispersa a nível global (OIE 2018d; Marín-García et al. 2022), mas existe indícios que *N. ceranae* apresenta maior prevalência e que terá substituído *N. apis* como espécie dominante em muitos países (Fries 2010; Grupe e Quandt 2020; Galajda et al. 2021).

### **Ciclo de vida**

Os esporos produzidos são a fase infetante, sendo a única forma do agente que sobrevive fora do hospedeiro. A infeção ocorre através da ingestão de esporos através da alimentação, da trofilaxia (trocas de alimento entre as abelhas através do aparelho bucal) e através dos hábitos de *grooming*. Os produtos da colmeia, como a cera, a geleia real e o mel, atuam como fomites (OIE 2018c; Galajda et al. 2021). As fezes ficam bastante mais adocicadas, pelo que, nos hábitos higiénicos de *A. mellifera*, existe ingestão e novas infeções (Galajda et al. 2021). No que respeita particularmente a *N. ceranae*, a transmissão vertical também está documentada, tendo-se detetado esporos nos ovários da rainha (Marín-García et al. 2022). Além disso, durante a atividade forrageira existe contaminação do pólen e água circundantes, espalhando a infeção (Grupe e Quandt 2020).

Más práticas durante a atividade apícola levam à perpetuação da infeção, nomeadamente através da ausência de desinfeção do material, a reutilização de ceras contaminadas e a troca de rainhas e junção de colónias com diferente estado sanitário (Galajda et al. 2021).

No ventrículo da abelha, emerge um filamento do esporo de *Nosema* spp. através do qual é injetado o esporoplasma na célula intestinal. Nesta existe replicação do agente e, posteriormente, existe produção de esporos, que serão libertados nas fezes. Estes, em vez de serem libertados nas fezes, podem infetar as células intestinais do mesmo hospedeiro (OIE 2018d). Durante o processo de infeção a parede ventricular fica destruída (Applegate e Petritz 2020).

### **Fisiopatologia**

Todas as castas da colmeia podem ser alvo desta infeção, sendo particularmente mais prevalente nas obreiras (Marín-García et al. 2022).

A Nosemose tipo A é considerada uma infeção oportunista, afetando as colónias enfraquecidas (Applegate e Petritz 2020; Marín-García et al. 2022). Além disso, em climas temperados apresenta um carácter sazonal, com baixa prevalência no Verão, um pequeno pico no Outono e um aumento da infeção durante o Inverno (Fries 1993; Martín-Hernández et al. 2012; Galajda et al. 2021). A infeção por *N. apis* pode não causar sinais clínicos ao início, no entanto o tempo de vida dos indivíduos fica bastante reduzido e a colónia enfraquecida (Galajda et al. 2021).

Na sua forma típica causa disenteria. Esta deve-se à má-absorção dos carboidratos e as abelhas defecam dentro da colmeia, em vez de o fazer no exterior. A função gastrointestinal fica afetada, levando a uma digestão incompleta (Galajda et al. 2021). A inflamação intestinal leva a uma má absorção de nutrientes, alterando o metabolismo dos lípidos e das proteínas (Applegate e Petritz 2020). A deficiência neste nutriente resulta em atrofia das glândulas hipofaríngeas e, conseqüentemente, na impossibilidade em alimentar as larvas e a rainha, a qual interrompe a postura. A infeção por esta espécie está comumente associada a infeção por três vírus: *black queen cell virus* (BQCV) (D'Alvise et al. 2019), *bee virus Y* (YV) e *filamentous virus* (FV). A combinação com o primeiro é particularmente mais debilitante. Nos primeiros dias de infeção, a rotura da parede intestinal permite a passagem de bactérias saprófitas para a hemolinfa do hospedeiro, que pode resultar em septicémia e morte (Galajda et al. 2021).

Em relação à Nosemose tipo C, existe alguma discordância entre os autores acerca da sua sazonalidade. Segundo Martín-Hernández et al. (2012), D'Alvise et al. (2019), Applegate e Petritz (2020) e Grupe e Quandt (2020), esta espécie não apresenta sazonalidade, sendo estável durante o ano. Mas Marín-García et al. (2022) afirmam que apresenta um padrão sazonal diretamente relacionado com as temperaturas mais elevadas. No que concerne aos sinais clínicos, é unânime entre estes autores que *N.ceranae* não provoca sinais clínicos na maioria dos casos. Esta espécie altera a fisiologia hormonal das obreiras, acelerando o seu amadurecimento. A nível metabólico, existe um stress energético devido às alterações nas reservas de nutrientes, e, conseqüentemente, dificuldade em voar e em orientar-se e atrofia das glândulas hipofaríngeas. O resultado destes efeitos é a supressão da imunidade humoral das abelhas, amadurecimento precoce e uma redução do tempo de vida das obreiras. A colmeia apresenta assim um menor número de obreiras, uma criação reduzida e uma menor produção de mel (Marín-García et al. 2022).

Um estudo realizado por Retschnig et al. (2017) concluiu que, para ambas as espécies deste microsporídeo, a carga de esporos é superior no Inverno e início de Primavera, devido ao confinamento dos indivíduos (devido a condições meteorológicas desfavoráveis) que aumenta a probabilidade de defecarem dentro da colmeia, em vez de executarem voos de higiene (OIE 2018d; Applegate e Petritz 2020; Marín-García et al. 2022).

A infeção por *N. ceranae* está correlacionada com o Síndrome de Colapso de Colmeias (Higes et al. 2008) e existe uma interação sinérgica entre a presença do fungo e a aplicação de pesticidas aumentando a mortalidade das abelhas (Marín-García et al. 2022).

### **Sinais clínicos**

Muitas vezes a Nosemose não leva ao aparecimento de sinais clínicos. No entanto, numa fase aguda da doença, o abdómen das abelhas fica dilatado e com tremores, com manchas castanhas de fezes presentes nos favos e paredes das colmeias (interiores e

exteriores) e com abelhas fracas, mortas ou doentes na proximidade da colmeia (OIE 2018d; Applegate e Petritz 2020; Galajda et al. 2021; Marín-García et al. 2022)

Segundo a OIE (2018c), infecção por *Nosema* spp. provoca uma mudança de cor no intestino das abelhas, inicialmente castanho, para branco, para além de o fragilizar.

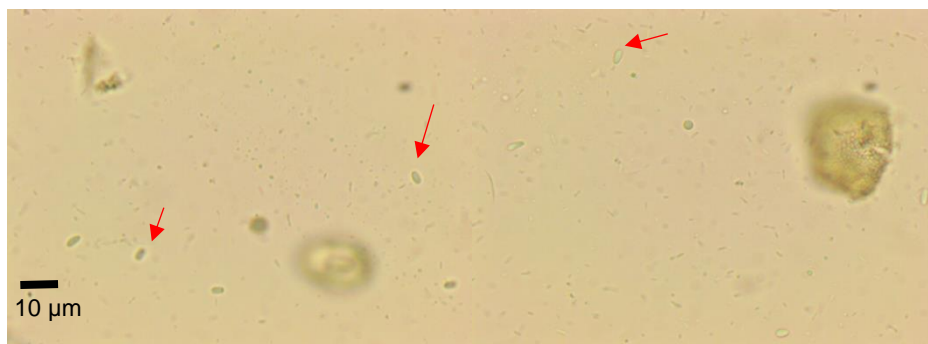
Quando a infecção se torna crónica, as colónias enfraquecem, com o número de indivíduos a diminuir e com tempo de vida reduzido (Galajda et al. 2021).

### **Controlo e tratamento**

Não existe atualmente um método totalmente eficaz e seguro para o combate e prevenção desta doença. O antibiótico fumagilina apresenta alguma eficácia contra *N. apis*, mas não para *N. ceranae*, para além de deixar resíduos nos produtos da colmeia (Burnham 2019). Por essa razão não é autorizado em vários países, como é o caso dos pertencentes à União Europeia (OIE 2018d; Applegate e Petritz 2020). A utilização de extratos de plantas, suplementação proteica com pólen e própolis e o recurso a prebióticos e probióticos apresentam resultados promissores, mas ainda são necessários mais estudos (Burnham 2019; Marín-García et al. 2022). A melhor maneira de prevenir é garantir a higiene e desinfeção das colmeias (Marín-García et al. 2022).

### **Diagnóstico**

O diagnóstico é feito através da observação ao microscópio ótico do conteúdo do abdómen das abelhas infetadas ou das suas fezes (Figura 14). O diagnóstico positivo é obtido quando se observam os esporos ovais, sem conteúdo, com cerca de 5-7 x 3-4 µm, sendo que os de *N. apis* apresentam dimensões ligeiramente maiores em comparação com *N. ceranae* (OIE 2018d). No entanto, estas espécies não são distinguíveis entre si ao microscópio ótico, sendo a técnica molecular PCR a metodologia de eleição para alcançar um diagnóstico definitivo.



**Figura 14. Esporos (setas vermelhas) de *Nosema* spp. Original.**

### 3.4. Contexto legislativo / sanitário português

O combate às doenças apícolas em Portugal assenta em dois grandes pilares: vigilância passiva e vigilância ativa. A primeira é assegurada pelos apicultores que declaram situações clínicas que considerem suspeitas. A segunda, por sua vez, inclui diferentes entidades, nomeadamente as organizações de apicultores e as entidades gestoras de zonas controladas, responsáveis por aplicar planos sanitários que considerem necessários; e a DGAV. A esta, enquanto autoridade sanitária, compete o desenvolvimento anual do Plano Sanitário Apícola (PSA) e de ações de informação, divulgação e formação dos participantes na área da apicultura (Artigo nº10 Decreto-Lei nº203/2005, de 25 de novembro).

O PSA tem como objetivos o desenho de medidas de sanidade veterinária para combater doenças do efetivo apícola e o estabelecimento de requisitos que os integrantes das zonas controladas devem obedecer. Este plano inclui normas gerais aplicadas aos apicultores nacionais, e normas que se aplicam apenas àqueles que estão estabelecidos nas zonas controladas (DGAV 2022a), entre elas a obrigação de enviar amostras para diagnóstico de doenças (Decreto-Lei nº203/2005, de 25 novembro).

Segundo o Decreto-Lei nº203/2005, de 25 novembro, são consideradas doenças de declaração obrigatória em Portugal: Loque americana; Loque europeia; Acarapiose; Varroose; Aethinose por *Aethina tumida*; Tropilaelaps por *Tropilaelaps* spp; Ascosferiose (apenas em zonas controladas) e Nosemose (apenas em zonas controladas).

Para além das 19 zonas controladas, existem zonas não controladas e zonas indemnes (DGAV 2022a). Em setembro de 2019, no Comité Permanente da Comissão Europeia, os Estados Membros aprovaram, por unanimidade, a atribuição do estatuto oficialmente indemne de Varroose às ilhas de São Miguel, Santa Maria, Terceira, Graciosa, São Jorge e Corvo, pertencentes à Região Autónoma dos Açores (Decisão de Execução (UE) nº2019/1895 da Comissão).

O PSA estabelece três grandes planos sanitários: o Plano Integrado de Controlo Oficial de Apiários (PICOA), o Plano de Luta contra a Varroose e o Plano de Emergência contra *Aethina tumida*.

O PICOA tem por objetivos garantir a vigilância das doenças de declaração obrigatória e das doenças exóticas como a Aethinose e Tropilaelapose, garantido a saúde animal, mas também controla a utilização e posse de medicamentos veterinários e a segurança alimentar do mel. Para isto, procede a colheita de amostras de abelhas e favos para análise de cerca de 150 apiários, 30 por cada uma das Direções de Serviços de Veterinária e Alimentação (DSAVR), escolhidos com base em determinados critérios. Assim, para além de assegurar a sanidade apícola, garante também a salubridade do mel que chega ao consumidor (DGAV 2022b).

O Plano de Luta contra a Varroose abrange as medidas que devem ser aplicadas para o combate ao agente etiológico desta doença, incluindo não só medidas de manejo, mas também a lista de medicamentos homologados aprovados pela DGAV. A Varroose é a única doença apícola para qual estão aprovados medicamentos para serem utilizados nas colmeias. Tendo em conta das condições climáticas portuguesas, devem ser feitos, pelo menos, dois tratamentos obrigatórios por ano (DSPA 2022).

O coleóptero *Aethina tumida*, apesar de não estar presente em Portugal atualmente, é um agente patogénico com impactos catastróficos nas colónias e que já está estabelecido num país europeu, a Itália, pelo que foi desenvolvido um plano de atuação em caso de diagnóstico ou suspeita da mesma. Este plano faz a descrição da doença, estabelece critérios de suspeita e de diagnóstico, ações a tomar em caso de suspeita e em caso de confirmação de doença – incineração do apiário em causa e delimitação de zonas de proteção (DESA and DSPA 2016).

## **Parte II – Rastreo de agentes patogénicos presentes na população adulta da espécie *Apis mellifera* no efetivo apícola nacional**

### **4. Objetivos do estudo**

1. Determinar a prevalência dos principais agentes patogénicos que afetam os indivíduos adultos de *Apis mellifera* no efetivo nacional, tendo por base a distribuição nacional, regional e sazonal da amostra em estudo;
2. Análise da tipologia de infeção presente (simples e mista) e o seu possível impacto na sanidade da colónia.
3. Avaliar o impacto da pandemia da Covid-19 no envio de amostras para diagnóstico laboratorial.

### **5. Materiais e métodos**

#### **5.1. Contexto geográfico e apícola de Portugal**

##### **5.1.1. Clima e flora portuguesa**

Localizado no extremo Sudoeste da Europa Continental, Portugal Continental ocupa cerca de 89 000 km<sup>2</sup>. Além deste território, o país inclui o Arquipélago dos Açores, com 2300 km<sup>2</sup>, e o Arquipélago da Madeira, com 801,5 km<sup>2</sup>, ambos localizados no Oceano Atlântico (INE 2021). Segundo o Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA c2023a), o clima de Portugal continental é do tipo temperado, variando com zonas com Inverno chuvosos e Verão seco e quente (Csa) e zonas com Inverno chuvoso e Verão seco e pouco quente (Csb) (Anexo 1). À semelhança do continente, o Arquipélago da Madeira apresenta um clima temperado com Verão quente e seco, enquanto que nos Açores é possível ver variações consoante os grupos: no Grupo Oriental o clima é do tipo temperado com Verão seco e suave, enquanto que os Grupos Ocidental e Central são do tipo oceânico (temperado húmido com Verão temperado) (IPMA c2023b).

A localização dos apiários influencia as características dos produtos da colmeia, nomeadamente do mel (FNAP 2017). A Carta de Uso e Ocupação Do Solo em Portugal Continental de 2018 indica que, em 2018, 51% do território continental português estava ocupado com floresta e matos e 26% estava afeto à agricultura (Observatório do Ordenamento do Território e Urbanismo 2020). Assim sendo, uma grande parte do nosso país está ocupado com flora, desde árvores de fruto a arbustos, passando também por espécies florestais, todos eles cruciais para a sobrevivência das colónias das abelhas. Aliando isto à variação de altitude, clima e relevo ao longo do território, constatamos que Portugal apresenta uma grande riqueza e diversidade de flora melífera. Por exemplo, enquanto nas baixas altitudes, o rosmaninho (*Lavandula stoechas*) é das espécies mais características, nas regiões

montanhosas predomina o castanheiro (*Castanea sativa*), sendo que no litoral do país prevalece o eucalipto (*Eucalyptus globulus*) e no Alentejo o girassol (*Helianthus annuus*) ganha particular relevância. Em cada região, plantas como o cardo (*Carlina racemosa*), o poejo (*Mentha pulegium*) e o alecrim (*Rosmarinus officinalis*) assumem também um papel importante. Esta biodiversidade, aliada às diferentes épocas de floração ao longo do ano, permite uma grande variedade de méis mono e multiflorais ao longo do país, com diferentes propriedades nutricionais e sensoriais (Florestas 2020) (Anexo 2). Três dos méis monoflorais mais característicos são o mel de rosmaninho (*Lavandula stoechas*), mel de urze (*Erica umbellata*) e mel de castanheiro (*Castanea sativa*) (FNAP 2017).

### **5.1.2. Setor apícola português**

O setor apícola português tem vindo a crescer e a organizar-se na última década, apesar de ainda ter espaço para melhorar a sua dinâmica e cooperação entre produtores (GPP 2019). A partir de 2019, tem-se vindo a observar uma queda no número de apiários, bem como de colmeias (Anexos 3 e 4) (IFAP 2022).

Em Portugal, segundo dados de 2018, estão registados 11 883 apicultores, verificando-se um aumento de 12,7% face ao ano de 2015. Estes distribuem-se de forma irregular pelo país, concentrando-se, segundo os limites estabelecidos pelas NUTs, nas regiões Norte e Centro (GPP 2019). Segundo dados da DGAV de 2018, os apicultores portugueses são maioritariamente de pequena dimensão, sendo que 88% são não-profissionais (efetivo inferior a 150 colmeias). A média nacional é de 68 colmeias por apicultor (GPP 2019).

Observamos, assim, uma reduzida taxa de profissionalização do setor, cerca de 12%. No entanto, dados de 2015 da DGAV, indicam que neste ano a taxa de apicultores profissionais era de 10%, pelo que no espaço de três anos houve uma alteração na dinâmica do setor (GPP 2016).

Segundo os últimos dados das declarações de existências, existiam 43 926 apiários e 721 867 colmeias em 2021 (IFAP 2022). Apesar de ter havido um aumento de cerca de 3,9% e 19,6%, respetivamente, face ao ano de 2018, desde 2019 tem havido uma diminuição nos valores destes parâmetros, tendência que ainda se observa em 2022, em que existem em território português 42 865 apiários e 691 323 colmeias (Anexos 3, 4 e 6). A região Centro é a que tem maior proporção de apiários, embora a região Norte tenha maior percentagem de colmeias (Anexos 5 e 6).

#### **Região Norte**

A região Norte inclui os distritos de Braga, Bragança, Porto, Viana do Castelo, Guarda, Aveiro e Viseu, sendo que estes três últimos são partilhados com a região Centro, que inclui a maior parte destes distritos.

Em 2018, estavam registados na região Norte 3 798 apicultores, sendo que menos de 20% deles são profissionais. À data, existiam 11 entidades coletivas e apenas estava reconhecida pela autoridade competente uma organização de produtores do mel (GPP 2019; Costa 2021). Em 2021, a região englobava 11 780 apiários, 251 242 colmeias e 254 705 colónias, tornando-se a região com maior número de colónias e colmeias (Anexo 5). Os números de 2022 confirmam que esse fenómeno se mantém, estando declarados 11 631 apiários, 236 733 colmeias e 240 160 colónias (Anexo 6) (IFAP 2022).

### **Região Centro**

A região Centro é constituída pelos distritos de Castelo Branco, Coimbra, Leiria, Santarém, Guarda, Viseu e Aveiro, sendo estes três últimos partilhados com a região Norte do país. Santarém é também partilhado com o Alentejo.

Na região Centro do país estava estabelecido um efetivo de 13 501 apiários, constituídos por 185 012 colmeias e 190 266 colónias em 2021 (Anexo 5). Em 2022, na última delcaração de existências foram registados 13 160 apiários, 182 012 colmeias e 187 671 colónias (Anexo 6) (IFAP 2022). É a região do país com maior concentração de apiários (Anexo 6) e onde está registado o maior número de apicultores, nomeadamente, 4 062, sendo que apenas uma pequena percentagem é considerado profissional. No que concerne à organização do setor, existem cerca de 18 entidades coletivas, sendo que está reconhecida pela autoridade competente um organização de produtores para a produção do mel. É a zona onde o associativismo é mais marcado (GPP 2019).

### **Região Área Metropolitana de Lisboa**

Esta região integra o distrito de Lisboa e a parte norte do distrito de Setúbal.

Em 2018, existiam 1 246 apicultores registados na Área Metropolitana de Lisboa, um número que tem vindo a aumentar consecutivamente desde 2015. A maioria deles são considerados não profissionais, registando-se cerca de 51,2 colmeias por apicultor (GPP 2019). Na mais recente declaração de existência de atividade apícola, em setembro de 2022, registaram-se 720 apiários, 10 811 colmeias e 11 092 colónias, uma diminuição face ao ano de 2021, em que foram registados 826 apiários, 12 384 colmeias e 12 728 colónias (Anexos 5 e 6).

### **Região Alentejo**

O Alentejo abrange os distritos de Beja, Évora, Portalegre, Setúbal e Santarém, estes últimos partilhados com outra regiões.

Na região alentejana, encontramos 1 381 apicultores registados e este valor tem vindo a crescer desde 2015, à semelhança da Área Metropolitana de Lisboa. É a segunda região de Portugal Continental com o maior número de colmeias por apicultor. Cerca de 20% dos trabalhadores deste setor aqui sedeados possuem mais de 150 colmeias (GPP 2019). Segundo dados de 2022, cerca de 18% do efetivo nacional de apiários tem sede neste

território, estando registados 7 801. Além disso, houve a declarar 148 230 colmeias e 149 934 colónias. À semelhança de outras regiões do país, houve uma diminuição face a 2021, em que foram declarados 7 908 apiários, 152 549 colmeias e 149 934 colónias (Anexo 5 e 6).

### **Região Algarve**

A NUTII mais a sul de Portugal Continental, o Algarve, inclui um único distrito, Faro.

Na região algarvia, há a registar a existência de duas associações de apicultores. Tratando-se da zona do país com maior percentagem de apicultores profissionais registados (quase 40%), é aqui que se regista o maior número de colmeias por apicultor (GPP 2019). Atualmente, existem 8 013 apiários, a albergar um total de 95 094 colmeias e 95 966 colónias, cerca de 13% do efetivo nacional. Em 2021 o efetivo era maior, a mencionar 8 331 apiários, 103 525 colmeias e 104 544 colónias (Anexos 5 e 6) (IFAP 2022).

### **Região Autónoma dos Açores**

O Arquipélago dos Açores é constituído por nove ilhas: Santa Maria, São Miguel (Grupo Oriental); Terceira, Graciosa, São Jorge, Pico, Faial (Grupo Central); Flores e Corvo (Grupo Ocidental).

Neste arquipélago estão instalados 830 apiários e um total de 7 325 colmeias. Esta é a região do país com o menor número de colmeias (Anexo 6) (IFAP 2022) e com menor taxa de profissionalização dos apicultores (GPP 2019). Em 2021 os dados eram muito semelhantes, com 903 apiários, 7 535 colmeias e 7 819 colónias (Anexo 5) (IFAP 2022).

### **Região Autónoma da Madeira**

O Arquipélago da Madeira inclui as ilhas da Madeira, de Porto Santo, as Selvagens e as Desertas, sendo que apenas as duas primeiras são habitadas.

Este arquipélago é a região do país com o menor número de apiários declarados, num total de 710, albergando um total de 10 149 colmeias e 10 623 colónias. Foi a única região do país a registar um aumento no efetivo relativamente a 2021, em que estavam registados 677 apiários, 9 620 colmeias e 10 099 colónias (Anexos 5 e 6) (IFAP 2022). Simultaneamente, é também a região onde operam menos apicultores, num total de 213 (GPP 2019).

## **5.2. Caracterização das amostras**

Neste estudo foram utilizados dados recolhidos durante o estágio curricular, que decorreu no Posto Apícola entre os meses de janeiro e junho de 2022, referentes às amostras de abelhas adultas provenientes do efetivo apícola nacional recebidas e analisadas durante o período referido. Adicionalmente, foram também avaliados neste trabalho os dados retrospectivos referentes às amostras recebidas e processadas entre os anos de 2018 e 2021 no mesmo laboratório.

A informação recolhida de cada uma das amostras referentes aos anos de 2021 e 2022 foi: o número da análise, mês de colheita da amostra, mês de entrada no sistema do laboratório, NUT III de origem e agentes diagnosticados.

Para o estudo da distribuição das análises e para o cálculo das prevalências dos agentes foram apenas tidas em conta as análises que apresentavam informação em relação à região, mês e ano em que foram colhidas, o mês de entrada no sistema do laboratório, o diagnóstico, e que não tenham sido dadas como prejudicadas. Independentemente do mês e ano de entrada no sistema laboratorial, as análises foram enquadradas tendo em conta o mês e ano de colheita.

Para o estudo do número de análises recebidas no laboratório por ano no período decorrido entre 2018 e o primeiro semestre de 2022 foram incluídas todas as amostras que incluíam abelhas adultas e que eram acompanhadas por informação relativa ao mês e ano em que entraram no sistema do laboratório, a partir da qual foram organizadas.

As amostras eram enviadas pela DGAV, no âmbito do PICOA, associações de apicultores, pertencentes ou não a zonas controladas; e apicultores individuais, profissionais ou não. Por uma questão de proteção de dados, todas as informações pessoais dos apicultores foram ocultadas e mantidas em anonimato.

### **5.3. Metodologia da colheita**

O serviço de Patologia Apícola desenvolveu diretrizes de colheita de amostras de duas tipologias – abelhas adultas e favos de criação – disponibilizadas às entidades que pretendam enviar amostras para análise, tendo como base os métodos recomendados pela OIE (2018d). Atendendo ao facto deste trabalho se focar em doenças de abelhas adultas, a metodologia aplicada aos favos de criação não será mencionada.

Assim, foram recolhidas entre 50 e 70 abelhas de cada colónia, vivas ou mortas recentemente, sendo que se fossem recolhidas no solo tal deveria ser mencionado. As abelhas eram recolhidas para a mesma embalagem, à exceção de haver suspeita de doenças nas colónias, cujas amostras seriam enviadas num recipiente à parte com o respetivo registo da suspeita.

Cada amostra é referente a um apiário, sendo que o número de colónias alvo de amostragem depende do número de colónias na exploração (Tabela 2), sendo preferencial recolher de colónias que se encontrem no centro ou na periferia do mesmo.

É fulcral que as abelhas não sejam enviadas em sacos de plástico, nem que sejam acompanhadas de mel, açúcar ou favos com mel, pois estes compostos podem prejudicar a viabilidade da amostra.

**Tabela 2. Número de colónias a amostrar consoante o tamanho do apiário (INIAV).**

<b>Número de colónias no apiário</b>	<b>Colónias a amostrar</b>
1 a 5 colónias	2
6 a 10 colónias	5
11 a 20 colónias	6
21 a 60 colónias	9
61 a 100 colónias	10

Cada amostra do mesmo apiário era acompanhada pelo mesmo número de análise e por uma folha de registo que continha informações como, por exemplo, o número da análise, a data de recolha da amostra e a entidade remetente. Este registo acompanhava a amostra desde o momento de entrada no sistema laboratorial até a análise estar concluída. Em conjunto com este documento existia uma folha onde eram registadas as observações durante a análise (Anexo 7).

#### **5.4. Conservação**

Idealmente as amostras deveriam ser enviadas para o laboratório após a colheita, mas, nos casos em que tal não é possível, as amostras foram refrigeradas a  $5\pm 3$  °C, num período máximo de 72 horas. Quando o período de tempo foi superior, as mesmas foram congeladas. As amostras eram enviadas para o laboratório através de transporte rodoviário.

#### **5.5. Técnicas de processamento para diagnóstico laboratorial**

Para diagnosticar os diferentes agentes patogénicos foram aplicadas técnicas específicas a amostras de abelhas adultas.

##### **5.5.1. Pesquisa de artrópodes**

###### **5.5.1.1. Diagnóstico de *V. destructor*, *Tropilaelaps* spp., *B. coeca* e *A. tumida***

O diagnóstico destes artrópodes foi feito através do seguinte processo:

1. Esvaziamento da embalagem para a superfície da bancada e separação dos indivíduos, aguardando uns minutos para promover a descongelação à temperatura ambiente e facilitar a queda dos parasitas;
2. Pesquisa de exemplares a olho nu, com recurso à lupa em caso de necessidade.

No caso de *Tropilaelaps* spp. é importante observar com atenção os detritos que acompanham as abelhas, pois o ácaro pode estar livre. Em relação ao coleóptero *A.tumida*, efetuou-se a pesquisa das formas larvares e adultas.

### 5.5.1.2. Diagnóstico de *A. woodi* e *S. tricuspis*

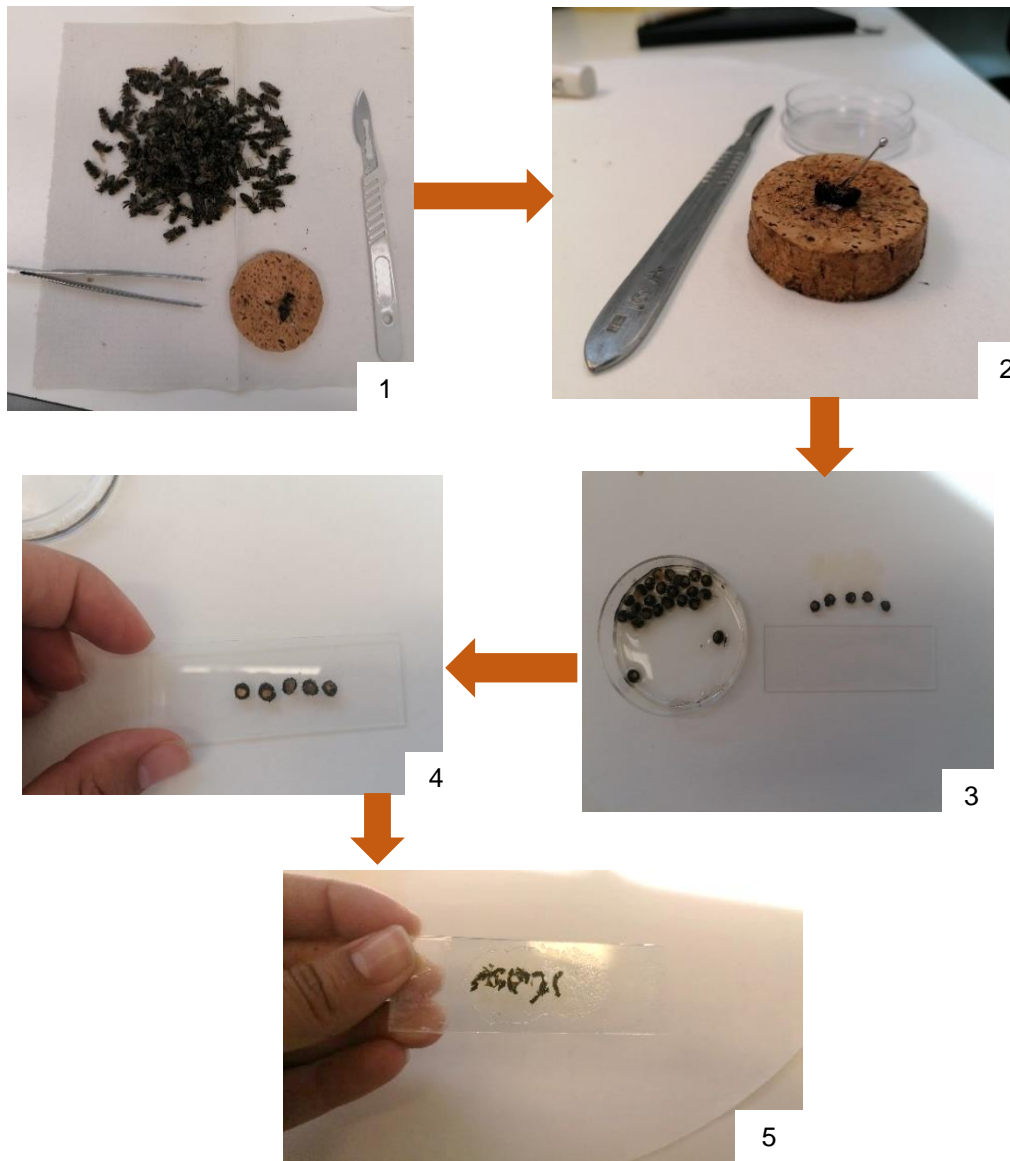
Tendo como objetivo o diagnóstico ao microscópio ótico, as abelhas adultas foram submetidas aos seguintes passos (Figura 15):

1. Seleção de cerca de 30 obreiras;
2. Fixação do corpo do inseto a uma base de cortiça, em decúbito dorsal, com o recurso a um alfinete, e, com uma lâmina de bisturi, procedeu-se à separação da cabeça e do primeiro par de patas, seguida do corte transversal de uma porção do tórax, de modo a incluir o primeiro par de traqueias e músculo;
3. Imersão das 30 fatias de tórax em 5mL de ácido láctico a 90% numa placa de Petri de plástico de cerca de 6 cm de diâmetro, durante 24 horas. No final, remoção dos cortes das placas de Petri e colocação sobre papel absorvente durante, no mínimo, 5 minutos, para retirar o excesso de ácido;
4. Montagem de 5 segmentos, em linha, entre duas lâminas;
5. Esmagamento da preparação dos mesmos e fixação dos bordos laterais das lâminas com fita-cola.

As preparações foram depois observadas ao microscópio ótico com uma ocular de x10 e objetiva x4 (perfazendo uma ampliação de x40), ou com uma ocular de x10 e uma objetiva de x10 (perfazendo uma ampliação de x100), analisando a totalidade da lâmina.

O diagnóstico positivo do ácaro *A. woodi* decorreu da identificação do ácaro, na sua forma adulta e/ou imatura, e/ou dos seus ovos. A melanização das traqueias pode ser um sinal da presença anterior deste parasita, no entanto não constitui critério para o diagnóstico definitivo.

No que concerne ao diagnóstico de *S. tricuspis*, previamente ao seccionamento dos segmentos do tórax, foi efetuada a observação macroscópica das abelhas adultas para pesquisar a presença da larva da mosca, visto que a mesma pode ser visível ao olho nu caso esteja exteriorizada. Além disso, a segmentação do tórax foi feita de forma a incluir mais massa muscular, para aumentar a possibilidade de encontrar larvas. Estas apresentam uns ganchos escuros muito característicos no aparelho bucal.



**Figura 15. Montagem de preparações para diagnóstico de *A. woodi* e *S. tricuspis*. Originais.**

A numeração das imagens remete para a numeração apresentada no texto.

## 5.5.2. Pesquisa de fungos

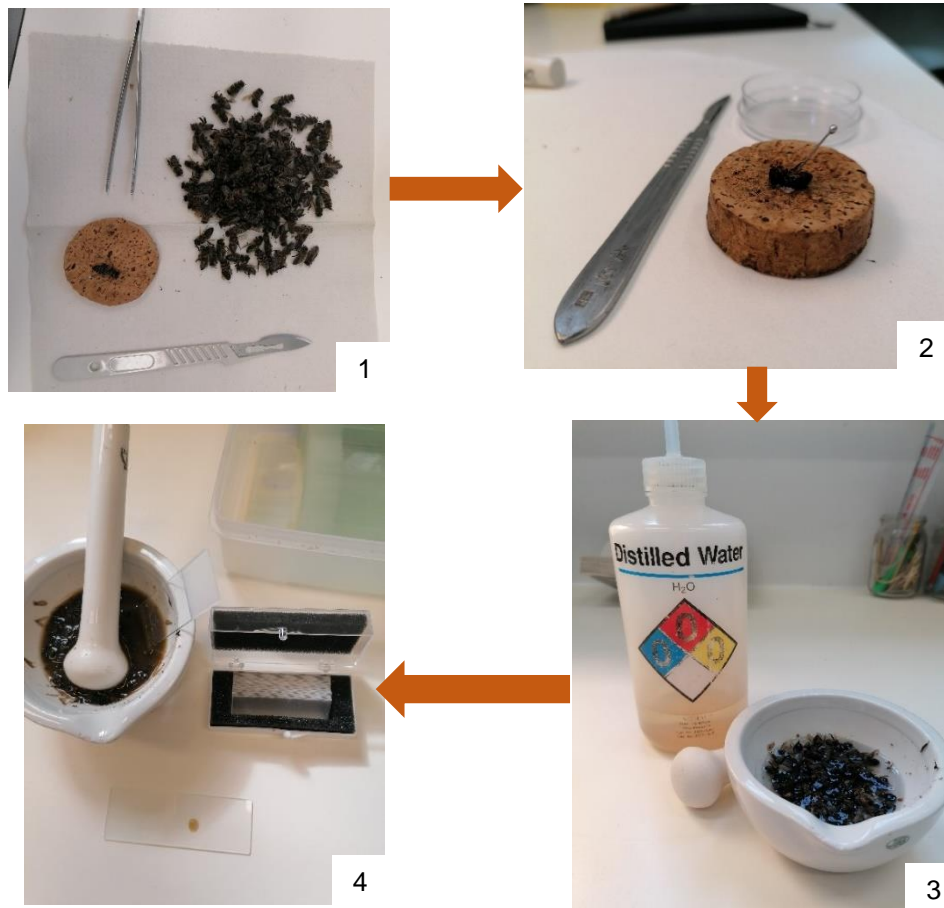
### 5.5.2.1. Diagnóstico de *Nosema* spp.

Para o diagnóstico de *Nosema* spp. ao microscópio ótico é necessário preparar a amostra para fazer a observação (Figura 16):

1. Seleção de cerca de 30 obreiras;
2. Fixação do corpo do inseto a uma base de cortiça, em decúbito dorsal, com o recurso a um alfinete, e remoção do abdómen com recurso a uma lâmina de bisturi;
3. Maceração, com o recurso a um almofariz, dos abdômens em 10mL de água destilada à temperatura ambiente, deixando repousar durante 5 minutos.

- Colocação de uma gota de sobrenadante entre lâmina e lamela. Repetição deste passo, de modo a obter duas lâminas por maceração.

As lâminas foram observadas com uma ocular de x10 e uma objetiva de x40 (perfazendo uma ampliação de x400). Foi considerado como resultado positivo quando foi possível observar os esporos do agente, não sendo possível morfologicamente distinguir a espécie.



**Figura 16. Montagem de preparações para diagnóstico de *Nosema* spp. Originais.**

A numeração das imagens remete para a numeração apresentada no texto.

## 5.6. Análise estatística

Todos os dados recolhidos para a execução deste trabalho foram introduzidos em ficheiros do programa Microsoft Excel 365. As prevalências foram calculadas com recurso ao programa SPSS 25 e os intervalos de confiança a 95% foram calculados na ferramenta *Epitools*.

### **Cálculo da prevalência de cada agente a nível nacional**

A prevalência de cada agente a nível nacional num determinado ano foi calculada através da fórmula:

$$\frac{N^{\circ} \text{ amostras positivas ao agente nesse ano}}{N^{\circ} \text{ total de amostras a nível nacional nesse ano}} \times 100$$

### **Cálculo da prevalência a nível regional**

A prevalência de cada agente a nível regional num determinado ano foi calculada através da fórmula:

$$\frac{N^{\circ} \text{ amostras positivas ao agente nessa região}}{N^{\circ} \text{ total de amostras nessa região}} \times 100$$

Esta fórmula foi aplicada para cada região para os anos de 2021 e 2022.

### **Cálculo da prevalência sazonal**

A distribuição das análises pela estação do ano em que foi colhida foi efetuada com base nas estações do ano meteorológicas, em que o Inverno engloba os meses de dezembro, janeiro e fevereiro; a Primavera inclui os meses de março, abril e maio; o Verão engloba os meses de junho, julho e agosto; e o Outono inclui os meses de setembro, outubro e novembro (NOAA 2021 Mar).

A prevalência de cada agente a nível regional num determinado ano foi calculada através da fórmula:

$$\frac{N^{\circ} \text{ amostras positivas ao agente nessa estação do ano}}{N^{\circ} \text{ total de amostras nessa estação do ano}} \times 100$$

Esta fórmula foi aplicada para cada estação do ano para os anos de 2021 e 2022.

### **Análise do tipo de infeção e proporção dos mesmos**

Numa primeira fase, procedeu-se à contagem do número de infeções simples (apenas um agente patogénico diagnosticado) e do número de infeções compostas (dois ou mais agentes diagnosticados), e calculou-se a proporção de cada um com a seguinte fórmula:

$$\frac{N^{\circ} \text{ infeções simples/compostas}}{N^{\circ} \text{ total de amostras positivas}} \times 100$$

De seguida, procedeu-se à contagem discriminada de cada tipo de infeção composta existente e calculou-se a sua proporção face ao número total de infeções compostas.

## 6. Resultados

### 6.1. Estudo das análises do ano de 2021 e 2022

#### 6.1.1. Distribuição das análises por ano e região

Das amostras coletadas em 2021, 493 análises corresponderam aos critérios. A região mais representada foi o Centro, correspondendo a 48,68% (240/493) das amostras, seguida do Alentejo com 143 análises. A região Norte contou com 47 amostras, Lisboa e Vale do Tejo com 26 e o Algarve com 29. No que concerne às regiões autónomas, apenas o Arquipélago dos Açores está representado, com 8 amostras, provenientes das ilhas de São Miguel, Terceira, São Jorge e Graciosa.

No que concerne a 2022, 226 análises foram alvo de estudo. À semelhança do ano anterior, a região Centro foi a zona com maior representação, com 67,26% das amostras (152/226), enquanto as regiões autónomas dos Açores e Madeira e Lisboa e Vale do Tejo não tiveram qualquer amostra. A região Norte foi representada por 69 amostras, o Alentejo por 4 e o Algarve com 1 amostra.

Na Tabela 3 está a proporção de apiários submetidos a este estudo, a nível regional e nacional.

**Tabela 3. Proporção de apiários em estudo, por região e por ano.**

	<b>2021</b>	<b>2022</b>
<b>Norte</b>	0,40% (47/11780)	0,59% (69/11631)
<b>Centro</b>	1,78% (240/13501)	1,16% (152/13160)
<b>Lisboa e Vale do Tejo</b>	3,15% (26/826)	-
<b>Alentejo</b>	1,81% (143/7908)	0,05% (4/7801)
<b>Algarve</b>	0,35% (29/8331)	0,01% (1/8013)
<b>RA Açores</b>	0,89% (8/903)	-
<b>Total Nacional</b>	1,12% (493/43926)	0,53% (226/42865)

No que concerne às amostras de 2021, 25 foram colhidas no Inverno, 164 na Primavera, 129 no Verão e 175 no Outono. Em 2022, no Inverno foram colhidas apenas 7 amostras, 190 na Primavera e 29 no Verão. A distribuição das amostras por mês encontra-se no Tabela 4. É relevante reforçar que, em relação a este ano, apenas estão em estudo as análises que deram entrada no sistema laboratorial no primeiro semestre.

**Tabela 4. Distribuição das amostras por mês e por ano.**

Distribuição das amostras				
	2021		2022	
	N	%	N	%
<b>Janeiro</b>	0	0,00%	3	1,33%
<b>Fevereiro</b>	5	1,01%	4	1,77%
<b>Março</b>	49	9,94%	33	14,60%
<b>Abril</b>	51	10,34%	26	11,50%
<b>Mai</b>	64	12,98%	131	57,96%
<b>Junho</b>	47	9,53%	29	12,83%
<b>Julho</b>	72	14,60%	-	-
<b>Agosto</b>	10	2,03%	-	-
<b>Setembro</b>	11	2,23%	-	-
<b>Outubro</b>	111	22,52%	-	-
<b>Novembro</b>	53	10,75%	-	-
<b>Dezembro</b>	20	4,06%	-	-
<b>Total</b>	493	100,00%	226	100,00%

### **6.1.2. Resultados da pesquisa de agentes patogénicos**

Cada agente patogénico será abordado individualmente e será calculada a sua prevalência regional, sazonal e nacional na amostra em estudo.

Todos os agentes patogénicos em estudo foram detetados em, pelo menos, um dos anos em análise, à exceção do ácaro *Tropilaelaps* spp., que permanece sem ser diagnosticado em Portugal até aos dias de hoje, e do coleóptero *Aethina tumida*.

#### **6.1.2.1. Prevalência nacional, regional e sazonal de *V. destructor***

A prevalência nacional de *V. destructor* em 2021 foi 35,29% (174/493 | IC95%: 31,20-39,61%), enquanto em 2022 foi 23,89% (54/226 | IC 95%:18,80-29,86%) (Tabela 5).

Em 2021, 54,60% (95/174) dos diagnósticos positivos de *V. destructor* corresponderam a infeções simples, enquanto 45,40% (79/174) corresponderam a infeções mistas. Em 2022, estes valores passaram para 83,33% (45/54) e 16,67% (9/54), respetivamente.

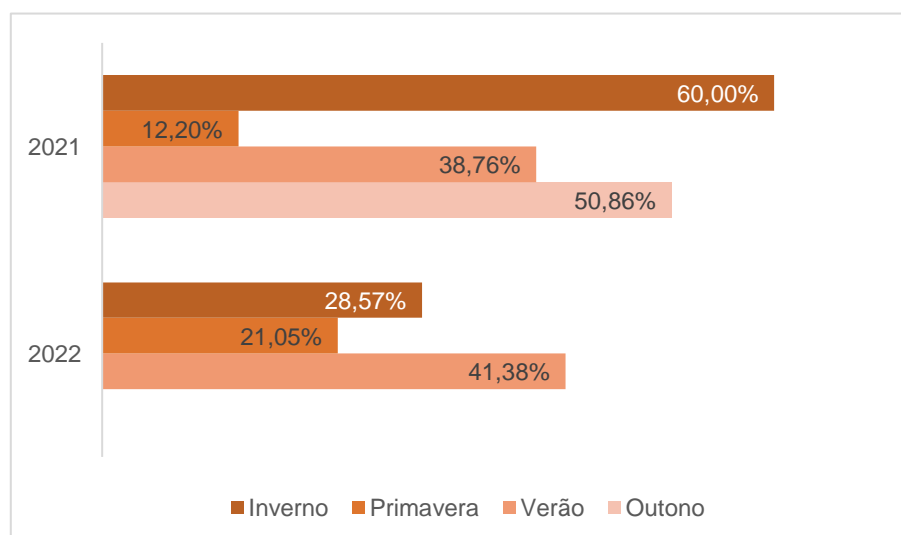
**Tabela 5. Prevalência de *V. destructor* por região e ano.**

		Norte	Centro	Lisboa e Vale do Tejo	Alentejo	Algarve	RA Açores
2021	Prevalência	48,94% (23/47)	18,33% (44/240)	65,38% (17/26)	51,05% (73/143)	58,62% (17/29)	0,00% (0/8)
	IC 95%	35,28- 57,79%	13,95- 23,71%	46,22-80,59%	42,94- 59,11%	40,74- 74,49%	
2022	Prevalência	23,19% (16/69)	23,68% (36/152)	-	25,00% (1/4)	100,00% (1/1)	-
	IC 95%	14,81%- 34,40%	17,63- 31,04%	-	4,56- 69,94%	20,65- 100,00%	-

Em 2021, a prevalência no Inverno foi de 60,00% (15/25 | IC95%: 40,74-76,60%), na Primavera foi 12,20% (20/164 | IC95%: 8,03-18,09%), 38,76% (50/129 | IC95%: 30,79-47,38%) no Verão e 50,86% (89/175 | IC95%: 43,51-58,17%) (Gráfico 1).

Em 2022, a prevalência no Inverno foi de 28,57% (2/7 | IC95%: 8,22-64,11%), na Primavera foi 21,05% (40/190 | IC95%: 15,86-27,39%) e 41,38% (12/29 | IC95%: 25,51-59,26%) no Verão (Gráfico 1).

**Gráfico 1. Prevalência sazonal de *V. destructor* por ano.**



#### **6.1.2.2. Prevalência nacional, regional e sazonal de *A. woodi***

A prevalência de *A. woodi* a nível nacional em 2021 foi 0,41% (2/493 | IC95%:0,11-1,47%). Um dos casos positivos correspondeu a uma infeção simples, enquanto o outro foi considerado uma infeção composta (50,00% - 1/2).

Nesse mesmo ano, a prevalência no Inverno foi de 4,00% (1/25 | IC95%:0,71-19,54%), na Primavera foi 0,61% (1/164 | IC95%: 0,11-3,37%) e 0,57% (1/175 | IC95%: 0,10-3,17%) no Outono. Não foram detetados casos positivos no Verão.

Nas regiões continentais não foram detetados casos positivos de infeção por *A. woodi*, à exceção do Alentejo, com 1 caso positivo em 143 análises (0,70% | IC95%: 0,12%-3,85%). A Região Autónoma dos Açores apresentou uma prevalência de 25,00% (2/8 | IC95%: 7,15-59,07% ).

No ano de 2022 não foram diagnosticados casos de infeção por *A. woodi*.

#### **6.1.2.3. Prevalência nacional, regional e sazonal de *B. coeca***

A prevalência de *B. coeca* a nível nacional em 2021 foi 1,01% (5/493 | IC95%: 0,43-2,35%). Todos os casos diagnosticados corresponderam a infeções mistas (100% - 5/5).

Nesse mesmo ano, a prevalência no Inverno foi de 4,00% (1/25 | IC95%:0,71-19,54%) e na Primavera foi 2,44% (4/164 | IC95%: 0,95-6,10%), não tendo sido detetados casos positivos nas restantes estações do ano.

A nível regional, nenhuma região em Portugal Continental registou casos positivos deste agente patogénico. A Região Autónoma dos Açores apresentou uma prevalência de 62,50% (5/8 | IC95%: 30,57-86,32%).

Em 2022 não foram diagnosticados casos positivos de infeção por *Braula coeca*.

#### **6.1.2.4. Prevalência nacional, regional e sazonal de *S.tricuspis***

A prevalência nacional de *S. tricuspis* em 2021 foi 21,30% (105/493 | IC95%: 17,91-25,13%), sendo que no ano seguinte foi 11,06% (25/226 | IC95%: 7,61-15,82%) (Tabela 6).

Em 2021, 35,24% (37/105) das infeções foram simples e 64,76% (68/105) foram compostas. Em 2022, os valores passaram para 60,00% (15/25) e 40,00% (10/25), respetivamente (Tabela 6).

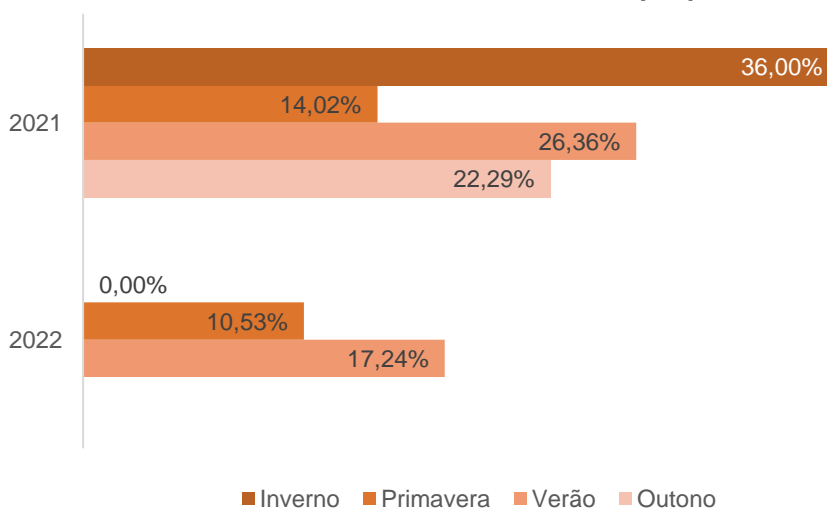
**Tabela 6. Prevalência de *S. tricuspis* por região e ano.**

		Norte	Centro	Lisboa e Vale do Tejo	Alentejo	Algarve	RA Açores
2021	Prevalência	19,15% (9/47)	13,33% (32/240)	26,92% (7/26)	22,38% (32/143)	58,62% (17/29)	100,00% (8/8)
	IC 95%	10,42-32,54%	9,61-18,22%	13,70-46,08%	16,32-29,88%	40,74-74,49%	67,56-100,00%
2022	Prevalência	4,35% (3/69)	14,47% (22/152)	-	0,00% (0/4)	0,00% (0/1)	-
	IC 95%	1,49-12,02%	9,76-20,94%	-	-	-	-

Em 2021, a prevalência no Inverno foi de 36,00% (9/25 | IC95%: 20,25-55,48%), na Primavera foi 14,02% (23/164 | IC95%: 9,53-20,17%), 26,36% (34/129 | IC95%: 19,52-34,56%) no Verão, e 22,29% (39/175 | IC95%:16,75-29,01%) no Outono (Gráfico 2).

No ano de 2022, a prevalência na Primavera foi 10,53% (20/190 | IC95%: 6,92-15,70%) e 17,24% (5/29 | IC95%: 7,60-34,55%) no Verão. Não foram diagnosticados casos no Inverno (Gráfico 2).

**Gráfico 2. Prevalência sazonal de *S. tricuspis* por ano.**



### 6.1.2.5. Prevalência nacional, regional e sazonal de *Nosema* spp.

A prevalência de *Nosema* spp. a nível nacional em 2021 foi 26,98% (133/493 | IC95%: 23,25%-31,06%), sendo que em 2022 foi 25,22% (57/226 | IC95%: 20,01-31,27%) (Tabela 7).

Em 2021, 64,66% (86/133) dos diagnósticos positivos de *Nosema* spp. corresponderam a infeções simples, enquanto 35,34% (47/133) corresponderam a infeções mistas. Em 2022, estes valores passaram para 77,19% (44/57) e 22,81% (13/57), respetivamente (Tabela 7).

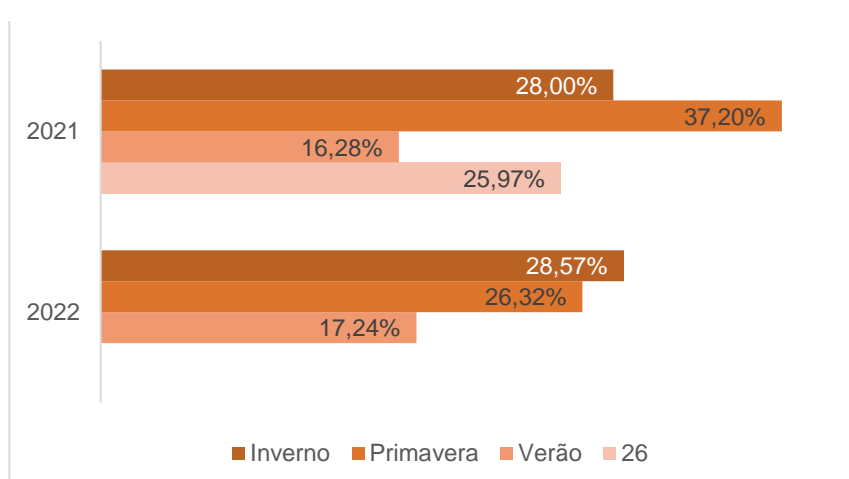
**Tabela 7. Prevalência de *Nosema* spp. por região e ano.**

		Norte	Centro	Lisboa e Vale do Tejo	Alentejo	Algarve	RA Açores
2021	Prevalência	38,30% (18/47)	31,67% (76/240)	19,23% (5/26)	14,69% (21/143)	27,59% (8/29)	62,50% (5/8)
	IC 95%	25,79- 52,57%	26,11- 37,80%	8,51-37,88%	9,81- 21,41%	14,70- 45,72%	30,57- 86,32%
2022	Prevalência	42,03% (29/69)	17,76% (27/152)	-	0,00% (0/4)	100,00% (1/1)	-
	IC 95%	31,11- 53,79%	12,50- 24,61%	-	-	20,65- 100,00%	-

No ano de 2021, a prevalência no Inverno foi de 28,00% (7/25 | IC95%: 14,28-47,58%), na Primavera foi 37,20% (61/164 | IC95%: 30,17-44,81%), 16,28% (21/129 | IC95%: 10,90-23,61%) no Verão, e 25,97% (47/181 | IC95%: 20,13-32,81%) no Outono (Gráfico 3).

Em 2022, a prevalência no Inverno foi de 28,57% (2/7 | IC95%:8,22-64,11%), na Primavera foi 26,32% (50/190 | IC95%:20,57-33,00%) e 17,24% (5/29 | IC95%:7,60-34,55%) no Verão (Gráfico 3).

**Gráfico 3. Prevalência sazonal de *Nosema* spp. por ano.**



### 6.1.3. Tipologias de infecção e proporção das mesmas

Em 2021, 69,52% (219/315) das amostras positivas foram consideradas infecções simples e 30,58% (96/315) infecções compostas. Do total das amostras analisadas, 178 amostras não apresentaram qualquer tipo de agente patogénico diagnosticado. Na Tabela 8 estão discriminados os tipos de infecção composta, em 2021.

**Tabela 8. Proporção do tipo de infecção composta, em 2021**

	N	%
<b><i>Varroa+Senotainia</i></b>	47	48,96%
<b><i>Varroa+Nosema</i></b>	28	29,17%
<b><i>Nosema+Senotainia</i></b>	12	12,50%
<b><i>Varroa+Senotainia+Nosema</i></b>	4	4,17%
<b><i>Nosema+Senotainia+Braula</i></b>	2	2,08%
<b><i>Braula+Senotainia</i></b>	2	2,08%
<b><i>Acarapis+Braula+Nosema+Senotainia</i></b>	1	1,04%
<b>Total</b>	96	100,00%

Em 2022, 86,67% (104/120) das amostras positivas foram consideradas infecções simples e 13,33% (16/120) infecções compostas. 106 amostras não apresentaram qualquer tipo de agente patogénico diagnosticado. A Tabela 9 estão discriminados os tipos de infecção composta, em 2021.

**Tabela 9. Proporção do tipo de infecção composta, em 2022.**

	N	%
<b><i>Varroa+Nosema</i></b>	6	37,50%
<b><i>Varroa+Senotainia</i></b>	3	18,75%
<b><i>Nosema+Senotainia</i></b>	7	43,75%
<b>Total</b>	16	100,00%

Na Tabela 10 encontram-se sintetizados os valores das proporções de infecções mistas e simples por agente etiológico, já mencionadas no respetivo capítulo.

**Tabela 10. Síntese das proporções de infecções simples e compostas, por agente etiológico e por ano.**

	2021		2022	
	Infeção simples	Infeção composta	Infeção simples	Infeção composta
<i>Varroa destructor</i>	54,59%	45,41%	83,33%	16,67%
<i>Acarapis woodi</i>	50,00%	50,00%	-	-
<i>Nosema spp.</i>	64,66%	35,34%	77,19%	22,81%
<i>Braula coeca</i>	0,00%	100,00%	-	-
<i>Senotainia tricuspis</i>	35,24%	64,76%	60,00%	40,00%

## 6.2. Número de análises por ano

A distribuição e evolução do número de amostras recebidas pelo laboratório entre o início do ano de 2018 e junho de 2022 está exposta na Tabela 11 e Gráfico 4.

A diferença entre o número de amostras enviadas para análise no laboratório nos anos de 2018 e 2019 é -0,84%. Por sua vez, em comparação com 2019, 2020 apresentou uma diminuição de 60,10% no número de amostras recebidas. No ano de 2021, houve um ligeiro aumento de 14,88% face ao ano anterior.

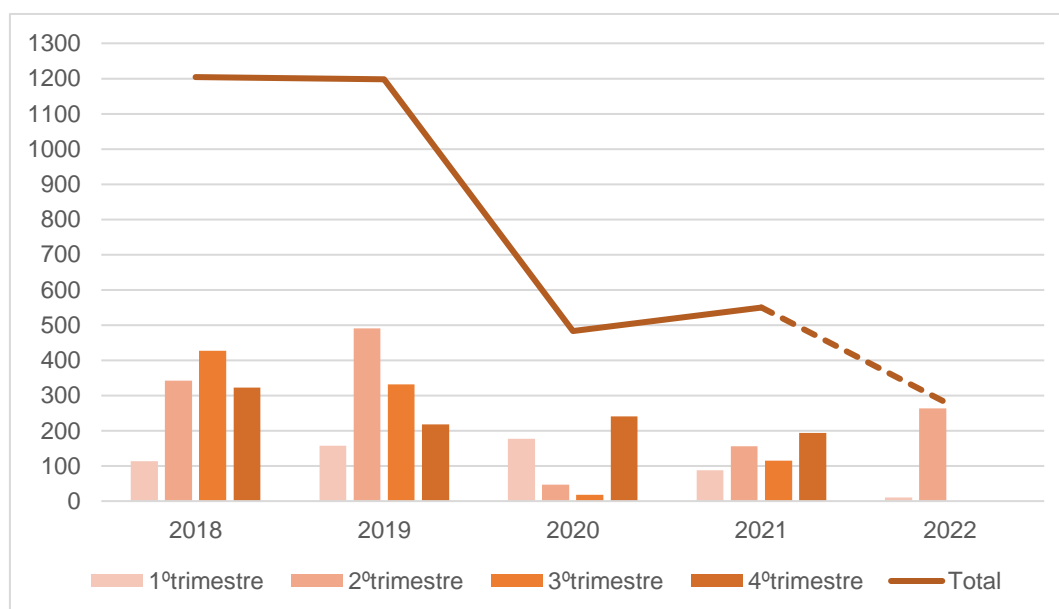
Os primeiros três meses dos anos 2018, 2019 e 2020 apresentaram valores semelhantes, sendo que, na entrada do segundo trimestre de 2020 apresentou uma quebra de 90,44% face ao mesmo período do ano anterior. O terceiro trimestre foi marcado, também, por um reduzido número de amostras, enquanto o quarto demonstrou um novo aumento. Assim, 2020 apresentou uma dinâmica diferente, ou até contrária, dos anos anteriores.

Por sua vez, o ano de 2022 enquadrou-se nos moldes dos primeiros anos, sendo que os primeiros três meses do ano de 2022 foram marcados por um reduzido envio de amostras, seguido de um aumento significativo no segundo trimestre.

**Tabela 11. Distribuição do número de amostras recebidas no laboratório de 2018 a 2022.**

Ano	Número de amostras de abelhas adultas				Total
	1ºtrimestre	2ºtrimestre	3ºtrimestre	4ºtrimestre	
<b>2018</b>	113	342	427	322	1204
<b>2019</b>	158	490	331	218	1197
<b>2020</b>	177	47	18	241	483
<b>2021</b>	87	155	115	193	550
<b>2022</b>	11	263	-	-	274

**Gráfico 4. Distribuição do número de amostras recebidas no laboratório de 2018 a 2022.**



## 7. Discussão

### 7.1. Prevalências dos agentes patogénicos em estudo em 2021 e 2022

#### Proporção de apiários estudados em 2021 e 2022

No que concerne ao ano de 2021, foram analisados apenas 1,12% dos apiários nacionais. Esta tendência também se verificou a nível regional, sendo que Lisboa e Vale do Tejo foi a região em que se verificou uma maior proporção de apiários submetidos a análises e o Algarve a que se destacou pelo motivo contrário. Nos primeiros seis meses do ano de 2022, foram enviadas para o laboratório amostras de 0,53% dos apiários em Portugal. Contrariamente ao ano anterior, neste período, Lisboa e Vale do Tejo e a Região Autónoma dos Açores não foram representadas, sendo a região Centro a região onde uma maior percentagem de explorações apícolas foram avaliadas. As regiões alentejana e algarvia salientam-se pela representação de apenas quatro e uma amostras, respetivamente, um número que não permite uma avaliação fidedigna do panorama sanitário nestas regiões. A Região Autónoma da Madeira não foi representada por nenhuma amostra nos dois anos em estudo.

A Região Autónoma dos Açores é uma região com características diferentes das outras. É constituída por nove ilhas, que não partilham do mesmo estatuto sanitário. Enquanto São Miguel, Santa Maria, Terceira, Graciosa, São Jorge e Corvo são consideradas livres do ácaro *V. destructor* (Decisão de Execução (UE) 23 n<sup>o</sup>2019/1895 da Comissão), Faial, Pico e Flores continuam infestadas por este parasita (Pinto et al. 2019). Neste estudo, estas últimas

três ilhas não são representadas devido a ausência de amostras, pelo que os dados obtidos relativamente a esta região não espelharam a realidade açoriana.

A análise dos primeiros seis meses de 2022 não pretende substituir a avaliação do ano inteiro, permite apenas fazer uma análise preliminar que, em conjunto com os dados de 2021, nos dará, não só, um retrato atual do panorama sanitário em Portugal, mas também uma antevisão do que o futuro trará.

A baixa proporção de apiários avaliados e a ausência de amostras provenientes de certas regiões dificulta a compreensão do estado sanitário das colmeias em Portugal. Não só ficam por analisar uma elevada percentagem de colmeias e colónias, como a reduzida amostragem leva a que as prevalências dos agentes patogénicos sejam subestimadas, não permitindo extrapolar, com confiança, para o universo do efetivo apícola português.

### **Dados da prevalência de agentes patogénicos**

À data da escrita desta dissertação de mestrado não existia nenhum trabalho publicado a descrever as prevalências dos agentes patogénicos abordados neste estudo a integrar todas as regiões do país. Os únicos trabalhos existentes a abordar este tema são dissertações de mestrado que incidem nas regiões Norte e Centro, da autoria de Costa (2021), ou a abordar apiários individuais na região Centro, como nos trabalhos de Jesus (2020) e de Silva (2021). Assim, o presente trabalho é uma ferramenta para aprofundar o conhecimento do estatuto sanitário apícola português no seu todo.

Todos os agentes patogénicos em estudo foram identificados em, pelo menos, um dos anos, à exceção do ácaro *Tropilaelaps* spp. e do coleóptero *A. tumida*.

A discussão de cada um dos agentes será feita em detalhe em seguida, sendo que para cada um deles é feita uma reflexão acerca dos fatores que influenciam a sua dinâmica com *Apis mellifera*. No entanto, existem dois fatores que são comuns a todos os agentes patogénicos: a nutrição da colónia e o manejo apícola. Uma nutrição adequada da colónia passa por um aporte de pólen e néctar em quantidade e qualidade, de modo a garantir a saúde de todos os elementos da colónia e garantir a imunidade individual e de grupo (DeGrandi-Hoffman e Chen 2015; Dolezal e Toth 2018; Tsuruda et al. 2021). O manejo apícola é um fator preponderante na saúde das colónias, uma vez que as boas práticas permitem a prevenção e/ou combate aos agentes patogénicos mais comuns na abelha, enquanto um manejo deficiente pode conduzir a um combate insuficiente das doenças, bem como a sua disseminação (Jesus 2020; DSPA 2022).

### 7.1.1. *Varroa destructor*

*V. destructor* constitui o maior desafio sanitário de *A. mellifera* a nível global (Rosenkranz et al. 2010; Traynor et al. 2020; OIE 2021), sendo que Portugal não é exceção. Desde 2010 que as prevalências anuais nacionais estão estáveis, rondando entre os 27% e os 45%. Dados recolhidos pela DGAV indicam que em 2019, 2020 e 2021, a prevalência nacional deste agente foi, respetivamente, 44%, 37% e 45% (DSPA 2022).

O cálculo da prevalência deste ácaro neste estudo, quer a nível nacional, regional ou sazonal, será subestimado em virtude de ser, principalmente, um parasita da criação. Foram objeto de análise apenas amostras de abelhas adultas, pelo que em muitos casos de infestação, este ácaro ficou por diagnosticar. A reprodução deste ácaro ocorre na criação operculada e só no fim do seu desenvolvimento é que existirão ácaros a parasitar as abelhas adultas.

Outro fator que pode influenciar o diagnóstico deste agente patogénico é o processo de recolha de abelhas adultas para análise, visto que as obreiras não são parasitadas da mesma forma dentro da colmeia. Segundo Del Piccolo et al. (2010) (citado em Cervo et al. (2014)), o ácaro *Varroa* sp. apresenta preferência para parasitar abelhas-ama quando sai do alvéolo, sendo que deteta estas obreiras através de sinais químicos por elas emitidos. Esta escolha favorece o ciclo deste parasita, pois as abelhas nesta fase visitam muito mais a criação para fazer a sua manutenção e, assim, existe maior probabilidade de o mesmo reiniciar o seu ciclo. Isto é importante porque, caso o processo de recolha de abelhas não inclua estas obreiras e a infestação for ligeira, a probabilidade de diagnóstico do ácaro diminui e pode haver falsos-negativos.

Por fim, a altura do ano de colheita de amostras influencia a deteção destes ácaros em laboratório (Peck 2021). Na Primavera, a rainha começa a ovoposição e a expandir a criação de obreiras e zangãos e os ácaros iniciarão a fase reprodutiva, sendo que serão poucas ou nenhuma as abelhas adultas parasitadas. No Verão, a criação e as abelhas adultas estarão igualmente parasitadas, enquanto a colónia atinge o número máximo de indivíduos. A entrada no Outono é acompanhada pela diminuição da postura da rainha e do número de abelhas na colónia, com um aumento concomitante de ácaros, especialmente em fase forética. A criação parasitada desta fase dará origem às abelhas de Inverno, também parasitadas (van Dooremalen et al. 2012; Traynor et al. 2020). Além disso, o processo de enxameação pode alterar a carga parasitária de uma colónia. Tendo em conta que existe uma inter-relação entre o hospedeiro, o parasita e ambiente (Meixner et al. 2014), é importante interpretar os resultados de maneira cautelosa, pois a ausência de *Varroa* nas abelhas adultas não exclui a possibilidade de a colónia estar parasitada.

## 2021

O ácaro *V. destructor* foi o agente mais prevalente este ano, com uma prevalência nacional em 2021 de 35,29%. Este valor segue a tendência dos valores dos anos anteriores obtidos pela autoridade sanitária nacional, apesar de ser inferior aos últimos dados fornecidos. No entanto, é preciso lembrar que os dados desta entidade incluem a análise de favos de criação e de abelhas adultas, e não apenas de abelhas adultas.

Na amostra estudada, a nível regional, Lisboa e Vale do Tejo salientou-se como sendo a região com maior prevalência, seguida pelo Algarve e Alentejo. O Centro do país foi a zona com menor percentagem de casos positivos deste agente, com um valor de 18,33% (44/240). No trabalho realizado por Costa (2021) com dados de 2019, o valor obtido foi de 30,2% (175/580) para as amostras de abelhas adultas, denotando-se uma diminuição para 2021. É interessante realçar que o autor calculou a prevalência, não só tendo por base as amostras de abelhas adultas e as amostras de favos de criação contabilizadas individualmente, como também calculou o mesmo parâmetro assumindo como amostra representativa do apiário, o favo e as abelhas em conjunto. Deste modo, obteve uma prevalência de 59,0% (342/580), salientando assim, a importância a nível sanitário e epidemiológico do diagnóstico de *Varroa* com o recurso a estes dois tipos de amostra.

A segunda região com menor prevalência foi o Norte do país, com 48,94% (23/47), um valor superior ao descrito por Costa (2021) - 27,6% (43/156).

A única região livre deste parasita foi a Região Autónoma dos Açores, reiterando assim o seu estatuto de indemnidade atribuído pela Comissão Europeia, tendo em conta que apenas estão em estudo amostras com origem nas ilhas consideradas indemnes. No entanto, é importante reforçar, que as oito amostras em estudo deste arquipélago são pouco representativas e não permitem tirar conclusões com confiança, para além do facto de três ilhas não terem sido alvo de análise.

Em Portugal, o Inverno foi a estação do ano em que a percentagem de amostras positivas foi superior, seguida de uma diminuição para um quinto do valor na Primavera. No Verão surge um novo aumento, que continua até ao Outono. Assim, concluímos que a dinâmica populacional de *V. destructor* e de *A. mellifera* seguiu o que está descrito na literatura e o que já foi mencionado anteriormente.

## 2022

Nos primeiros seis meses deste ano a prevalência nacional foi de 23,89%, mais baixa que nos anos anteriores, sendo o segundo agente mais diagnosticado neste período.

O reduzido número de amostras provenientes do Alentejo e Algarve são impeditivas de uma avaliação fidedigna. Em relação ao Norte e Centro do país, os valores são bastante semelhantes, ao contrário dos valores discrepantes verificados no ano anterior.

No que se refere à avaliação sazonal, só estiveram em estudo o Inverno, Primavera e Verão. O Inverno não apresentou uma percentagem de casos positivos tão elevada, como no ano anterior. Os Invernos em 2021 e 2022 foram considerados quentes e secos (IPMA 2022a) e, sabendo-se que as temperaturas mais amenas aumentam a atividade pecoreadora (colheita de néctar e pólen) das obreiras e que, a presença de pólen e néctar consequentemente despoletam a postura da rainha, é possível que neste tempo os parasitas estivessem em fase reprodutiva na criação. Esta situação climática prolongou-se até à Primavera (IPMA 2022b). No entanto, o valor de prevalência obtido é pouco fidedigno, pois apenas foram analisadas sete amostras. Na Primavera e no Verão, as prevalências foram superiores ao mesmo período do ano anterior, provavelmente devido clima quente e seco que se verificou (IPMA 2022b; IPMA 2022c; IPMA 2022d).

### **7.1.2. *Nosema* spp.**

A par com *Varroa destructor*, estes microsporídeos são os agentes patogénicos mais debilitantes para as colónias de *A. mellifera* (Botías et al. 2013) A distribuição das duas espécies identificadas na abelha europeia atualmente, *N. apis* e *N. ceranae*, está a mudar, sendo que, nas colónias europeias, *N. ceranae* está a tornar-se predominante (Grupe e Quandt 2020; Galajda et al. 2021).

Nos últimos dez anos, as prevalências nacionais oficiais deste microsporídeo estiveram compreendidas entre os 13% e 25% de forma estável, sendo que valor máximo foi obtido no ano de 2020. É o segundo agente patogénico mais prevalente em Portugal (DGAV 2022a). Estes dados não distinguem a espécie responsável pelo resultado positivo, pelo que não espelham a distribuição e prevalência específica nacionais. No entanto, um estudo a nível nacional realizado por Pires et al. (2013) nos anos de 2011 e 2012 indica que apenas foram diagnosticados casos positivos de *N. ceranae*, sem nenhum padrão geográfico característico, concordando com o descrito na literatura acerca da predominância desta espécie. Em Espanha, esta espécie também é predominante e apresenta prevalências elevadas, sendo responsável por perdas significativas de colónias (Higes et al. 2008; Botías et al. 2012).

À semelhança do que acontece com o ácaro *V. destructor*, as condições ambientais influenciam a dispersão e presença deste agente patogénico. Estudos demonstram que os níveis de esporos na colónia são superiores nas regiões mais a Norte da Europa em detrimento das do Sul, pois nessa região as abelhas estão em confinamento durante mais dias durante o Inverno e Outono, aumentando, assim, o contacto entre os indivíduos e não permitindo que defequem fora da colmeia (Meixner et al. 2014; Retschnig et al. 2017; OIE 2018d).

No que respeita à prevalência sazonal de *Nosema* spp., a literatura existente não é concisa. Enquanto a sazonalidade de *N. apis* e a sua maior prevalência no final do Inverno e

início da Primavera são aceites de forma generalizada (Fries 1993; Martín-Hernández et al. 2012; Galajda et al. 2021), em relação a *N. ceranae* não existe consenso. No entanto, está descrito que a introdução deste microsporídeo nas colónias espanholas conduziu ao desaparecimento da sazonalidade da infeção por *Nosema* spp. até aí observada (Martín-Hernández et al. 2007). Um estudo alemão reportou as maiores prevalências de *N. ceranae* na Primavera (Gisder et al. 2010) e um estudo realizado por Traver et al. (2012) nos EUA detetou níveis baixos deste parasita no Inverno e valores mais elevados na Primavera e Verão.

As prevalências de ambas as espécies são influenciadas pela resistência dos esporos. Enquanto os de *N. ceranae* são resistentes a altas temperaturas e suscetíveis a temperaturas mais baixas, o contrário acontece para os esporos de *N. apis* (OIE 2018d), favorecendo o desenvolvimento do primeiro em regiões de clima temperado.

Adicionalmente à estação do ano, a idade e, conseqüentemente, a função da abelha obreira influenciam a dinâmica da infeção por *N. ceranae*. A prevalência é superior nas abelhas cuja função é colher o néctar e o pólen, em comparação com as abelhas-ama (Higes et al. 2008; Botías et al. 2013; Jabal-Uriel et al. 2022). Quando a colónia está gravemente afetada, existe uma grande perda das abelhas que vão ao exterior, levando a que as abelhas mais jovens amadureçam mais precocemente para as substituir. Assim, existe uma perda populacional, diminuição na proporção de criação, por não ser cuidada, e conseqüente diminuição da colónia e da produção de mel (Higes et al. 2008; Botías et al. 2013). É relevante ter estes aspetos em consideração no momento da colheita de amostras de modo a incluir abelhas de diversas idades e funções para aumentar a probabilidade de detetar a infeção/doença.

## **2021**

A prevalência nacional em 2021 foi muito semelhante aos valores registados pela DGAV nos anos anteriores. O valor obtido para o Norte do país foi mais reduzido que o obtido por Costa (2021) no ano de 2019 (57,7%, 90/156), no entanto o presente estudo incluiu um menor número de amostras. Por sua vez, a região Centro apresentou um valor muito semelhante ao registado no trabalho citado. No entanto, registou-se na mesma a tendência para *Nosema* spp. ser mais prevalente no Norte do que no Centro do país. Lisboa e Vale do Tejo foi a região com menor proporção de casos positivos, ao contrário da Região Autónoma dos Açores, onde se detetou o valor mais alto.

Em relação ao Arquipélago dos Açores, a situação sanitária é peculiar. Os últimos dados indicam que as abelhas em todas as ilhas estão parasitadas por *Nosema* spp., à exceção de Santa Maria e Flores. A ilha de Santa Maria é, assim, livre de *V. destructor* e *Nosema* spp., estando assim ausentes dois dos maiores fatores de stress das colónias de *A. mellifera*. Por sua vez, Terceira e São Jorge não só foram positivos a este agente, como a

prevalência do mesmo aumentou no período entre 2014-2015 e 2020 (Lopes et al. 2022). Apesar de apenas quatro ilhas, entre elas São Jorge e Terceira, terem sido incluídas no presente trabalho, os dados obtidos estão de acordo com a literatura. No entanto, é preciso interpretar os resultados obtidos com cautela devido ao facto de os mesmos não abrangerem o arquipélago na generalidade.

Em relação à distribuição sazonal, a maior frequência de casos positivos ocorreu na Primavera, seguida do Inverno. O Inverno 2020/2021 foi considerado quente e chuvoso (IPMA 2021a), particularmente em fevereiro, o que pode ter conduzido a um maior confinamento das abelhas. Esta limitação pode conduzir a uma maior carga de esporos acumulada e a uma maior probabilidade de os indivíduos defecarem dentro da colmeia, e, portanto, a uma maior disseminação da doença nas abelhas. Na Primavera, quente e seca (IPMA 2021b), a prevalência aumentou devido às condições impostas no Inverno e à infeção das novas abelhas que vão emergindo da criação. No Verão, a prevalência diminuiu com uma nova subida no Outono, como descrito na literatura (Retschnig et al. 2017; Applegate and Petritz 2020; Marín-García et al. 2022).

## **2022**

Nos primeiros seis meses deste ano, *Nosema* spp. foi o agente infeccioso mais recorrentemente diagnosticado, seguindo a tendência de valores registados pela DGAV nos últimos anos (DGAV 2022a).

Em termos regionais, a única amostra a representar a região Algarvia foi positiva, pelo que não é representativo. De igual modo, o Alentejo não registou qualquer caso positivo, mas o reduzido número de amostras recebidas com origem nesta região não permite tirar conclusões. As regiões Norte e Centro apresentaram valores mais baixos do que os registados por Costa (2021), mantendo a tendência para a região Norte apresentar uma prevalência superior em comparação com a região vizinha.

No que concerne aos valores sazonais, a maior prevalência registou-se no Inverno, com um valor muito semelhante à Primavera. O Inverno e Primavera corresponderam a períodos de alguma instabilidade climática, com aguaceiros fortes pontuais, situações de trovoada e dias quentes para a época (IPMA 2022b; IPMA 2022a), pelo que, apesar das temperaturas amenas, a colónia provavelmente esteve em confinamento parcial, permitindo a disseminação do agente.

### **7.1.3. *Acarapis woodi* e *Braula coeca***

O ácaro *A. woodi* e o díptero *B. coeca* foram diagnosticados apenas no Arquipélago dos Açores, à exceção do caso positivo isolado de acarapiose no Alentejo em 2021. Do ponto de vista nacional, estes agentes apresentam prevalências muito reduzidas. A nível regional, o ácaro mantém a tendência, enquanto *B. coeca* surge em mais de 60% das amostras.

Todavia, o reduzido número de amostras em estudo provenientes desta região não permite tirar conclusões do panorama sanitário açoriano com confiança.

A presença destes parasitas nas colmeias açorianas, quase exclusivamente, é justificada pela ausência de planos de tratamento para controlo da Varroose. Dada a ausência deste parasita, não são feitos os tratamentos com acaricidas de rotina impostos pela DGAV (DSPA 2022), ocasionando o desenvolvimento de outros artrópodes suscetíveis aos mesmos, como outros ácaros e dípteros (Martínez 2018). É expectável que nas ilhas não-indemnes deste arquipélago, dado a presença de *V. destructor* e planos de tratamentos, *B. coeca* e *A. woodi* não se consigam desenvolver, resultando nas baixas prevalências ou mesmo ausência dos mesmos. O estudo realizado por Costa (2021) não detetou qualquer caso positivo deste ácaro nas região Norte e Centro do país.

Em 2006, um estudo efetuado por Murilhas (2009) reportou uma prevalência de 0,3% e os últimos dados da DAGV para o ano de 2021 apontam para uma prevalência de *A. woodi* de 0% (DSPA 2022), valores muito próximos aos obtidos neste trabalho.

Não existem estudos recentes relativos aos valores da prevalência deste parasita na Europa, à exceção de um estudo realizado por Garrido-Bailón et al. (2012). Este aborda a prevalência nacional, regional e sazonal em Espanha, em 2006 e 2007, tendo obtido um valor nacional anual de 13% (142/1089) e 15,5% (132/854), respetivamente. Na Alemanha, um estudo demonstrou uma frequência de infeção de 14,8% (158/1064) (D'Alvise et al. 2019). Estas frequências de casos positivos são bastante superiores aos obtidos na presente dissertação, sendo que esta pode ser explicada pelo facto de os autores terem recorrido a técnicas de biologia molecular, PCR e qPCR, respetivamente, mais sensíveis que a observação ao microscópio ótico para realizar o diagnóstico. Assim, é possível que as prevalências obtidas com base neste último método sejam inferiores ao que acontece na realidade.

Segundo a OIE (2018a), a melhor altura do ano para a recolha de amostras para pesquisa de *A. woodi* é o início da Primavera e final do Outono no Hemisfério Norte, pois coincide com a altura em que a população destes ácaros é maior dentro da colmeia. No presente estudo os dados obtidos foram de acordo com o publicado, com o Inverno a apresentar a maior frequência de casos positivos, com uma redução na Primavera, ausência de diagnósticos positivos nas amostras de Verão e novo aumento no Outono.

Em relação a *B. coeca*, não existem estudos a abordar a prevalência deste agente na Europa nem sobre o seu padrão sazonal (Martínez 2018). No presente estudo, apenas foram detetados casos positivos no Inverno. Possivelmente o confinamento da colónia no Inverno cria as condições favoráveis para o parasita se transmitir entre as abelhas.

#### **7.1.4. *Senotainia tricuspis***

A mosca *S. tricuspis* está distribuída pelo sul da Europa e outros países da faixa mediterrânea, como o Egito e a Argélia (Orantes Bermejo et al. 1996; Haddad et al. 2015). Nestas regiões é encontrada a rodear as colmeias nas horas de maior radiação solar, no Verão (Martínez 2018). Em Portugal foi detetada pela primeira vez em 1986 (Rocha e Mira Delgado 1986 citado por Orantes Bermejo et al. 1996). Os últimos dados de prevalência neste país foram documentados por Pires et al. (2011), para o ano de 2009, com um valor de prevalência nacional de 10,2 %, sendo que Murilhas (2009) obteve um valor de 19,8% para o ano de 2006.

Este parasita apresenta uma clara preferência pelas temperaturas elevadas e humidades baixas. Pires et al. (2011) documentaram uma maior frequência de amostras positivas nos meses de julho e setembro, à semelhança do registado por Orantes Bermejo et al. (1996). Por sua vez, Costa (2021) registou as maiores prevalências no Verão (17,4%, 4/23 no Norte; 24,8%, 54/218 no Centro) e Outono (40,9%, 9/22 no Norte; 44,4%, 8/18 no Centro). Sendo um parasita muito influenciado pelas temperaturas e número dias de sol (Martínez 2018), é expectável que se observem oscilações na sua frequência anual, regional e mesmo sazonal, especialmente tendo em conta a instabilidade climática e o aumento dos fenómenos extremos derivados das alterações climáticas (ONU 2022). As condições climáticas influenciam também a dinâmica da colónia, em que as temperaturas amenas estimulam a atividade forrageira das obreiras (Farinha et al. 2019), tornando-as mais suscetíveis a serem alvo do ataque pela mosca larvípara. Assim, a altura do ano em que se procede à recolha de amostras influencia muito a probabilidade de se obter um diagnóstico positivo.

#### **2021**

Neste ano, a prevalência nacional obtida foi de 21,30%, sendo o terceiro agente patogénico mais diagnosticado. O valor obtido é mais do dobro do que foi registado anteriormente (Pires et al. 2011).

Em termos regionais, a Região Autónoma dos Açores foi a zona do país com maior frequência deste díptero, em que todas as amostras foram positivas, seguida do Algarve. Este facto difere do que foi registado anteriormente por Pires et al. (2011), cujo estudo concluiu que o Arquipélago dos Açores foi a região com menor prevalência. Todavia, no presente trabalho o número de amostras provenientes destas ilhas é muito reduzido e com origem em colmeias com um estatuto sanitário muito particular. As regiões Norte do país apresentaram uma prevalência superior à documentada em 2019 (Costa 2021), enquanto a região Centro se manteve dentro do mesmo registo.

A distribuição dos casos positivos por estação do ano desviou-se do padrão sazonal desta espécie. O Inverno foi a altura do ano em que se diagnosticaram mais casos de *S. tricuspis*, em comparação com as restantes estações, o que é incomum visto que esta mosca

apresenta preferência por temperaturas altas e dias mais longos e soalheiros. Dados do IPMA (2021; 2022a) indicam que o Inverno foi quente, com um mês de dezembro de 2021 especialmente seco e quente para a época, criando-se assim as condições ótimas para o desenvolvimento do díptero.

## **2022**

A prevalência obtida no primeiro semestre foi semelhante aos valores registados por Pires et al. (2011). No entanto, foi menor que no ano anterior, provavelmente devido à ausência de amostras colhidas no Outono e devido ao facto do Verão deste ano apenas ser representado pelo mês de junho.

Até junho deste ano, a região Centro registou a maior prevalência em Portugal Continental, seguida pelo Norte do país. Nestas duas regiões os resultados obtidos foram semelhantes aos registados por Costa (2021) no ano de 2019.

A ausência de casos positivos no Inverno e uma prevalência mais elevada no Verão corroboram os dados de outros estudos (Pires et al. 2011; Martínez 2018; Costa 2021).

### **7.1.5. *Tropilaelaps* spp. e *Aethina tumida***

São agentes etiológicos de declaração obrigatória em Portugal e na Comunidade Europeia, sendo considerados emergências sanitárias. Não foram detetados no presente trabalho, contudo o recurso a abelhas adultas para o diagnóstico de *Tropilaelaps* spp., que apresenta uma fase forética muito curta, pode prejudicar o mesmo e induzir em erro. Assim, para o diagnóstico deste parasita são essenciais amostras que incluam favos de criação.

*Tropilaelaps* spp. não está presente na Europa e, segundo a EFSA (2013), a probabilidade de entrada neste continente depende de vários fatores como: a importação de rainhas da espécie *A. mellifera* e de produtos não-apícolas (frutas, vegetais, ...) de países terceiros, o que constitui um meio de baixo risco, e a importação de produtos apícolas, o que já constitui um risco moderado. A importação de enxames e colónias não é permitida na União Europeia, no entanto a entrada acidental de abelhas através de outro tipo de cargas pode levar a uma introdução deste ácaro nativo da Ásia. Em Portugal, a implementação do PICOA permite fazer a vigilância desta doença, prevenindo a sua entrada em território nacional (DGAV 2022b). As alterações climáticas favorecem o ciclo deste parasita na abelha europeia, uma vez que as mesmas promovem ciclos contínuos de criação, essencial para o sucesso reprodutivo do artrópode (Sammataro et al. 2000; le Conte e Navajas 2008).

*A. tumida* está presente em Itália, nas regiões da Calábria, Sicília e Cosenza. Tendo em conta que este parasita não se expandiu para o resto do país (IZSVE 2022), as restrições impostas nas duas primeiras regiões, nomeadamente a proibição de exportação de produtos apícolas ou não, equipamentos e mel (Decisão de Execução da Comissão 2014/909/EU, de 12 de dezembro), passaram a ser limitadas à região da Calabria (Decisão de Execução da

Comissão 2019/1399/EU, de 10 de setembro). Segundo modelos matemáticos, a probabilidade deste coleóptero ser introduzido noutros estados-membro da Comunidade Europeia a partir de Itália depende da quantidade de produtos importados, da sensibilidade do setor para o cumprimento das regras sanitárias estabelecidas em cada país e, principalmente, da sensibilidade dos testes de diagnóstico utilizados, sendo que se este parâmetro for elevado diminui a probabilidade de contágio (EFSA, 2015). Em Portugal, à semelhança do que acontece com *Tropilaelaps* spp., o PICOA permite a vigilância ativa desta doença (DGAV 2022b), estando estipulado um manual de operações para casos suspeitos (DESA e DSPA 2016).

Dados os danos causados por estes parasitas, é crucial manter a vigilância e monitorizar a dispersão dos mesmos, de modo que, em caso de entrada no nosso país, seja possível atuar com rapidez e eficácia.

## **7.2. Tipologias de infeção e proporção das mesmas**

Nos dois anos em estudo foram registadas infeções simples e infeções compostas, sendo as primeiras as mais frequentes. Em 2021, a combinação mais predominante foi a de *V. destructor* e *S. tricuspis*, enquanto em 2022 foi *Nosema* spp. e *S. tricuspis*. Apesar da diferença entre os dois anos, une-os a relevância das combinações entre *V. destructor*, *Nosema* spp. e *S. tricuspis*.

A ocorrência de infeções mistas é expectável tendo em conta o carácter a ação imunossupressiva de *V. destructor* (Rosenkranz et al. 2010; Applegate e Petritz 2020; Noël et al. 2020) e de *Nosema* spp. (Antúñez et al. 2009; Marín-García et al. 2022). Assim, a abelha adulta fica mais suscetível a infeções secundárias. Apesar de não ser a infeção mista mais comum, os efeitos sinérgicos resultantes da combinação de *V. destructor* e de *Nosema* spp. conduzem ao enfraquecimento das colónias (Orantes Bermejo e García Fernández 1997) e estão associadas às perdas de colónias reportadas nos EUA e Europa (Anderson e Iain 2008 citado por Costa, 2021; Higes et al. 2008; Rosenkranz et al. 2010). Tendo em conta os efeitos graves desta combinação de agentes, é expectável uma menor frequência da mesma, visto que a colónia pode não sobreviver. A mosca *S. tricuspis* não apresenta consequências mais prejudiciais na colmeia (Martínez 2018), pelo que a coexistência de parasitoses é possível. Em 2021, observou-se que em mais de metade dos casos positivos de infeção por este díptero se diagnosticou outro agente patogénico.

Não existem muitos dados relativos a interações de *Braula coeca* e *Acarapis woodi*, quer entre si, quer com outros agentes. Em 2021, *B. coeca* foi diagnosticado sempre em conjunto com outro agente, nomeadamente com *S. tricuspis*, *Nosema* spp. e *A. woodi*. O comportamento de higiene das abelhas é fulcral para manter a imunidade individual e de grupo (Leclercq et al. 2017). Tendo em conta o papel imunossupressor de *Nosema* spp., é provável

que este hábito esteja suprimido. *V. destructor* não surge simultaneamente com *A. woodi* ou com *B. coeca* devido às condições sanitárias específicas das ilhas açorianas de origem das amostras.

É relevante mencionar, ainda, o papel de *Varroa destructor* enquanto vetor biológico de vírus. Este tipo de interação pode alterar as características fisiológicas e morfológicas das abelhas parasitadas, tornando-as mais suscetíveis a outras doenças (Noël et al. 2020; Flores et al. 2021) e ao colapso da colónia (Dainat et al. 2012) .

### **7.3. Impacto da pandemia de Covid-19 no envio de amostras**

Os anos de 2018 e 2019 foram marcados por uma grande afluência de amostras, tendo ultrapassado as 1000 amostras anuais. Uma análise a nível trimestral destes mesmos anos permite inferir a tendência do envio de amostras para o laboratório. O primeiro trimestre corresponde ao período de menor afluência, sendo que existe um aumento significativo na entrada do segundo trimestre. O número de novas amostras enviadas mantém-se na mesma ordem de valores no terceiro trimestre, seguido de uma queda nos últimos três meses do ano.

Contrariamente a esta tendência, 2020 não chegou às 500 amostras, sendo que a partir do segundo trimestre desse ano, o número de amostras recebidas pelo laboratório do Posto Apícola diminuiu face aos números dos anos anteriores.

Este fenómeno coincidiu com a tomada de medidas políticas e sanitárias para combater o avanço da pandemia de Covid-19 em Portugal e no Mundo. Estas consequências não foram exclusivas do laboratório do Posto Apícola do INIAV em Portugal. Dall'Olio et al. (2020) conduziram um inquérito a 230 investigadores na área da sanidade apícola em 56 países com a finalidade de averiguar o impacto da pandemia na investigação e concluíram que todos apontavam ter sentido dificuldades na continuação da sua atividade. A colheita de amostras e o seu envio para laboratório foram dois tópicos mencionados, como tendo sido prejudicados por esta pandemia e pelas medidas estabelecidas para a mitigar. Mas em que medida?

A Organização Mundial de Saúde declarou a doença causada pelo vírus SARS-CoV-2 (agente etiológico da Covid-19) uma pandemia no dia 11 de março de 2020 (Ghebreyesus 2020) e, a 18 de março, o Presidente da República de Portugal declarou aquele que seria o primeiro estado de emergência, através do decreto nº14-A/2020 de 18 de março. Este estado excecional aplicado suspendeu, entre outros, o direito à deslocação livre dos cidadãos, limitando-a ao essencial para a sobrevivência das famílias. Além disso, foi declarado o dever especial de proteção aos cidadãos com mais de 70 anos de idade, aos portadores de doenças crónicas consideradas de risco e imunodeprimidos (Decreto nº2-A/2020 de 18 de março). Assim, a pandemia obrigou ao confinamento de milhares de pessoas em Portugal, suspendendo atividades de lazer, atividades letivas e, até mesmo, profissionais.

Segundo a FNAP (2017), a idade média dos apicultores portugueses é 56 anos, sendo que 56,0% apresenta uma idade superior a 55 anos. Tendo em conta que a prevalência de doenças crónicas aumenta com a idade, particularmente a partir dos 55 anos (Quinaz Romana et al. 2019), é possível inferir que grande parte desta faixa etária seria considerada população de risco. O seu maior confinamento poderá ter levado a um abandono das suas atividades de maneira provisória e/ou a uma diminuição na frequência de visita aos apiários. Além disso, o próprio medo e desconhecimento da situação nova em que se vivia podia gerar o afastamento das pessoas, de risco ou não, desta atividade. As atividades de manejo do apiário e recolha de amostras para fins de diagnóstico ficariam, assim, em pausa, pausa essa que tem sido difícil retornar à normalidade.

Adicionalmente, a DGAV suspendeu as deslocações aos apiários em zonas controladas para colheita de material apícola para análise (Despacho n.º 2/G/2021, de 5 de fevereiro), contribuindo ainda mais, para a quebra no número de amostras enviadas para o laboratório. Segundo dados provisórios constantes no Programa Sanitário Apícola de 2022, foram avaliados em 2020 um total de 1728 apiários e 1004 em 2021, enquanto em 2018 e 2019 foram alvo de análise 6991 e 2883, respetivamente (DGAV 2022a). Esta quebra acentuada na amostragem leva a consequências a nível sanitário. Uma das bases para promover um programa de vigilância é conhecer o estado sanitário atual da população, neste caso, das colónias. Sem uma amostragem correta, não é possível calcular a prevalência de infeção/doença e, conseqüentemente, atestar a eficácia de métodos de controlo de determinado agente patogénico e conhecer o estado de saúde das colónias (Lee et al. 2015).

Esta falha na vigilância é particularmente relevante na sanidade apícola devido à biologia de *A. mellifera*. Sendo um inseto social, este animal vive numa colónia com milhares de indivíduos num espaço relativamente reduzido, havendo um estreito contacto entre todos os membros. Além disso, os hábitos de higiene e de trofilaxia leva a que exista um elevado grau de interação entre as abelhas (Fries e Camazine 2001; Chen et al. 2006; Wilson-Rich et al. 2009). Em sinergia com as características individuais anteriores, as condições ambientais dentro da colmeia, nomeadamente, a temperatura e humidade a valores constantes, e a presença de alimento promovem, assim, um ambiente perfeito para as infeções se transmitirem horizontalmente de forma rápida e eficaz (Fries e Camazine 2001). Adicionalmente à transmissão de doenças dentro da colónia, a transmissão entre colónias também ganha algum peso. Nos apiários, devido à proximidade entre as colmeias, pode acontecer o fenómeno de *drifting*, ou seja, entrada de obreiras e zangãos em colónias que não as originais, promovendo, assim, a dispersão de agentes patogénicos (Fries e Camazine 2001; Seeley e Smith 2015; McArt 2021). As pilhagens de colónias mais fracas têm o mesmo efeito, havendo contacto entre indivíduos com estados sanitários provavelmente diferentes entre si (Fries e Camazine 2001).

No primeiro semestre de 2022 não se observou uma recuperação nos valores de amostras recebidas pelo laboratório, apesar do alívio das restrições impostas pela pandemia da Covid-19. Assim, teria sido interessante fazer uma nova avaliação dos números no final do ano civil, para averiguar a recuperação ou não do setor apícola no pós-pandemia, contudo tal não cabia no âmbito deste estudo..

Contudo, apesar da quebra do número de amostras enviadas para análise laboratorial coincidir com a chegada da Covid-19 a Portugal e imposição das medidas sanitárias a ela associadas, não foram recolhidos dados suficientes neste trabalho para afirmar com certeza que a pandemia foi a única razão pela qual se registaram estas alterações. Para tal, seria necessário questionar os apicultores e restantes entidades do setor acerca deste assunto, para compreender os motivos subjacentes.

#### **7.4. Considerações gerais**

Como mencionado anteriormente, a amostra incluída neste trabalho é muito reduzida para permitir afirmar, como segurança, que os resultados obtidos neste trabalho refletem o estado sanitário dos apiários portugueses. Para atingir este objetivo seria necessário repetir o desenho experimental com uma amostra mais representativa do efetivo português.

Independentemente das causas ligadas à quebra do número de amostras enviadas para análise laboratorial, seria extremamente importante realizar ações de sensibilização junto dos apicultores e restantes entidades associadas para salientar a importância da amostragem no planeamento e manutenção da vigilância e controlo de doenças apícolas, especialmente para prevenir uma eventual entrada de agentes etiológicos de doenças exóticas, tais como *Tropilaelaps* spp. e/ou *Aethina tumida*

## 8. Conclusões e perspectivas futuras

O presente trabalho visa contribuir para o conhecimento do panorama sanitário do efetivo apícola português. Assim, com base na distribuição nacional, regional e sazonal da amostra deste estudo, foi possível ter um vislumbre do panorama sanitário das colónias de abelhas pertencentes ao efetivo português.

No que concerne ao primeiro objetivo deste projeto, o estudo da prevalência nacional, regional e sazonal dos agentes de doença no indivíduo adulto de *Apis mellifera* nas amostras incluídas neste trabalho foi concluído de modo satisfatório. No entanto, o reduzido número ou mesmo ausência de amostras provenientes de certas regiões ou estações do ano impossibilitou que se tirassem conclusões fidedignas acerca do panorama sanitário português. A título de exemplo, o Arquipélago da Madeira não foi representado por qualquer amostra, sendo assim, o seu estatuto desconhecido neste trabalho.

Algumas das conclusões mais importantes foram a dominância de *Varroa destructor* como agente patogénico mais prevalente, seguido por *Nosema* spp. Além disso, a Região Autónoma dos Açores revelou apresentar um panorama bastante díspar das restantes regiões, por ser o único local com diagnósticos positivos de *A. woodi* e *B. coeca*, sendo paralelamente a única região a demonstrar a ausência de *V. destructor*, de *A. tumida* e de *Tropilaelaps* spp., agentes de doenças exóticas de notificação obrigatória. Apesar destas conclusões importantes, seria relevante fazer um novo rastreio a nível nacional, com um número de amostras significativo a abordar todas as regiões, para ultrapassar os obstáculos mencionados neste trabalho. Adicionalmente, as doenças da criação podiam ser, também, alvo de estudo paralelamente, para uma análise completa.

No que concerne ao segundo objetivo do trabalho, a infeção combinada entre dois dos seguintes agentes patogénicos – *V. destructor*, *Nosema* spp. e *S. tricuspis* - revelaram-se importantes do ponto de vista sanitário, especialmente *V. destructor* e *Nosema* spp., pelo seu impacto na colónia. Visto que não há informação relativa aos efeitos sinérgicos da infeção mista entre *S. tricuspis* e *Nosema* spp. ou *V. destructor*, e que é frequente nas colónias portuguesas, seria importante proceder a um estudo nesse âmbito.

O último objetivo deste trabalho foi analisar o impacto da pandemia de Covid-19 no envio de amostras para diagnóstico laboratorial, sendo que foi possível concluir que, entre 2019 e 2020, houve uma queda de cerca de 60% no número de amostras recebidas. Este fenómeno apresenta repercussões a nível de vigilância sanitária, especialmente tendo em conta que ainda não ocorreu a recuperação para valores pré-pandémicos, mesmo com alívio das restrições sanitárias relativas à Covid-19. No entanto, não é possível afirmar com segurança que a pandemia foi a única causa para este fenómeno com base nos dados disponíveis. Independentemente da causa, considerando a importância da vigilância ativa para o controlo das doenças na abelha, é imperativo retomar a recolha de amostras de rotina

e envio para diagnóstico laboratorial, através da sensibilização de apicultores individuais e associações para a importância desta ação.

## 9. Bibliografia

Alfallah HM, Mirwan HB. 2018. The Story of *Braula coeca* (Bee Lice) in Honeybee Colonies *Apis mellifera* L. in Libya. International Journal of Research in Agricultural Sciences. 5. [accessed 2022 Dec 21]. [http://www.ijras.org/administrator/components/com\\_jresearch/files/publications/IJRAS\\_642\\_FINAL.pdf](http://www.ijras.org/administrator/components/com_jresearch/files/publications/IJRAS_642_FINAL.pdf).

Anderson D, Iain J. 2008. The latest buzz about colony collapse disorder. Science (1979). 319:724–725.

Antúnez K, Martín-Hernández R, Prieto L, Meana A, Zunino P, Higes M. 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (*Microsporidia*). Environ Microbiol. 11(9):2284–2290. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01953.x.

Applegate JR, Petritz OA. 2020. Common and Emerging Infectious Diseases of Honeybees (*Apis mellifera*). Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice. 23(2):285–297. doi:10.1016/j.cvex.2020.01.001.

Australian Government - Department of Agriculture F and F. 2022. *Varroa destructor* outbreak. National pest & disease outbreaks. [accessed 2022 Sep 23]. <https://www.outbreak.gov.au/current-responses-to-outbreaks/varroa-mite>.

Botías C, Martín-Hernández R, Barrios L, Meana A, Higes M. 2013. *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. Vet Res. 44(1). doi:10.1186/1297-9716-44-25.

Botías C, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, González-Porto A, Martínez-Salvador A, de La Rúa P, Meana A, Higes M. 2012. The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. Res Vet Sci. 93(1):150–155. doi:10.1016/j.rvsc.2011.08.002.

Burnham AJ. 2019. Scientific advances in controlling *Nosema ceranae* (*Microsporidia*) infections in honey bees (*Apis mellifera*). Front Vet Sci. 6(MAR). doi:10.3389/fvets.2019.00079.

Cervo R, Bruschini C, Cappa F, Meconcelli S, Pieraccini G, Pradella D, Turillazzi S. 2014. High *Varroa* mite abundance influences chemical profiles of worker bees and mite–host preferences. Journal of Experimental Biology. 217(17):2998–3001. doi:10.1242/jeb.099978.

Chantawannakul P, Ramsey S, vanEngelsdorp D, Khongphinitbunjong K, Phokasem P. 2018. *Tropilaelaps* mite: an emerging threat to European honey bee. Curr Opin Insect Sci. 26:69–75. doi:10.1016/j.cois.2018.01.012.

Chen Y, Evans J, Feldlaufer M. 2006. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. J Invertebr Pathol. 92(3):152–159. doi:10.1016/j.jip.2006.03.010.

le Conte Y, Navajas M. 2008. Climate change: Impact on honey bee populations and diseases SEE PROFILE. Rev Sci Tech. 27(2):499–510. <https://www.researchgate.net/publication/23285587>.

Costa GF da SS. 2021. Rastreo de agentes patogénicos em *Apis mellifera* nas regiões Norte e Centro de Portugal. [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina

Veterinária da Universidade de Lisboa. [accessed 2022 Nov 28]. <http://hdl.handle.net/10400.5/21223>.

Cuthbertson AGS, Wakefield ME, Powell ME, Marris G, Anderson H, Budge GE, Mathers JJ, Blackburn LF, Brown MA. 2013. The small hive beetle *Aethina tumida*: A review of its biology and control measures. *Curr Zool.* 59(5):644–653. doi:10.1093/czoolo/59.5.644.

Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P. 2012. Predictive Markers of Honey Bee Colony Collapse. *PLoS One.* 7(2):e32151. doi:10.1371/journal.pone.0032151.

Dall’Olio R, Blacquiere T, Bouga M, Brodschneider R, Carreck NL, Chantawannakul P, Dietemann V, Kristiansen LF, Gajda A, Gregorc A, et al. 2020. COLOSS survey: global impact of COVID-19 on bee research. *J Apic Res.* 59(5):731–734. doi:10.1080/00218839.2020.1799646.

D’Alvise P, Seeburger V, Gihring K, Kieboom M, Hasselmann M. 2019. Seasonal dynamics and co-occurrence patterns of honey bee pathogens revealed by high-throughput RT-qPCR analysis. *Ecol Evol.* 9(18):10241–10252. doi:10.1002/ece3.5544.

DeGrandi-Hoffman G, Chen Y. 2015. Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Curr Opin Insect Sci.* 10:170–176. doi:10.1016/j.cois.2015.05.007.

Decisão da Comissão 2008/650/CE, de 30 de julho. *Jornal Oficial da União Europeia - L 213/42.*

Decisão da Comissão 2014/909/EU, de 12 de dezembro. *Jornal Oficial da União Europeia - L 359/161.*

Decisão de Comissão 2019/1399/EU, de 10 de setembro. *Jornal Oficial da União Europeia - L 235/3*

Decreto-Lei nº203/2005 de 25 de novembro. *Diário da República nº227/2015 – Série I.* Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.

Decreto nº2-A/2020 de 18 de março. *Diário da República nº57/2020 – Série 1.* Conselho de Ministros. Lisboa

Decreto nº14-A/2020 de 18 de março. *Diário da República nº55/2020 – Série I.* Presidência da República. Lisboa.

DESA [Direção de Serviços de Proteção Animal], DSPA [Divisão de Epidemiologia e Sanidade Animal]. 2016. Plano de Emergência para a *Aethina tumida*: Manual de operações. Plano Sanitário Apícola 2022.

Despacho n.º 2/G/2021, de 5 de fevereiro. Direção Geral e Agricultura e Veterinária. [accessed 2022 Jun 28]. <https://www.dgav.pt/wp-content/uploads/2021/03/Despacho-n.o-2-G-2021-Covid.pdf>

DGAV [Direção Geral de Alimentação e Veterinária]. 2022a. Programa Sanitário Apícola 2022. :1–22.

DGAV [Direção Geral de Alimentação e Veterinária]. 2022b. Plano Integrado de Controlo Oficial de Apiários - PICOA. Plano Sanitário Apícola 2022.

Dolezal AG, Toth AL. 2018. Feedbacks between nutrition and disease in honey bee health. *Curr Opin Insect Sci.* 26:114–119. doi:10.1016/j.cois.2018.02.006.

van Dooremalen C, Gerritsen L, Cornelissen B, van der Steen JJM, van Langevelde F, Blacquièrre T. 2012. Winter Survival of Individual Honey Bees and Honey Bee Colonies Depends on Level of *Varroa destructor* Infestation. *PLoS One.* 7(4):e36285. doi:10.1371/journal.pone.0036285.

DSPA [Divisão de Epidemiologia e Sanidade Animal]. 2022. Plano de luta contra a Varroose. Programa Sanitário Apícola 2022.

EFSA [European Food Safety Authority]. 2013. Scientific Opinion on the risk of entry of *Aethina tumida* and *Tropilaelaps* spp. in the EU. *EFSA Journal.* 11(3). doi:10.2903/j.efsa.2013.3128.

EFSA [European Food Safety Authority]. 2015. Survival, spread and establishment of the small hive beetle (*Aethina tumida*). *EFSA Journal.* 13(12). doi:10.2903/j.efsa.2015.4328.

Ellis JD. 2005. Reviewing the confinement of small hive beetles (*Aethina tumida*) by western honey bees (*Apis mellifera*). *Bee World.* 86(3):56–62. doi:10.1080/0005772X.2005.11417312.

Ellis JD, Hepburn R, Delaplane KS, Neumann P, Elzen PJ. 2003. The effects of adult small hive beetles, *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae), on nests and flight activity of Cape and European honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie.* 34(4):399–408. doi:10.1051/apido:2003038.

Ellis JD, Hepburn R, Luckman B, Elzen PJ. 2004. Effects of Soil Type, Moisture, and Density on Pupation Success of *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae). *Environ Entomol.* 33(4):794–798. <https://academic.oup.com/ee/article/33/4/794/444974>.

Ellis JD, Nalen CMZ. [data desconhecida] Bee louse, bee fly, braulid, *Braula coeca* Nitzsch (Insecta: Diptera: Braulidae). [accessed 2022 Nov 28]. <http://edis.ifas.ufl.edu>.

Etxegarai-Legarreta O, Sanchez-Famoso V. 2022. The Role of Beekeeping in the Generation of Goods and Services: The Interrelation between Environmental, Socioeconomic, and Sociocultural Utilities. *Agriculture.* 12(4):551. doi:10.3390/agriculture12040551.

Evans JD, Chen Y. 2021. Colony Collapse Disorder and Honey Bee Health. In: Kane TR, Faux CM, editors. *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner.* Wiley. p. 229–234. [accessed 2022 Jun 28]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781119583417>.

Farinha N, Moreira L, Neto JG, Casaca JD, Neves A. 2019. *Apicultura em Portugal - Manual Técnico.* FNAP-Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, editor.

Faux CM. 2021. Honey Bee Anatomy. In: Kane TR, Faux CM, editors. *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner.* Wiley. [accessed 2022 Jun 28]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781119583417>.

Flores JM, Gámiz V, Jiménez-Marín Á, Flores-Cortés A, Gil-Lebrero S, Garrido JJ, Hernando MD. 2021. Impact of *Varroa destructor* and associated pathologies on the colony collapse disorder affecting honey bees. *Res Vet Sci.* 135:85–95. doi:10.1016/j.rvsc.2021.01.001.

Florestas. 2020. Quais as espécies que estão na origem do mel português? Espécies florestais. [accessed 2022 May 4]. <https://florestas.pt/conhecer/quais-as-especies-que-estao-na-origem-do-mel-portugues/>.

FNAP [Federação Nacional de Apicultores Portugueses]. 2017. Boletim Estatístico - O Setor Apícola em Números. APINFO. 1(1).

Fries I. 1993. *Nosema apis* —A Parasite in the Honey Bee Colony. *Bee World*. 74(1):5–19. doi:10.1080/0005772X.1993.11099149.

Fries I. 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol*. 103:S73–S79. doi:10.1016/j.jip.2009.06.017.

Fries I, Camazine S. 2001. Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie*. 32(3):199–214. doi:10.1051/apido:2001122.

Fundación Amigos de las Abejas. Bees. c2008-2021. [accessed 2022 Oct 12]. <https://abejas.org/en/bees/>.

Galajda R, Valenčáková A, Sučík M, Kandráčková P. 2021. *Nosema* disease of european honey bees. *Journal of Fungi*. 7(9). doi:10.3390/jof7090714.

Garrido-Bailón E, Bartolomé C, Prieto L, Botías C, Martínez-Salvador A, Meana A, Martín-Hernández R, Higes M. 2012. The prevalence of *Acarapis woodi* in Spanish honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Exp Parasitol*. 132(4):530–536. doi:10.1016/j.exppara.2012.08.018.

Ghebreyesus T. 2020. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19. [accessed 2022 Nov 25]. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>.

Gisder S, Hedtke K, Möckel N, Frielitz M-C, Linde A, Genersch E. 2010. Five-Year Cohort Study of *Nosema* spp. in Germany: Does Climate Shape Virulence and Assertiveness of *Nosema ceranae*? *Appl Environ Microbiol*. 76(9):3032–3038. doi:10.1128/AEM.03097-09.

GPP [Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral]. 2016. Programa Apícola Nacional 2017-2019. Lisboa: Ministério da Agricultura Floresta e do Desenvolvimento Rural.

GPP [Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral]. 2019. Programa Apícola Nacional 2020-2022. Lisboa: Ministério da Agricultura Floresta e do Desenvolvimento Rural.

Grupe AC, Quandt CA. 2020. A growing pandemic: A review of *Nosema* parasites in globally distributed domesticated and native bees. *PLoS Pathog*. 16(6). doi:10.1371/journal.ppat.1008580.

de Guzman LI, Williams GR, Khongphinitbunjong K, Chantawannakul P. 2017. Ecology, Life History, and Management of *Tropilaelaps* Mites. *J Econ Entomol*. 110(2):319–332. doi:10.1093/jee/tow304.

Haddad N, Adjlane N, Loucif-ayad W, Shebl MA, Saba M, Albaba I, El-obeid D, Sabah M, Giusti M, Felicioli A. 2015. Presence and infestation rate of *Senotainia tricuspis* (Meigen)

(Diptera, Sarcophagidae) on honey bees in the Mediterranean Region. *J Apic Res.*(January 2016):10–13. doi:10.1080/00218839.2015.1099988.

Häußermann CK, Giacobino A, Munz R, Ziegelmann B, Palacio MA, Rosenkranz P. 2020. Reproductive parameters of female *Varroa destructor* and the impact of mating in worker brood of *Apis mellifera*. *Apidologie*. 51(3):342–355. doi:10.1007/s13592-019-00713-9.

Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, Bailón EG, González-Porto A v., Barrios L, del Nozal MJ, Bernal JL, Jiménez JJ, Palencia PG, et al. 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ Microbiol*. 10(10):2659–2669. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01687.x.

Hood WM. 2004. The small hive beetle, *Aethina tumida*: a review. *Bee World*. 85(3):51–59. doi:10.1080/0005772X.2004.11099624.

IFAP [Instituto de Financiamento da Agricultura e Pescas]. 2022. Declarações da Atividade Apícola - Anos 2011 a 2022. [accessed 2022 Dec 13]. <https://www.ifap.pt/estatisticas-animais>.

INE [Instituto Nacional de Estatística]. 2021. Anuário Estatístico de Portugal: 2020. Lisboa. [accessed 2022 Apr 26]. url:<https://www.ine.pt/xurl/pub/6359108>.

IPMA [Instituto Português do Mar e da Atmosfera]. 2021a. Boletim Climatológico Sazonal - Inverno 2020/2021. [accessed 2022 Dec 21]. [https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20210909/EGaUrBCLSiMIDdGicFpP/cli\\_20210201\\_20210228\\_pcl\\_sz\\_co\\_pt.pdf](https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20210909/EGaUrBCLSiMIDdGicFpP/cli_20210201_20210228_pcl_sz_co_pt.pdf).

IPMA [Instituto Português do Mar e da Atmosfera]. 2021b. Boletim Climatológico Sazonal - Primavera 2021. [accessed 2022 Dec 29]. [https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20210715/jWKxvxPkJQGeOjyFtCvN/cli\\_20210501\\_20210531\\_pcl\\_sz\\_co\\_pt.pdf](https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20210715/jWKxvxPkJQGeOjyFtCvN/cli_20210501_20210531_pcl_sz_co_pt.pdf).

IPMA [Instituto Português do Mar e da Atmosfera]. 2022a. Boletim Sazonal - Inverno 2021/2022. Boletim Climatológico. [accessed 2022 Dec 16]. [https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20220714/wlbLyCQFvoeFadhaRZCW/cli\\_20220101\\_20220228\\_pcl\\_sz\\_co\\_pt.pdf](https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20220714/wlbLyCQFvoeFadhaRZCW/cli_20220101_20220228_pcl_sz_co_pt.pdf).

IPMA [Instituto Português do Mar e da Atmosfera]. 2022b. Boletim Sazonal - Primavera 2022. Boletim Climatológico. [accessed 2022 Dec 16]. [https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20221122/sllmlaVWEkAtSEFdTfVh/cli\\_20220501\\_20220531\\_pcl\\_sz\\_co\\_pt.pdf](https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20221122/sllmlaVWEkAtSEFdTfVh/cli_20220501_20220531_pcl_sz_co_pt.pdf).

IPMA [Instituto Português do Mar e da Atmosfera]. 2022c. Boletim Climatológico Mensal – Junho 2022. Boletim Climático Portugal Continental. [accessed 2022 Dec 16]. [https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20221215/HExtYhcLxAMVfuAniUOz/cli\\_20220601\\_20220630\\_pcl\\_mm\\_co\\_pt.pdf](https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20221215/HExtYhcLxAMVfuAniUOz/cli_20220601_20220630_pcl_mm_co_pt.pdf).

IPMA [Instituto Português do Mar e da Atmosfera]. 2022d. Boletim Climatológico Mensal – Julho 2022. Boletim Climático Portugal Continental. [accessed 2022 Dec 16]. [https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20221215/VshAWFnRwypDatUBOCCn/cli\\_20220701\\_20220731\\_pcl\\_mm\\_co\\_pt.pdf](https://www.ipma.pt/resources.www/docs/im.publicacoes/edicoes.online/20221215/VshAWFnRwypDatUBOCCn/cli_20220701_20220731_pcl_mm_co_pt.pdf).

IPMA [Instituto Português do Mar e da Atmosfera]. c2023a. IPMA. Área Educativa - Clima de Portugal Continental. [accessed 2023 Feb 9]. <https://www.ipma.pt/pt/educativa/tempo.clima/>.

IPMA [Instituto Português do Mar e da Atmosfera]. c2023b. IPMA. Normais Climáticas. [accessed 2023 Feb 9]. <https://www.ipma.pt/pt/oclima/normais.clima/>.

IZSLT [Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana “Mariano Aleandri”]. 2015. Varroosis: a parasitic disease of the brood and adult honeybees. In: Apimondia. FAO [Food and Agriculture Organization]. [accessed 2022 Dec 20]. <https://www.fao.org/teca/en/technologies/8416>.

IZSVe [Istituto Zooprofilattico Experimentale delle Venezie]. 2022 Aug 26. *Aethina tumida* in Italy: updates. Beekeeping , Monitoring & Prevention. [accessed 2022 Dec 14]. <https://www.izsvenezie.com/aethina-tumida-in-italy/>.

Jabal-Uriel C, Albarracín VN, Calatayud J, Higes M, Martín-Hernández R. 2022. Age and Season Effect the Timing of Adult Worker Honeybee Infection by *Nosema ceranae*. Front Cell Infect Microbiol. 11(January):1–12. doi:10.3389/fcimb.2021.823050.

Jesus NRM. 2020. Caracterização do panorama sanitário apícola nacional e estudo preliminar de fatores de risco de manejo apícola na ocorrência de doenças da *Apis mellifera* em Portugal [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. [accessed 2022 Nov 28]. <http://hdl.handle.net/10400.5/19753>.

Khalifa SAM, Elshafiey EH, Shetaia AA, El-Wahed AAA, Algethami AF, Musharraf SG, Alajmi MF, Zhao C, Masry SHD, Abdel-Daim MM, et al. 2021. Overview of bee pollination and its economic value for crop production. Insects. 12(8):1–23. doi:10.3390/insects12080688.

Khongphinitbunjong K, Neumann P, Chantawannakul P, Williams GR. 2016. The ectoparasitic mite *Tropilaelaps mercedesae* reduces western honey bee, *Apis mellifera*, longevity and emergence weight, and promotes Deformed wing virus infections. J Invertebr Pathol. 137:38–42. doi:10.1016/j.jip.2016.04.006.

Leclercq G, Pannebakker B, Gengler N, Nguyen BK, Francis F. 2017. Drawbacks and benefits of hygienic behavior in honey bees (*Apis mellifera* L.): a review. J Apic Res. 56(4):366–375. doi:10.1080/00218839.2017.1327938.

Lee K, Steinhauer N, Travis DA, Meixner MD, Deen J, vanEngelsdorp D. 2015. Honey bee surveillance: a tool for understanding and improving honey bee health. Curr Opin Insect Sci. 10:37–44. doi:10.1016/j.cois.2015.04.009.

Lopes AR, Martín-Hernández R, Higes M, Segura SK, Henriques D, Pinto MA. 2022. Colonisation Patterns of *Nosema ceranae* in the Azores Archipelago. Vet Sci. 9(7):320. doi:10.3390/vetsci9070320.

Ma S, Yang Y, Jack CJ, Diao Q, Fu Z, Dai P. 2019. Effects of *Tropilaelaps mercedesae* on midgut bacterial diversity of *Apis mellifera*. Exp Appl Acarol. 79(2):169–186. doi:10.1007/s10493-019-00424-x.

Marín-García PJ, Peyre Y, Ahuir-Baraja AE, Garijo MM, Llobat L. 2022. The Role of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in Honey Bee Colony Losses and Current Insights on Treatment. Vet Sci. 9(3). doi:10.3390/vetsci9030130.

Martínez JL. 2018. Principales enfermedades de las abejas. 4th ed. Ministerio de Agricultura P y A, editor. Espanha.

Martín-Hernández R, Botías C, Bailón EG, Martínez-Salvador A, Prieto L, Meana A, Higes M. 2012. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environ Microbiol.* 14(8):2127–2138. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02645.x.

Martín-Hernández R, Meana A, Prieto L, Salvador AM, Garrido-Bailón E, Higes M. 2007. Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl Environ Microbiol.* 73(20):6331–6338. doi:10.1128/AEM.00270-07.

McArt S. 2021. Parasite Transmission Between Hives and Spillover to Non-Apis Pollinators. In: Kane TR, Faux CM, editors. *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner*. Wiley. p. 211–228. [accessed 2022 Jun 28]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781119583417>.

Meixner MD, Francis RM, Gajda A, Kryger P, Andonov S, Uzunov A, Topolska G, Costa C, Amiri E, Berg S, et al. 2014. Occurrence of parasites and pathogens in honey bee colonies used in a European genotype-environment interactions experiment. *J Apic Res.* 53(2):215–229. doi:10.3896/IBRA.1.53.2.04.

Murilhas A. 2009. Honey bee diseases and colony losses in Portugal: Results from the last nationwide survey [abstract] In: 4th COLOSS Conference – Zagreb, Croatia, 3-4 March 2009. [accessed 2022 Dec 29]. [https://www.bib.irb.hr/386651/download/386651.IV\\_COLOSS\\_Proceedings\\_Zagreb\\_Croatia\\_2009\\_revised.pdf](https://www.bib.irb.hr/386651/download/386651.IV_COLOSS_Proceedings_Zagreb_Croatia_2009_revised.pdf).

Mutinelli F, Montarsi F, Federico G, Granato A, Ponti AM, Grandinetti G, Ferrè N, Franco S, Duquesne V, Rivière M-P, et al. 2014. Detection of *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae.) in Italy: outbreaks and early reaction measures. *J Apic Res.* 53(5):569–575. doi:10.3896/IBRA.1.53.5.13.

Neumann P, Elzen PJ. 2004. The biology of the small hive beetle (*Aethina tumida*, Coleoptera: Nitidulidae): Gaps in our knowledge of an invasive species. *Apidologie.* 35(3):229–247. doi:10.1051/apido:2004010.

Nikita, Grover A, Kalia P, Sinha R, Garg P. 2022. Colony collapse disorder: A peril to apiculture. *Journal of Applied and Natural Science.* 14(3):729–739. doi:10.31018/jans.v14i3.3502.

NOAA [National Oceanic and Atmospheric Administration]. 2021 Mar. Meteorological Versus Astronomical Seasons. NOAA. [accessed 2022 Nov 23]. <https://www.ncei.noaa.gov/news/meteorological-versus-astronomical-seasons>.

Noël A, le Conte Y, Mondet F. 2020. *Varroa destructor*: how does it harm *Apis mellifera* honey bees and what can be done about it? *Emerg Top Life Sci.* 4(1):45–57. doi:10.1042/ETLS20190125.

Observatório do Ordenamento do Território e Urbanismo. 2020. Carta de Uso e Ocupação Do Solo em Portugal Continental.

OIE [World Organisation for Animal Health]. 2018a. Acarapisosis on Honey Bees (Infestation of Honey Bees with *Acarapis woodi*). In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018*. p. 712–718.

OIE [World Organisation for Animal Health]. 2018b. Infestation of Honey Bees with *Tropilaelaps* spp. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018. p. 765–776.

OIE [World Organisation for Animal Health]. 2018c. Infestation of Honey bees with *Aethina tumida* (Small hive beetle). In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018. p. 750–764.

OIE [World Organisation for Animal Health]. 2018d. Nosemosis of Honey Bees. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018. p. 744–749.

OIE [World Organisation for Animal Health]. 2018e. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals . 8th ed. Paris.

OIE [World Organisation for Animal Health]. 2021. Varroosis of honey bees (Infestation of honey bees with *Varroa* spp.). In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2021. p. 3–13.

ONU [Organização das Nações Unidas]. 2022. The Sustainable Development Goals Report.

OPERA Research Center. 2013. Bee health in Europe - Facts & Figures 2013. [www.operaresearch.eu](http://www.operaresearch.eu).

Orantes Bermejo F, García Fernández P. 1997. Nosema disease in the honey bee (*Apis mellifera* L) infested with varroa mites in southern Spain. *Apidologie*. 28(3–4):105–112.

Orantes Bermejo FJ, González Megías A, García Fernández P. 1996. Prevalence of parasitization by Diptera in *Apis mellifera* L in southern Spain. *Apidologie*. 27:467–471. [accessed 2022 Dec 21]. [https://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/1996/06/Apidologie\\_0044-8435\\_1996\\_27\\_6\\_ART0005.pdf](https://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/1996/06/Apidologie_0044-8435_1996_27_6_ART0005.pdf).

Pakwan C, Kaltenpoth M, Weiss B, Chantawannakul P, Jun G, Disayathanoowat T. 2018. Bacterial communities associated with the ectoparasitic mites *Varroa destructor* and *Tropilaelaps mercedesae* of the honey bee (*Apis mellifera*). *FEMS Microbiol Ecol*. 94(1). doi:10.1093/femsec/fix160.

Pascoal MAA. 2012. Avaliação da eficácia de nova estratégia de combate à varroose da abelha (*Apis mellifera*) em Portugal: tratamento combinado de acaricidas homologados. [Dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. [accessed 2022 Nov 28] <http://hdl.handle.net/10400.5/4947>.

Peck DT. 2021. The Parasitic Mite *Varroa destructor*: History, Biology, Monitoring, and Management. In: Kane TR, Faux CM, editors. *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner*. Wiley. p. 235–251. [accessed 2022 Jun 28]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781119583417>.

del Piccolo F, Nazzi F, Vedova GD, Milani N. 2010. Selection of *Apis mellifera* workers by the parasitic mite *Varroa destructor* using host cuticular hydrocarbons. *Parasitology*. 137(6):967–973. doi:10.1017/S0031182009991867.

Pinto MA, Henriques D, de Miranda J, Martín-Hernandez R, Mafra I, Amaral J. 2019 Dec. Projecto BEEHAPPY - Sanidade da abelha melífera (*Apis mellifera* L.) dos Açores: comparação dos padrões epidemiológicos num laboratório natural único. *O Apicultor*.

[accessed 2022 Dec 20]. <https://pub.epsilon.slu.se/24636/1/2019Pinto-BeeHappy%20project%20Portuguese%20beekeepers.pdf>.

Pires S, Cadavez V, Valério MJ. 2011. Prevalence and geographical distribution of *Senotainia tricuspis* (Meigen). [abstract]. Buenos Aires: World Organisation for Animal Health (OIE), Apimondia. Standing Commission for Bee Health. [accessed 2022 Dec 21]. <http://hdl.handle.net/10198/6706>.

Pires S, Murilhas A, Russo P, Valério MJ, Gonçalves M. 2013. Relatório final PAN Portugal, Apicultura e Nosema [abstract]. FNAP [Federação Nacional de Apicultores Portugueses]. [accessed 2022 Dec 27]. <http://hdl.handle.net/10198/11032>.

Pires SMA, Pereira O, Maia M. 2005. Current effectiveness of amitraz against *Varroa* in Portugal [abstract]. Scientific Programme Apimondia Ireland. [accessed 2022 Dec 15]. <http://hdl.handle.net/10198/5893>.

Quinaz Romana G, Kislaya I, Salvador MR, Gonçalves SC, Nunes B, Dias C. 2019. Multimorbidade em Portugal: Dados do Primeiro Inquérito Nacional de Saúde com Exame Físico. *Acta Med Port.* 32(1):30–37. doi:10.20344/amp.11227.

Remnant EJ, Mather N, Gillard TL, Yagound B, Beekman M. 2019. Direct transmission by injection affects competition among RNA viruses in honeybees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.* 286(1895). doi:10.1098/rspb.2018.2452.

Rennie J. 1921. (4) Isle of Wight Disease in Hive Bees—Acarine Disease: The Organism associated with the Disease — *Tarsonemus woodi*, n. sp. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh.* 52(4):768–779. doi:10.1017/S0080456800016008.

Retschnig G, Williams G, Schneeberger A, Neumann P. 2017. Cold Ambient Temperature Promotes *Nosema* spp. Intensity in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Insects.* 8(1):20. doi:10.3390/insects8010020.

Rocha MT, Mira Delgado L. 1986. *Senotainia tricuspis* em Portugal. *Rep Trab LNIV.* 18:67–70.

Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B. 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *J Invertebr Pathol.* 103(SUPPL. 1):S96–S119. doi:10.1016/j.jip.2009.07.016.

Sammataro D, Gerson U, Needham G. 2000. PARASITIC MITES OF HONEY BEES: Life History, Implications, and Impact. *Annu Rev Entomol.* 45:519–548. [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org).

Seeley TD, Smith ML. 2015. Crowding honeybee colonies in apiaries can increase their vulnerability to the deadly ectoparasite *Varroa destructor*. *Apidologie.* 46(6):716–727. doi:10.1007/s13592-015-0361-2.

Silva DAD. 2021. Estudo Sanitário de um Apiário da Região Centro Portugal- identificação, monitorização e controlo dos principais agentes etiológicos. [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. [accessed 2022 Nov 28]. <http://hdl.handle.net/10400.5/21224>.

Silva MJV. 2014. The First Report Of *Aethina tumida* In The European Union, Portugal, 2004 . *Bee World.* 91(4):90–91. doi:10.1080/0005772x.2014.11417619.

Traver BE, Williams MR, Fell RD. 2012. Comparison of within hive sampling and seasonal activity of *Nosema ceranae* in honey bee colonies. *J Invertebr Pathol.* 109(2):187–193. doi:10.1016/j.jip.2011.11.001.

Traynor KS, Mondet F, de Miranda JR, Techer M, Kowallik V, Oddie MAY, Chantawannakul P, McAfee A. 2020. *Varroa destructor*: A Complex Parasite, Crippling Honey Bees Worldwide. *Trends Parasitol.* 36(7):592–606. doi:10.1016/j.pt.2020.04.004. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.004>.

Tsuruda JM, Chakrabarti P, Sagili RR. 2021. Honey Bee Nutrition. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 37(3):505–519. doi:10.1016/j.cvfa.2021.06.006.

vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen Y, et al. 2009. Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS One.* 4(8). doi:10.1371/journal.pone.0006481.

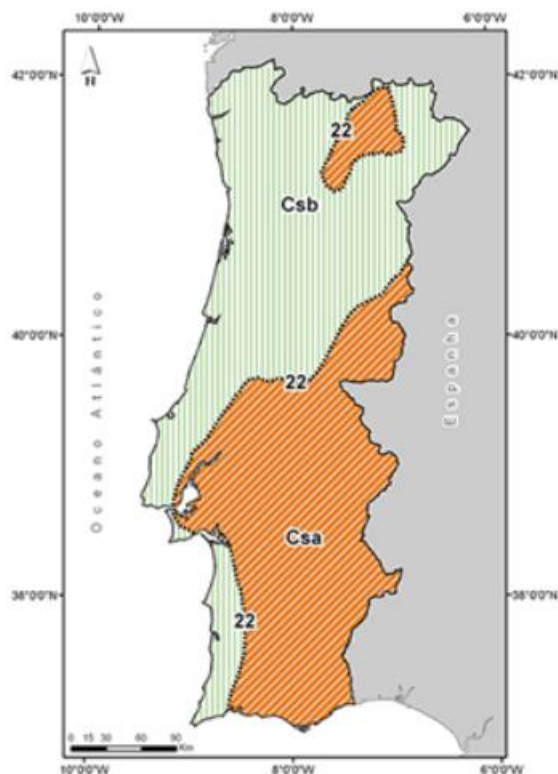
Vilas-Boas M. 2008. *Manual de Apicultura em Modo de Produção Biológica*. FNAP - Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, editor.

Wilson-Rich N, Spivak M, Fefferman NH, Starks PT. 2009. Genetic, Individual, and Group Facilitation of Disease Resistance in Insect Societies. *Annu Rev Entomol.* 54(1):405–423. doi:10.1146/annurev.ento.53.103106.093301.

WOAH [World Organisation for Animal Health]. c2020. Events Manangement. WAHIS [World Animal Health Information System]. [accessed 2023 Feb 9]. <https://wahis.woah.org/#/event-management>.

## 10. Anexos

### Anexo 1 – Clima em Portugal Continental (Fonte: IPMA c2023a)



Csa - clima temperado com Inverno chuvoso e Verão seco e quente

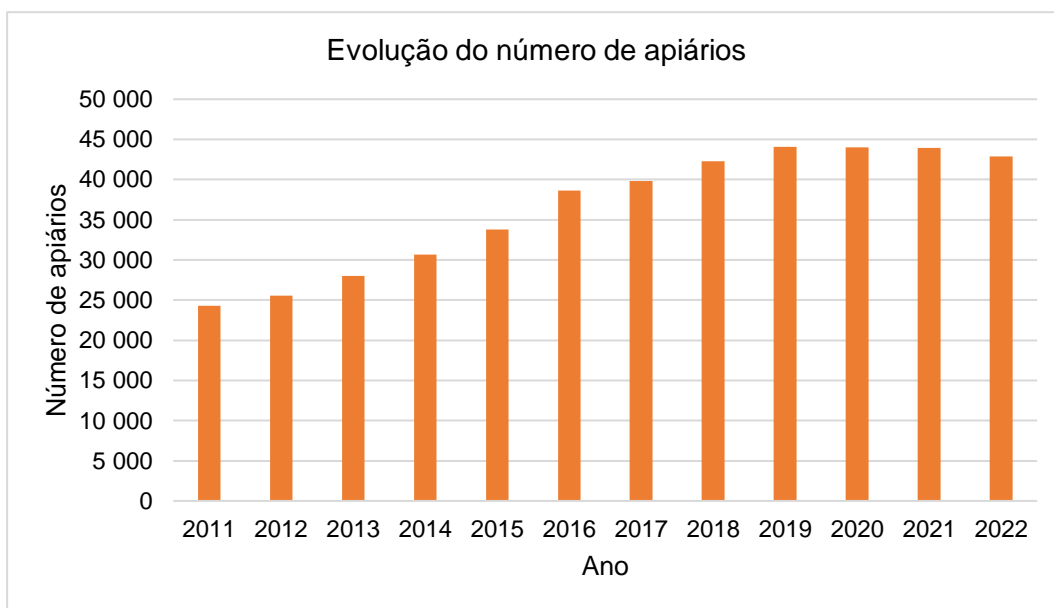
Csb - clima temperado com Inverno chuvoso e Verão seco e pouco quente

### Anexo 2 - Épocas de floração de algumas espécies de flora melífera.

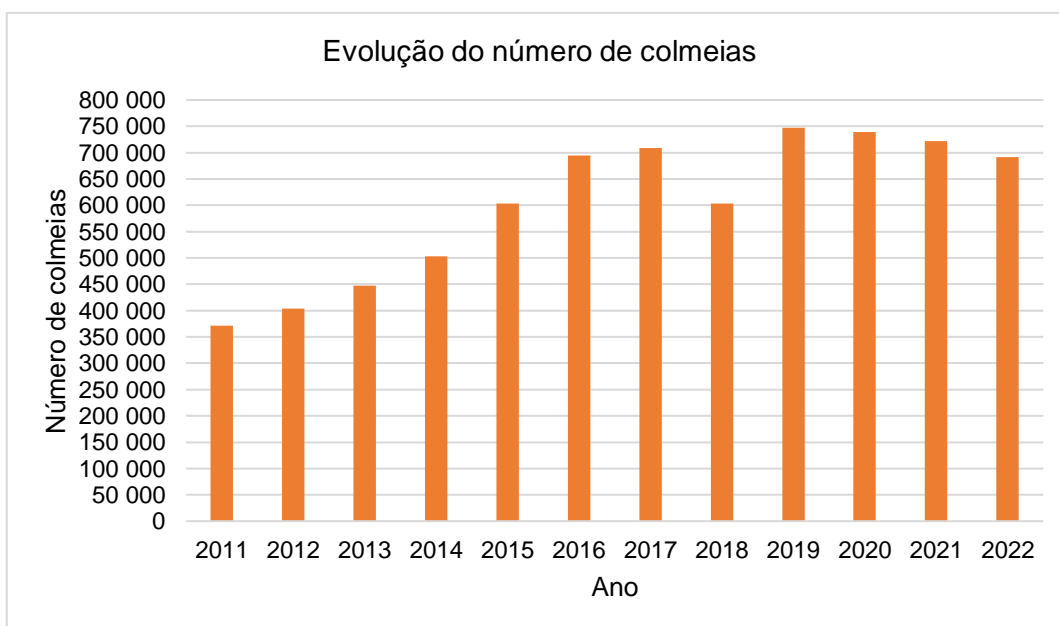
Fonte: adaptado de FNAP (2017).

Floração	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Urze ( <i>Erica umbellata</i> )												
Castanheiro ( <i>Castanea sativa</i> )												
Eucalipto ( <i>Eucaliptus globulus</i> )												
Rosmaninho ( <i>Lavandula stoechas</i> )												
Soagem ( <i>Echium plantagineum</i> )												
Girassol ( <i>Helianthus annuus</i> )												
Laranjeira ( <i>Citrus sinensis</i> )												
Medronheiro ( <i>Arbutus unedo</i> )												
Alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> )												
Cardo ( <i>Carlina racemosa</i> )												

**Anexo 3 - Evolução do número de apiários em Portugal, desde 2011 a 2022. Fonte: IFAP (2022).**



**Anexo 4 - Evolução do número de colmeias em Portugal, desde 2011 a 2022. Fonte: IFAP (2022).**



**Anexo 5 - Efetivo apícola português, por região, em 2021. Fonte: IFAP (2022).**

<b>Região</b>	<b>Apiários</b>		<b>Colmeias</b>		<b>Colónias</b>	
<b>Norte</b>	11 780	26,8%	251 242	34,8%	254 705	34,7%
<b>Centro</b>	13 501	30,7%	185 012	25,6%	190 266	25,9%
<b>Lisboa e Vale do Tejo</b>	826	1,9%	12 384	1,7%	12 728	1,7%
<b>Alentejo</b>	7 908	18,0%	152 549	21,1%	154 680	21,0%
<b>Algarve</b>	8 331	19,0%	103 525	14,3%	104 544	14,2%
<b>RA Açores</b>	903	2,1%	7 535	1,0%	7 819	1,1%
<b>RA Madeira</b>	677	1,5%	9 620	1,3%	10 099	1,4%
<b>Total</b>	43 926	100,0%	721 867	100,0%	734 841	100,0%

**Anexo 6 - Efetivo apícola português, por região, em 2022. Fonte: IFAP (2022).**

<b>Região</b>	<b>Apiários</b>		<b>Colmeias</b>		<b>Colónias</b>	
<b>Norte</b>	11 631	27,13%	236 733	34,24%	240 160	34,16%
<b>Centro</b>	13 160	30,70%	182 981	26,47%	187 671	26,69%
<b>Lisboa e Vale do Tejo</b>	720	1,68%	10 811	1,56%	11 092	1,58%
<b>Alentejo</b>	7 801	18,20%	148 230	21,44%	149 934	21,33%
<b>Algarve</b>	8 013	18,69%	95 094	13,76%	95 966	13,65%
<b>RA Açores</b>	830	1,94%	7 325	1,06%	7 634	1,09%
<b>RA Madeira</b>	710	1,66%	10 149	1,47%	10 623	1,51%
<b>Total</b>	42 865	100,00%	691 323	100,00%	703 080	100,00%

**Anexo 7 – Folha de registos de observações durante o processo de análise.**



**PESQUISA DE AGENTES INFECCIOSOS  
EM MATERIAL APÍCOLA  
(TECNICA DE OBSERVAÇÃO DIRETA E MICROSCOPIA ÓPTICA)**

Data do início do ensaio: \_\_\_\_\_

ABELHAS (Tórax)	ETAPAS	<input type="checkbox"/>	OBSERVAÇÃO	TECNICO
	1. Observação direta			
	2. Retirar a cabeça e o primeiro par de patas e cortar uma fatia de tórax			
	3. Colocar numa caixa de petri com acido lactico			
	4. Colocar a fatia em papel absorvente e deixar repousar			
	5. Esmagar a fatia de tórax entre duas lâminas			
	6. Fixar os bordos das lâminas com fita cola			
	7. Observação microscópica (objetiva 4x e/ou10x)			
ABELHAS (Abdómen)	1. Macerar num almofariz 30 abdómenes em 15ml de agua destilada			
	2. Deixar repousar			
	3. Retirar uma gota do sobrenadante, colocar sobre uma lâmina e cobrir com uma lamela			
	4. Observação ao microscópico ótico (40x)			

FAVOS	ETAPAS	<input type="checkbox"/>	OBSERVAÇÃO	TECNICO
	1. Distribuição homogénea da criação			
	2. Observação dos opérculos			
	3. Observação da criação aberta			
	4. Observação da criação fechada			
	5. Observação de larvas putrefactas e/ou filantes			
	6. Observação de larvas mumificadas ou em processo de mumificação			
	7. Mel fermentado dentro do alvéolo (na periferia do quadro)			
8. Outros				

Coloração utilizada  Não  Sim Qual?

CARTOLINAS	ETAPAS	<input type="checkbox"/>	OBSERVAÇÃO	TECNICO
	1. Observação direta			

RESULTADOS		
ABELHAS	FAVOS	CARTOLINAS
Negativo <input type="checkbox"/>	Negativo <input type="checkbox"/>	Negativo <input type="checkbox"/>
Varroa destructor <input type="checkbox"/>	Varroa destructor <input type="checkbox"/>	Varroa destructor <input type="checkbox"/>
Brasula spp. <input type="checkbox"/>	Loque americana <input type="checkbox"/>	Brasula spp. <input type="checkbox"/>
Sanotomina tricuspis <input type="checkbox"/>	Loque europeia <input type="checkbox"/>	Ascospheara spp. <input type="checkbox"/>
Nosema spp. <input type="checkbox"/>	Ascospheara spp. <input type="checkbox"/>	Aethina tumida <input type="checkbox"/>
Aethina tumida <input type="checkbox"/>	Aethina tumida. <input type="checkbox"/>	Tropilaelaps spp <input type="checkbox"/>
Tropilaelaps spp <input type="checkbox"/>	Tropilaelaps spp <input type="checkbox"/>	Outros <input type="checkbox"/>
Acarapis woodi <input type="checkbox"/>	Brasula spp. <input type="checkbox"/>	
Outros <input type="checkbox"/>	Outros <input type="checkbox"/>	

VALIDADO EM \_\_\_\_\_

TECNICO RESPONSÁVEL PELO ENSAIO \_\_\_\_\_

# Bee or not to Bee? Present and future of Portugal's honeybee colonies

Mariana Campos<sup>1,2\*</sup>, Maria José Valério<sup>3</sup>, Isabel Pereira da Fonseca<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Center for Interdisciplinary Research in Animal Health. Faculty of Veterinary Medicine. University of Lisbon. 1300-477 Lisboa, Portugal; <sup>2</sup>Associated Laboratory for Animal and Veterinary Sciences (AL4SAnimalS); <sup>3</sup>Bee Health Laboratory. National Institute of Agricultural and Veterinary 1300-596 Lisboa, Portugal; \*e-mail address: [marianacampos1511@gmail.com](mailto:marianacampos1511@gmail.com)

## INTRODUCTION

Pollination is crucial to maintain the balance in the ecosystems and food chains. Along with other insects, mammals, and birds, bees ensure balance in ecosystems, promoting biodiversity. In addition, food quality and safety strongly depend on these agents. It's estimated that about 5 to 8% of the crops of vegetables and fruits essential for human consumption worldwide would be lost without their activity. *Apis mellifera* is the most efficient and relevant pollinating insect, being an indispensable agent in the terrestrial ecosystem, for human survival and economic prosperity. In recent decades, the decline of pollinating insects and, particularly, the bee *Apis mellifera* has been evident. Since the beginning of the XXI century, colonies have died on a large scale around the world. This phenomenon with no apparent cause was named Colony Collapse Disorder. Despite the mystery surrounding this phenomenon, some biotic and abiotic causes that act in a synergistic and complex way are pointed out, namely the presence of pathogens such as *Varroa* spp. and *Nosema* spp., climate change, loss of biodiversity and habitats and, consequently, lack of food sources and pesticides. Bearing in mind the importance of these insects, is urgent to ensure their health.



Fig.1. Honeybee (*Apis mellifera*). Source: Kane and Faux (2021).

## OBJECTIVES

The aim of this project was to understand the health status of the Portuguese honeybees by evaluating the pathogens' prevalence, specifically, *Varroa destructor*, *Aethina tumida*, *Nosema* spp., *Tropilaelaps* spp., *Acarapis woodi*, *Senotainia tricuspis* and *Braula coeca*. The project took place in the first semester of 2022.

## MATERIALS AND METHODS

### Sampling

A total of 823 samples of adult bees (550 collected in 2021 and 273 from January to June of 2022) were sent to the Honeybee Pathology Laboratory, coming from continental Portugal and Azores islands. Each sample included 30-50 individuals.

### Methods

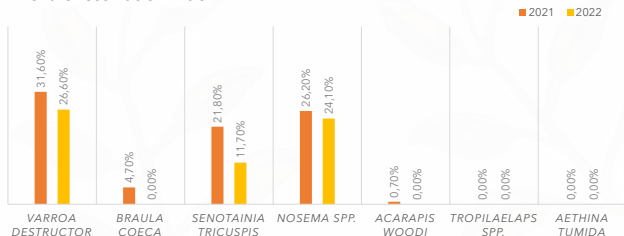
The diagnosis of the different pathogens was achieved recurring to macroscopic and microscopic methods adopted by the Honeybee Pathology Laboratory, which are described in detail in Costa (2021).

Fig. 2. 1 - *Braula coeca*; 2 - *Nosema* spp.; 3 - *Aethina tumida*; 4 - *Tropilaelaps* spp.; 5 - *Acarapis woodi*; 6 - *Senotainia tricuspis*; 7 - *Varroa destructor*. Original photos.



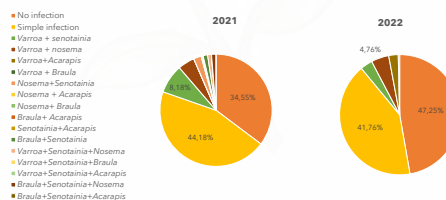
## RESULTS

### Prevalences nationwide



Graph.1. Prevalence of the pathogens in the years of 2021 and 2022, in Portugal.

### Type of infection



Graph.2 and 3. Type of infection, by year.

### Prevalences by region

Region	<i>Varroa destructor</i>		<i>Braula coeca</i>		<i>Senotainia tricuspis</i>		<i>Nosema</i> spp.		<i>Acarapis woodi</i>		<i>Tropilaelaps</i> spp.		<i>Aethina tumida</i>		Total of samples	
	2021	2022	2021	2022	2021	2022	2021	2022	2021	2022	2021	2022	2021	2022	2021	2022
Norte	43.2%	29.4%	0.0%	0.0%	38.6%	9.2%	38.6%	24.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	44	109
Centro	18.7%	23.6%	0.0%	0.0%	31.7%	14.0%	11.1%	17.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	252	157
Lisboa e Vale do Tejo	35.7%	50.0%	0.0%	0.0%	28.6%	0.0%	25.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	28	2
Alentejo	50.7%	25.0%	0.0%	0.0%	22.9%	0.0%	14.6%	0.0%	0.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	144	4
Algarve	58.6%	100.0%	0.0%	0.0%	58.6%	0.0%	27.6%	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	29	1
Azores	0.0%	No data	49.1%	No data	41.5%	No data	22.6%	No data	5.7%	No data	0.0%	No data	0.0%	No data	53	0
Madeira															0	0

Tab.1. Prevalence of the pathogens, by region, in the years of 2021 and 2022, in Portugal.

## DISCUSSION AND CONCLUSIONS

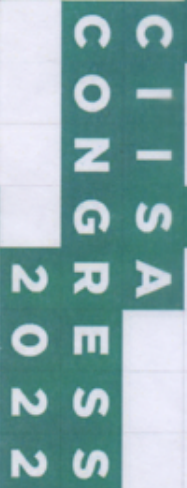
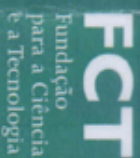
- The mite *Varroa destructor* was the main threat to *Apis mellifera*'s health in Portugal.
- The most common mixed infection in 2021 was *Varroa destructor* in association with *Senotainia tricuspis*, whereas in 2022 was the combination of *Varroa destructor* and *Nosema* spp..
- There were no positive results to *Varroa destructor* in the Azores Islands. Furthermore, this was the only region positive to the fly *Braula coeca* and the mite *Acarapis woodi*.
- The small sample size from Azores Islands and the absence of samples from Madeira Islands jeopardizes the evaluation of the Portuguese honeybee sanitary status.
- Coleopteran *Aethina tumida* and mite *Tropilaelaps* spp., emerging honeybee sanitary threats, were not detected.
- Due to the declining of the honeybee colonies worldwide, we stress the importance of continuing to collect and analyze national bee samples to better monitor the health of Portuguese colonies.

## REFERENCES

- Costa G. (2021). Rastreo de agentes patogénicos em *Apis mellifera* nas regiões Norte e Centro de Portugal. [dissertação de mestrado]. Universidade de Lisboa. <https://hdl.handle.net/10316/521221>
- Etxebarria-Legarreta, O., & Sanchez-Famoso, V. (2022). The Role of Beekeeping in the Generation of Goods and Services: The Interrelation between Environmental, Socioeconomic, and Sociocultural Utilities. *Agriculture*, 12(4), 551. <https://doi.org/10.3390/agriculture12040551>
- Gallaghi, R., Valencáková, A., Sušik, M., & Kandršáková, P. (2021). Nosema disease of european honey bees. *Journal of Fungi*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/f7090714>
- Kane, T. R., & Faux, C. M. (Eds.). (2021). *Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119583417>
- Khalifa, S. A. M., Elshafey, E. H., Shehata, A. A., El-Wahed, A. A. A., Algethami, A. F., Mueharrar, S. G., Alajmi, M. F., Zhao, C., Masry, S. H. D., Abdel-Daim, M. M., Halabi, M. F., Kai, G., Al Naggar, Y., Bishr, M., Diab, M. A. M., & El-Seedi, H. R. (2021). Overview of bee pollination and its economic value for crop production. *Insects*, 12(8), 1-23. <https://doi.org/10.3390/insects12080488>
- vanEngelsdorp, D., Evans, J. D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B. K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarry, D. R., & Pettis, J. S. (2009). Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS ONE*, 4(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>

## ACKNOWLEDGMENTS/FUNDING

- UIDB/00276/2020 (CIISA)
- LA/P/0059/2020 (AL4SAnimalS)
- MSC22Jul-08.



**INNOVATION IN ANIMAL, VETERINARY  
AND BIOMEDICAL RESEARCH  
BEST POSTER PRESENTATION  
BY A MSc STUDENT**

*Mariana Campos*

Awarded at CIISA Congress 2022 "Innovation in Animal, Veterinary and Biomedical Research" held at Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, 11-12 November 2022

*António Duarte*

António Duarte  
CIISA Coordinator