



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
Y DE LA AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO AGROPECUARIO**

**TEMA: ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE *Nosema* sp. EN
APIARIOS DE LAS PROVINCIAS DE CARCHI, IMBABURA Y
PICHINCHA – ECUADOR, MEDIANTE MICROSCOPIA DE
FLUORESCENCIA**

AUTOR: FUENTES HIDALGO LUIS ALFREDO.

DIRECTOR: Dr. RON ROMÁN, JORGE Ph.D.

SANGOLQUÍ

2017



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
Y DE LA AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “*ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE Nosema sp. EN APIARIOS DE LAS PROVINCIAS DE CARCHI, IMBABURA Y PICHINCHA – ECUADOR, MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLOURESCENCIA*” realizado por el señor **FUENTES HIDALGO LUIS ALFREDO**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar al señor **FUENTES HIDALGO LUIS ALFREDO** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 14 de Septiembre del 2017



Dr. Jorge Ron Román Ph.D.

DIRECTOR



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
Y DE LA AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **LUIS ALFREDO FUENTES HIDALGO**, con cédula de identidad N° 171962641-6, declaro que este trabajo de titulación "**ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE *Nosema* sp. EN APIARIOS DE LAS PROVINCIAS DE CARCHI, IMBABURA Y PICHINCAHA - ECUADOR, MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLOURESCENCIA**" ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 14 de Septiembre del 2017

FUENTES HIDALGO LUIS ALFREDO

C.C 171962641-6



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN

Yo, **FUENTES HIDALGO LUIS ALFREDO**, autorizo a la Universidad de las Fuerza Armadas – ESPE, publicar en la biblioteca Virtual de la Institución el presente trabajo de titulación “**ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE *Nosema* sp. EN APIARIOS DE LAS PROVINCIAS DE CARCHI, IMBABURA Y PICHINCHA – ECUADOR, MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA**” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 14 de Septiembre del 2017



FUENTES HIDALGO LUIS ALFREDO

C.C 171962641-6

DEDICATORIA

A Dios, ya que sin sus bendiciones y su guía constante no habría sido posible llegar hasta donde lo he hecho, Él me ha mantenido firme y sin titubear en mí esfuerzo diario por ir alcanzando uno a uno todos mis sueños.

A mis Padres, mí adorada Albita y mi querido Marcelo, quienes con su incesante apoyo y ejemplo supieron brindarme los sólidos valores de la honradez, la perseverancia y el trabajo; valores que me permitirán convertirme a lo largo de los años en un excelente ser humano y en un profesional de calidad.

Con el corazón a mi hermana Daniela y mi hermano David, por ser dos de los motivos para alcanzar todas las metas que me he propuesto en la mí vida, los quiero mucho.

A mi amada mamita María Cleofé, quien como una verdadera madre me brindó su amor y cariño, demostrándome siempre que la vida está llena de ángeles que sin pedir nada a cambio te brindan la oportunidad de descubrir el amor de Dios a tú alrededor.

A mi querido abuelito Luis Gonzalo, por su apoyo incondicional, sus acertados consejos sobre la vida y su digno ejemplo a seguir.

A mi amada Karina quien a lo largo de todos estos años de haber compartido todos nuestros sueños y anhelos me ha brindado su amor, apoyo, comprensión y confianza, lo cual ha permitido que el gran esfuerzo realizado sea mucho más llevadero.

A mi adorado Jesús Alfredo, la bendición de mi vida, para mí su sola existencia encendió la luz del camino para seguir adelante sin importar el esfuerzo que tenga que hacer ni las vicisitudes que tenga que sortear para brindarte la vida que te mereces hijo adorado.

Luis A. Fuentes

AGRADECIMIENTOS

Muy especiales a mi abuelita Esther y mi tía Mónica, por siempre estar ahí conmigo en los momentos más difíciles de mi vida, dándome una palabra de aliento y su apoyo incondicional.

Con todo cariño a cada uno de los integrantes de la familia Gualotuña Cumbajín, por abrirme las puertas de su hogar y acogerme como uno más de ustedes, su apoyo constante y su preocupación por mi bienestar y el de mi familia me han demostrado todo su cariño.

Con inmenso respeto y admiración al Doctor Jorge Ron Román, ya que como un verdadero "padre" me brindó su confianza, sus enseñanzas, su paciencia y su tiempo en el desarrollo de este importante trabajo científico; su apoyo y buen humor ha sido un gran e importante aliciente para seguir adelante en el trabajo diario y con miras de continuar el camino de la investigación científica.

Especial a la Doctora María Augusta Chávez, por su preocupación, confianza y apoyo en la realización de este trabajo de titulación, su tenacidad y nivel de exigencia demuestran que si queremos hacer algo importante en la vida debemos hacerlo bien.

De manera especial a mis compañeros Jorge y Christian por su colaboración a lo largo del trabajo realizado tanto en el campo como en los laboratorios, además a sus familias por abrirme las puertas de sus hogares y acogerme de la mejor manera durante la realización de este trabajo investigativo.

A todos los apicultores que de manera desinteresada y cooperativa contribuyeron al desarrollo del presente trabajo y de manera especial a la Señora Sonia Gálvez (Presidenta de ADAPI), por su colaboración y total apertura a las iniciativas que van en busca del crecimiento del sector apícola en el país.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA

CERTIFICACIÓN	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Justificación.....	3
1.3 Planteamiento del problema	4
1.3.1 Problema.....	4
1.3.2 Causas.....	5
1.3.3 Efectos	5
1.4 Objetivos	5
1.4.1 Objetivo general	5
1.4.2 Objetivos específicos.....	6
1.5 Hipótesis.....	6

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

7

2.1	El rol de los polinizadores, en la seguridad alimentaria en el mundo...	7
2.1.1	Tipos de polinizadores	8
2.1.1.1	Insectos.....	8
2.1.1.1.1	Dípteros	8
2.1.1.1.2	Lepidópteros.....	9
2.1.1.1.3	Coleópteros.....	9
2.1.1.1.4	Himenópteros	9
2.1.2	<i>Apis Mellifera</i>	10
2.2	Problemática en la desaparición de polinizadores.....	10
2.2.1	Enfermedades	11
2.2.1.1	Bacterianas	12
2.2.1.1.1	Loque Americana	12
2.2.1.1.1.1	Síntomas	12
2.2.1.1.2	Loque Europea	12
2.2.1.1.2.1	Síntomas	13
2.2.1.2	Virales	13
2.2.1.2.1	Cría ensacada.....	13
2.2.1.2.1.1	Síntomas	13
2.2.1.3	Parasitarias	13
2.2.1.3.1	Varroasis.....	13
2.2.1.3.1.1	Síntomas	14
2.2.1.3.2	Acariosis.....	14
2.2.1.3.2.1	Síntomas	15
2.2.1.4	Micóticas	15

2.2.1.4.1	Ascosporesis o Cría Yesificada	15
2.2.1.4.1.1	Síntomas	15
2.2.1.4.2	Aspergilosis	16
2.2.1.4.2.1	Síntomas	16
2.2.1.4.3	Nosemosis	16
2.2.1.4.3.1	Síntomas	17
2.2.2	Contaminación medio ambiental por pesticidas.....	17
2.3	Apicultura en el Ecuador	18
2.3.1	Reseña histórica.....	18
2.3.2	Situación actual de la apicultura en Ecuador	19
2.3.2.1	Número de apiarios, colmenas y promedio de producción	19
2.4	La nosemosis, como enfermedad de notificación obligatoria en apicultura.....	19
2.4.1	Agente causal	20
2.4.1.1	Agentes etiológicos y patogenia.....	20
2.4.1.2	Agentes patógenos causantes de Nosemosis	21
2.4.1.3	Antecedentes de <i>Nosema</i> spp	22
2.4.1.4	Clasificación Taxonómica.....	23
2.4.1.5	Morfología del Parásito	23
2.4.1.6	Ciclo biológico de <i>Nosema</i> spp y desarrollo de la enfermedad	24
2.4.1.7	Factores de riesgo y transmisión de la enfermedad.....	26
2.4.1.8	Sintomatología y efectos provocados por Nosemosis.....	27
2.4.1.9	Diagnóstico de la enfermedad	29
2.4.1.9.1	Microscopía Óptica	29
2.4.1.9.2	Índice de infestación.....	30
2.4.1.9.3	Tinciones	30

2.4.1.9.3.1	Tinción Giemsa	30
2.4.1.9.3.2	Inmunofluorescencia indirecta	31
2.4.2	Métodos de control y tratamiento.....	32
2.5	Situación de la Nosemosis.....	33
2.5.1	En el mundo	33
2.5.2	América Latina.....	35
2.5.3	Ecuador.....	36

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA		38
3.1	Ubicación de los lugares de investigación	38
3.1.1	Ubicación Política	38
3.1.2	Ubicación Geográfica.....	39
3.1.3	Ubicación Ecológica	39
3.2	Materiales	40
3.2.1	Materiales utilizados en el campo	40
3.2.1.1	Geo-referenciación de apiarios y factores de riesgo	40
3.2.1.2	Muestreo de colmenas	40
3.2.1.3	Materiales de laboratorio.....	40
3.2.1.4	Reactivos	41
3.2.1.5	Equipos.....	41
3.3	Métodos.....	42
3.3.1	Levantamiento de información base y contacto con apicultores.....	42
3.3.2	Muestreo.....	42
3.3.2.1	Geo-referenciación de apiarios, aplicación de encuesta epidemiológica y muestreo de colmenas.....	42

3.3.2.2	Geo-referenciación de apiarios utilizando la aplicación EpiCollect 5	43
3.3.3	Estimación del tamaño y selección de la muestra	44
3.3.3.1	Cálculos realizados para la obtención del número de muestras	45
3.3.4	Colecta de muestras	49
3.3.5	Fase de laboratorio	50
3.3.5.1	Pruebas diagnósticas	50
3.3.5.1.1	Microscopía óptica	50
3.3.5.1.1.1	Preparación de muestras	50
3.3.5.2	Estimación de la concentración de Esporas mediante el uso del hematocitómetro	51
3.3.5.3	Tinción Giemsa	54
3.3.5.3.1	Preparación de muestras	54
3.3.5.4	Microscopía de Inmunofluorescencia Indirecta	54
3.3.5.4.1	Preparación de muestras	55
3.3.6	Interpretación de resultados	56
3.3.6.1	Microscopía óptica	56
3.3.6.2	Conteo de esporas mediante el uso del hematocitómetro	56
3.3.7	Análisis estadístico de resultados	56
3.3.7.1	Pruebas estadísticas para determinación de diferencias significativas en el cálculo de los resultados por variables	56
3.3.7.2	Aplicación de pruebas estadísticas	57
3.3.7.3	Determinación de factores de riesgo	57

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 58

4.1	Origen geográfico y localización de las muestras	58
-----	--	----

4.2	Descripción de la muestra en función de provincia, cantón, apiario y tipo de colmena	62
4.3	Análisis de la prevalencia de <i>Nosema</i> sp. en la zona bajo estudio.....	64
4.3.1	Determinación de la prevalencia general del <i>Nosema</i> sp.....	64
4.3.2	Presencia de <i>Nosema</i> sp. a nivel de provincia, apiario y cantón.....	65
4.3.3	Distribución de <i>Nosema</i> sp. a nivel de apiario y cantón	66
4.3.4	Distribución de resultados generales en función del nivel de infestación de <i>Nosema</i> sp.	68
4.3.5	Distribución de resultados positivos de <i>Nosema</i> en función del grado de infección a nivel apicultor, apiario y colmenas.....	70
4.3.6	Resultados de la identificación y valoración de los factores de riesgo	72
4.3.6.1	Determinación de los factores de riesgo por apiario	72
4.3.6.1.1	Análisis del factor de riesgo para <i>Nosema</i> sp. por captura de enjambres	73
4.3.6.1.2	Análisis del factor de riesgo presencia de <i>Nosema</i> spp. en relación a la asistencia técnica	73
4.3.6.1.3	Análisis del factor de riesgo presencia de <i>Nosema</i> spp. en relación a la trashumancia de colmenas.....	74
4.4	Resultados de los métodos diagnósticos.	75
4.4.1	Microscopía óptica	76
4.4.2	Tinciones	77
4.4.2.1	Giemsa.....	77
4.4.2.2	Inmunofluorescencia Indirecta	79

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1	Conclusiones	81
5.2	Recomendaciones.....	84
5.3	Bibliografía.....	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Ubicación ecológica de las provincias destinadas para la investigación	39
Tabla 2	Estratificación de los apiarios según el número de colmenas.....	44
Tabla 3	Número de apiarios y colmenas a ser muestreados en la provincia de Pichincha	48
Tabla 4	Número de apiarios y colmenas a ser muestreados en la provincia de Imbabura.....	48
Tabla 5	Número de apiarios y colmenas a ser muestreados en la provincia del Carchi	49
Tabla 6	Niveles del grado de infestación de <i>Nosema</i>	56
Tabla 7	Distribución del número de colmenas muestreadas en función del total de colmenas existentes en los apiarios bajo estudio.....	60
Tabla 8	Distribución de colmenas existentes y muestreadas en función del apicultor.....	60
Tabla 9	Frecuencia de colmenas muestreadas por Provincia y Cantón	62
Tabla 10	Distribución general de colmenas por tipo.....	63
Tabla 11	Distribución de colmenas por el tipo en las provincias intervenidas	63
Tabla 12	Presencia general de <i>Nosema</i> sp. en las colmenas analizadas	64
Tabla 13	Presencia de <i>Nosema</i> por Provincia.....	65
Tabla 14	Distribución de apiarios infectados por provincia.....	66
Tabla 15	Presencia de <i>Nosema</i> sp. a nivel de las colmena ubicadas en cada uno de los cantones de las provincias bajo estudio.....	67
Tabla 16	Frecuencia de colmenas infectadas con <i>Nosema</i> sp. en función del nivel de infestación	68
Tabla 17	Distribución de la presencia de <i>Nosema</i> por apicultor, por apiario y por colmena.....	70
Tabla 18	Distribución de colmenas por apiario con presencia positiva de <i>Nosema</i> según el nivel de infección	72
Tabla 19	Captura de enjambres en los apiarios como factor de riesgo en la presencia de <i>Nosema</i>	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esporas de las dos especies (ap- <i>N. apis</i> , cer- <i>N. ceranae</i>) provenientes de muestras de intestino de abejas.....	22
Figura 2	Esporas de <i>N. ceranae</i> (A) y esporas de <i>N. apis</i> (B).	24
Figura 3	Representación esquemática del ciclo de vida de <i>Nosema</i> sp.	25
Figura 4	Imágenes de intestinos de abejas: lado izquierdo intestino infectado por <i>Nosema</i> sp. y del lado derecho intestino sin infección	28
Figura 5	Distribución mundial de la Nosemosis-.....	34
Figura 6	Cuadrícula del hematocitómetro.....	53
Figura 7	Conteo de esporas en el hematocitómetro	53
Figura 8	Distribución de apiarios en las provincias de Carchi e Imbabura	59
Figura 9	Distribución de apiarios en la provincia de Pichincha.....	59
Figura 10	Esporas de <i>Nosema</i> sp. bajo microscopía óptica con poco paso de luz, aumento de 40x.....	76
Figura 11	Esporas de <i>Nosema</i> sp. bajo microscopía óptica con poco paso de luz, aumento de 40x.....	77
Figura 12	Esporas de <i>Nosema</i> sp. teñidas con el colorante Giemsa, bajo microscopía óptica con poco paso de luz, aumento de 40x.....	77
Figura 13	Esporas de <i>Nosema</i> sp. teñidas con el colorante Giemsa, bajo microscopía óptica con mayor paso de luz, aumento de 40x.	78
Figura 14	Esporas de <i>Nosema</i> sp. marcadas con el colorante Hoesch (tinte de ADN), bajo microscopio de fluorescencia, aumento de 40x.....	79
Figura 15	Esporas de <i>Nosema</i> sp. marcadas con el colorante FB28 (tinte de quitina), bajo microscopio de fluorescencia, aumento de 40x.....	80

RESUMEN

Existe una importante cantidad de enfermedades que afectan a las abejas (*Apis mellifera*) reportadas a nivel mundial, entre las que encontramos a Nosemosis, la cual, no ha sido reportada oficialmente a nivel internacional por el Ecuador, se la considerada como la segunda causa de despoblamiento de colmenas y reducción productiva de las abejas, produce graves alteraciones a nivel intestinal que desencadenan procesos fisiológicos adversos, llegando incluso a acortan su periodo de vida. Con la finalidad de determinar la prevalencia de *Nosema* sp. en apiarios estudiados (n=30) de los existentes (n=222) en las provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha, y encontrar los posibles factores de riesgo en la proliferación del patógeno se elaboró este trabajo, aplicando encuestas epidemiológicas para tratar de inferir los factores de riesgo. Además, se realizó el diagnóstico de la presencia de Nosemosis en los apiarios estudiados, utilizando tres técnicas diagnósticas; una de ellas, microscopía de inmunofluorescencia indirecta. El análisis determinó una prevalencia de *Nosema* sp. a nivel de: provincia 100% (3/3), cantón 90.91% (10/11), apiario 56.67% (17/30) y colmena 23.38% (65/278). Además la georreferenciación de los apiarios permitió generar mapas que posibilitaron conocer las posibles zonas de riesgo tanto de adquisición como de difusión de la enfermedad, debido a la concentración de apiarios. Esperamos que el presente trabajos investigativo, pueda convertirse en un medio de orientación para los apicultores, fomentando también el interés de las autoridades nacionales del Área para la creación de proyectos que permitan la evolución de sectores alternativos de producción.

PALABRAS CLAVE:

- *Nosema* sp.
- NOSEMOSIS
- ABEJAS (*Apis mellifera*)
- INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA
- ECUADOR

ABSTRACT

There is an important amount of diseases that affect the bees (*Apis mellifera*) reported worldwide, among which Nosemosis, which has not been officially reported internationally by Ecuador, is considered the second cause of depopulation of hives and productive reduction of bees, produces serious alterations at the intestinal level that trigger adverse physiological processes, even shortening their life span. In order to determine the prevalence of *Nosema* sp. in apiaries studied (n = 30) of the existing ones (n = 222) in the provinces of Carchi, Imbabura and Pichincha, and to find the possible risk factors in the proliferation of the pathogen this work was elaborated applying epidemiological surveys to try to infer the risk factors. In addition, the diagnosis of the presence of Nosemosis in the apiaries studied was performed using three diagnostic techniques; one of them, indirect immunofluorescence microscopy. The analysis determined a prevalence of *Nosema* sp. at the level of: province 100% (3 // 3), canton 90.91% (10/11), apiary 56.67% (17/30) and hive 23.38% (65/278). In addition, the georeferencing of the apiaries allowed to generate maps that allowed to know the possible risk zones of both acquisition and diffusion of the disease, due to the concentration of apiaries. We hope that the present investigative work can become a means of guidance for beekeepers, also encouraging the interest of the national authorities of the Area for the creation of projects that allow the evolution of alternative sectors of production.

KEYWORDS:

- *Nosema* sp.
- NOSEMOSIS
- BEES (*Apis mellifera*)
- INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE
- ECUADOR

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Las abejas (*Apis mellifera*) son una de las especies zootécnicas más exitosas de todo el reino animal alrededor del mundo, su éxito radica tanto en la generación como en las aplicaciones de productos como: miel, propóleo, polen, cera, jalea real y veneno (apitoxina); los cuales con el paso de los años han brindado grandes beneficios económicos, nutricionales y medicinales para los seres humanos (Schmidt, 1997).

Dentro de los productos apícolas primarios más conocidos están la miel y la cera, la primera como un alimento de consumo directo con importantes propiedades nutricionales y terapéuticas debido a su contenido de azúcares, oligoelementos, minerales, hormonas y vitaminas; mientras que la segunda es utilizada para la fabricación de cosméticos, productos para el cuidado personal y velas o cirios (Becerril S. , 2006)

Además se pueden obtener otros productos como: el propóleo que posee importantes propiedades bactericidas, fungicidas y antivirales; el polen denominado como un alimento completo debido a su contenido de vitaminas, proteínas, minerales y ácidos grasos esenciales; la jalea real que presenta propiedades anti-inflamatorias, regeneradoras, hipocolesterolemiantes, vasodilatadoras y reconstituyente; y el veneno de abejas (apitoxina) empleada en la apiterapia para el alivio sintomático de afecciones articulares y reumatismo (Becerril S. , 2006).

Por otro lado, las abejas en la naturaleza cumplen el papel fundamental de polinizadores de diferentes especies de plantas que necesitan de las abejas para asegurar la fertilización de sus flores, asegurar frutos de buena calidad y con altos contenidos nutricionales. Toda esta eficiencia como agentes polinizadores se atribuye a la gran población de abejas a nivel mundial, sus condiciones anatomo-fisiológicas y su comportamiento que les permite visitar entre 50 y 1000 flores en un solo viaje,

con un promedio de duración del vuelo de 30 minutos a cuatro horas (Hilmi, Mejia, & Bradbear, 2011).

Es por ello, que debemos conocer que las abejas son susceptibles de padecer enfermedades y verse afectadas por diversas plagas, depredadores y factores ambientales adversos (incluida la acción del hombre). Y aunque, muchas enfermedades no tienen un impacto significativo en la salud de las abejas o en la polinización comercial y no producen daños económicos significativos., El Código Terrestre, de la Organización Internacional de Sanidad Animal (OIE), menciona en la actualidad las siguientes enfermedades de las abejas como perjudiciales para su desarrollo: loque americana, loque europea, varroasis, nosemosis, acarapisosis y ascophaerosis (De la Sota & Bacci, 2005).

Una de las enfermedades es la nosemosis causada por el parásito obligado *Nosema* sp., considerada en la actualidad como la segunda enfermedad más importante que ataca a las abejas adultas a nivel mundial, esta patología está asociada con la reducción del tiempo de vida de las abejas infectadas, produciendo un impacto negativo en la vigorosidad y productividad de las colonias y en muchos casos se la ha asociado con el colapso total de la colonia sin presentar signos clínicos de la enfermedad, poniendo en duda la distribución y la prevalencia de la especie *Nosema* sp. a nivel mundial (Botías, Raquel, Barrios, Meana, & Higes, 2013).

Con estos antecedentes y considerando las condiciones ambientales que presenta el Ecuador así como la gran diversidad de especies vegetales potencialmente aptas para la apicultura, se debe considerar que nuestro país se convierte en un lugar adecuado para desarrollar la actividad apícola. Por lo cual, es importante desarrollar estudios sobre las enfermedades perjudiciales para las abejas como la nosemosis, cuya información en el país es aun deficiente, y la necesidad de generar reportes sobre el estado sanitarios de las colmenas es fundamental para apuntalar un sector potencialmente importante en la economía del país en un futuro no muy lejano.

1.2 Justificación

La actividad apícola moderna, cobra día a día gran importancia a nivel mundial ya que representa una fuente natural de alimentos y medicamentos para los seres humanos, además, el valor comercial que alcanzan los productos provenientes de las colmenas y otro tipo de productos e insumos diseñados para el adecuado manejo de ellas, forman parte del mercado, significando así ingresos estables para los proveedores de éstos productos (Duttman, Demedio, & Verde, 2013).

Por otro lado, las abejas son los más importantes polinizadores de varios cultivos comerciales, permitiendo su reproducción, lo que representan el 35% de la producción mundial de alimento, aspecto que las convierte en actores vitales para preservar una agricultura sustentable y la seguridad alimentaria de la humanidad (Genersch, 2010).

Además, las abejas contribuyen a mantener la biodiversidad de muchos ecosistemas alrededor del mundo. Por ello, el fenómeno de la disminución inexplicable de la población de las colonias de abejas, ha sido estudiado por varios años, determinándose que entre las causas más importantes se encuentran el uso de pesticidas y la infestación de patógenos, tal como es el caso de *Nosema* sp. (Genersch, 2010).

Por ello se debe difundir entre las y los apicultores los conocimientos de las enfermedades que padecen las abejas para establecer y aplicar las normas correctas de producción y manejo de las colmenas, teniendo en mente siempre que se debe mantener el equilibrio con el medio, permitiendo no solo alcanzar niveles de producción adecuados, sino asegurando la salud y el desarrollo normal de las y los habitantes de las colmenas.

Finalmente, es importante recalcar que en el Ecuador las investigaciones y notificaciones científicas referentes al diagnóstico de las principales enfermedades que padecen las abejas y entre ellas la nosemosis en las colonias de abejas productoras, aún son muy escasas. Por ello, la información de base sobre la distribución espacial permitiría a los productores apícolas contar con una referencia

bibliográfica confiable, que les brinde la oportunidad de conocer el estado de prevalencia de esta y posiblemente otras enfermedades.

1.3 Planteamiento del problema

1.3.1 Problema

La globalización de la industria y las diferentes actividades relacionadas con el sector apícola se han transformado en una gran oportunidad para que los parásitos / patógenos puedan trascender fronteras y encuentren alrededor del mundo nuevos hospederos que los puedan alojar confortablemente. Un ejemplo, es la enfermedad causada por una especie fúngica conocida científicamente como *Nosema* sp.

Por años se creía que *Nosema apis* era el único microsporidio causante de la infección de colonias de abejas domésticas. Sin embargo, hace poco más de una década atrás, se descubrió que *N. ceranae* pudo cruzar la barrera inter-específica desde las abejas asiáticas (*Apis cerana*) hacia las abejas europeas (*Apis mellifera*) las cuales son las encargadas a nivel mundial de polinizar importantes cultivos y producir miel (Chen & Huang, 2010).

Existen casos como los presentados en el estado de Minnesota - Estados Unidos en el año 2012, donde se presentó un decrecimiento progresivo de varias colmenas de abejas produciéndose un colapso total de las mismas (Bekele, Mor, Phelps, Goyal, & Armien, 2015), o en Chile donde por primera vez se demostró con análisis moleculares la presencia de *N. ceranae* entre los años 2011 y 2012 en la V Región, luego de haberse producido la muerte de 2.915 colmenas correspondientes al 47,3% del total de colmenas existentes en esa región (Bravo, y otros, 2014).

Por otro lado, bajo condiciones experimentales se ha llegado a determinar que *N. ceranae* es altamente patogénica para las colonias de abejas, debido a que afecta de manera significativa al tamaño, reproducción y producción de miel, lo cual, se relaciona directamente con impactos negativos para los apicultores y graves consecuencias en el proceso natural de polinización (Charbonneau, Hillier, Rogers, Williams, & Shutler, 2016).

1.3.2 Causas

- Disturbios digestivos, provocados por infecciones
- Intoxicaciones químicas con plaguicidas
- Condiciones ambientales desfavorables
- Postura débil de las reinas
- Malas prácticas de manejo de las colmenas

1.3.3 Efectos

- Alteraciones fisiológicas de las abejas a nivel digestivo
- Reducción de la población productiva de las colonias
- Pérdidas paulatinas de colmenas
- Pérdidas totales de colonias
- Reducción de la producción de miel y otros subproductos de la colonia
- Deficiente trabajo de las abejas como agentes polinizadores
- Pérdidas económicas cuantiosas

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Realizar un estudio epidemiológico, con la finalidad de obtener información sobre la presencia y distribución de *Nosema* sp, en apiarios localizados en las provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha - Ecuador.

1.4.2 Objetivos específicos

- Comparar la efectividad de tres métodos de diagnóstico de *Nosema* sp.: microscopía óptica, tinción Giemsa y microscopía de fluorescencia.
- Georeferenciar los apiarios y determinar los posibles factores de riesgo implicados en la introducción y/o mantenimiento de *Nosema* sp., en las provincias de Pichincha, Imbabura y Carchi en Ecuador.
- Establecer la prevalencia y el índice de infestación de la nosemosis, a nivel de: provincia, apiario y colmena, mediante la utilización de la cámara de Neubauer, en la zona de estudio.
- Proponer un plan de control y/o prevención de *Nosema* sp. en los apiarios de la zona de estudio.

1.5 Hipótesis

Ho: En los apiarios de las provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha – Ecuador, las esporas de *Nosema* sp. no se encuentran parasitando a *Apis mellifera*.

Hi: En los apiarios de las provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha – Ecuador, las esporas de *Nosema* sp. se encuentran parasitando a *Apis mellifera*.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El rol de los polinizadores, en la seguridad alimentaria en el mundo

La evolución natural de las especies vegetales y su importante capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales en el planeta, han permitido que varias de ellas desarrollen ciertas exigencias específicas para el transporte del polen que producen (Hilmi, Mejia, & Bradbear, 2011).

Un ejemplo de éste tipo de exigencias, es la polinización cruzada, la misma que se considera necesaria, debido a que ciertos cultivos no poseen ambos sexos o ellos aparecen en periodos diferentes de floración en una misma planta, siendo así, que varias especies de animales por su necesidad de visitar las flores en busca de alimento llevan consigo gránulos de polen que contribuyen a la polinización de importantes cultivos alrededor de todo el mundo (Bradbear, 2005).

De ahí la gran importancia de la polinización de los cultivos, debido a que se convierte en un factor que permite mantener tanto la biodiversidad de la Tierra como la seguridad alimentaria de los Estados, puesto que, de los 100 principales cultivos que proporcionan el 90% de los alimentos para el sustento de la población mundial, alrededor de 70 son beneficiados por la polinización de varios insectos principalmente. Además contribuyen directamente en la generación de por lo menos 150 mil millones de euros producto del valor obtenido de la polinización por insectos alrededor del mundo (Krieger, 2015).

Tal es la importancia que reviste a la polinización en el ámbito de la alimentación de la humanidad, que se ha llegado a calcular que la ausencia de los polinizadores ocasionaría que uno de cada tres bocados de comida que se consume a diario no sería posible, ya que cultivos como el fréjol, ají, tomate, zapallo, ciruelas, mangos, manzanas, café, cacao, vainilla, almendro; entre otros, dependen de la

acción específica de la zoopolinización para su desarrollo. Inclusive la alfalfa; materia prima para la generación de carne y leche por parte de los rumiantes necesita de polinizadores para producir sus semillas (Arizmendi, 2009).

2.1.1 Tipos de polinizadores

Según los datos proporcionados por; (Banaszak, y otros, 2013); de las 352 mil especies de todas las plantas angiospermas conocidas en el mundo se destaca que 308 mil son polinizadas por los animales de los cuales el grupo de los insectos es el más representativo sobre otros como aves, quirópteros y tisanópteros.

2.1.1.1 Insectos

Los insectos han sido considerados y categorizados en diferentes latitudes alrededor del mundo como el grupo de agentes polinizadores de las plantas más grande y antiguo del que se tiene conocimiento. Adaptaciones tanto morfológicas como fisiológicas entre las que se encuentran el desarrollo de su exoesqueleto, su tamaño corporal reducido, la capacidad de volar y su gran poder reproductivo, han permitido que tengan un éxito potencial como grandes colonizadores de todas las zonas del planeta en todos sus estratos soportando temperaturas que van desde los -50°C hasta casi los 60°C (Rogg, 2000).

Dentro de los órdenes de insectos más importantes como polinizadores tenemos:

2.1.1.1.1 Dípteros

Comúnmente conocidas como moscas, se diferencian de las abejas y los demás Himenópteros porque sus individuos aumentan en número cuando las temperaturas son bajas; lo que ocurre en altas latitudes. Este orden está constituido por una gran diversidad de grupos compuestos de casi 150 mil especies, de las que

alrededor de 41 especies son polinizadoras, siendo las familias *Tipulidae*, *Bibionidae*, *Chironomidae*, *Eempididae*, *Syrphidae*, *Bombyliidae* y *Tachinidae*, las más frecuentes visitadoras de 100 especies de cultivos que dependen de ellas (Banaszak, y otros, 2013) (FAO, 2016) (Rogg, 2000)

2.1.1.1.2 Lepidópteros

En el orden *Lepidoptera*, las mariposas y polillas comprenden casi 300 mil especies, de las cuales, pocas no consumen polen. Las familias de polillas *Sphingidae*, *Noctuidae* y *Geometridae* y de mariposas *Hesperiidae* y *Papilionida*, concentran a los agentes polinizadores más importantes dentro de éste género debido a su capacidad para transportar el polen a distancias mucho más largas, con lo cual, contribuyen al mantenimiento de la diversidad genética de flora del planeta (Banaszak, y otros, 2013) (FAO, 2016) (Rogg, 2000).

2.1.1.1.3 Coleópteros

Corresponden a un grupo integrado por alrededor de 360 mil especies, distribuidos en casi todos los hábitats terrestres del planeta. Dentro de éste orden los escarabajos pertenecientes a las familias *Mordellidae*, *Oedeneridae*, *Malachiidae*, *Chrysomelidae*, *Cantharidae* y *Cerambycidae* son los principales polinizadores casuales de las flores, las que visitan con cierta frecuencia para alimentarse, aunque algunas especies también las destruyen durante el proceso (Banaszak, y otros, 2013) (FAO, 2016) (Rogg, 2000).

2.1.1.1.4 Himenópteros

Este orden está conformado por una cifra cercana a las 200 mil especies, distribuidas en el planeta a excepción de altitudes elevadas. Abejas, abejorros, hormigas y avispas son sus principales representantes, de los cuales apenas 131 especies son consideradas como agentes polinizadores y dentro de ellos las abejas melíferas (*Apis mellifera*), predominan como los más importantes en gran parte de los diversos ecosistemas existentes (Banaszak, y otros, 2013) (FAO, 2016) (Rogg, 2000).

2.1.2 *Apis Mellifera*

Las abejas melíferas (*Apis mellifera*), tiene su origen en Europa y en la actualidad están presentes en muchos países alrededor de todo el mundo, siendo consideradas no únicamente como productores de miel y otros subproductos de las colmenas sino también como importantes agentes conservadores de la biodiversidad natural, debido a su capacidad para polinizar varias plantas silvestres y cultivos agrícolas de importancia para la producción mundial de alimentos (Hilmi, Mejia, & Bradbear, 2011).

Las abejas melíferas son insectos sociales que se caracterizan por su organización en colonias y la diferenciación en castas (reina, obreras y zánganos), que les permite distribuir el trabajo de la colmena de acuerdo a su edad y desarrollo físico, además pertenecen al orden *Himenóptera*; clase *Apidae*; al género *apis* y a la especie *mellifera* (Demedio, 2010).

Habitualmente dentro de una colmena habita la abeja reina, quien puede vivir un tiempo máximo de cuatro años aunque normalmente es sustituida por los apicultores transcurridos dos años de vida y que llega a ovopositar hasta 2000 huevos diarios durante su pico máximo de reproducción, junto con unos pocos cientos de zánganos; encargados de la cópula con la reina; y hasta 60000 abejas obreras estériles, encargadas tanto de la búsqueda de alimento, así como el mantenimiento y cuidado de la colmena (Krieger, 2015).

2.2 Problemática en la desaparición de polinizadores

El mantenimiento de la diversidad y el dinamismo ecológico de la Tierra, es sin duda un tema de vital importancia en la actualidad. Por ello y siendo la polinización uno de los factores claves en el andamiaje de éstos procesos se debe poner mucho énfasis en la formulación puntual de metodologías que permitan conservar tan mencionada biodiversidad (Arizmendi, 2009).

Teniendo en cuenta, la gran trascendencia que han cobrado en los últimos años los polinizadores de varios cultivos y plantas silvestres para el sustento de alimento

diario para la humanidad, los investigadores han llegado a determinar las principales causas de la desaparición de éstos importantes agentes. Llegándose a determinar que cada vez son presas de más enfermedades propiciadas por el cambio de las condiciones ambientales, el uso indiscriminado de pesticidas y por su puesto el manejo de las colmenas con fines lucrativos (Ritter, 2014).

2.2.1 Enfermedades

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) mediante El Código Sanitario para los Animales Terrestres toma en consideración primordial las enfermedades que atacan a *A. mellifera*, sobre las que atacan a otras especies como *A. cerana*, *A. dorsata*, *Bombus* spp. y otras especies; debido tanto a la importancia que revisten las abejas melíferas en el desarrollo de la humanidad así como por la posibilidad que tienen para convertirse en la fuente de inóculo para el desarrollo de enfermedades que en ciertas circunstancias podrían llegar a emerger y convertirse en agentes infectantes de otra especies de abejas (OIE, 2017).

Los patógenos y parásitos de los polinizadores basan sus mecanismos de ataque en la reducción del tiempo de vida, así como en la modificación morfológica, fisiológica o conductual de los individuos, que posteriormente conduce a efectos negativos en el desarrollo del ciclo vital de las especies como ocurre en el caso de las abejas donde la reducción de la solidez de las colmenas pueden ocasionar el colapso total de un apiario (Ritter, 2014).

En el caso específico de las abejas melíferas, se ha reconocido a nivel mundial que pueden padecer alrededor de 20 patologías diferentes, pero menos de la mitad de ellas son realmente importantes. Para la región de América Latina, siete enfermedades son consideradas como las causantes principales de graves pérdidas económicas todos los años en el sector apícola, en orden de importancia se conoce que son: Varroosis, Loque americana, Loque europeo, Cría yesificada, Nosemosis, Acarapisosis y Parálisis (OIRSA, 2012).

Las enfermedades más frecuentes en abejas de acuerdo al agente biológico que las produce se las puede clasificar en:

2.2.1.1 Bacterianas

2.2.1.1.1 Loque Americana

Luego de la varroosis es la enfermedad que más pérdidas económicas causa a los apicultores alrededor del mundo, debido a que puede estar presente en regiones con climas templados y subtropicales. Es una enfermedad contagiosa, cuyos agentes causales pueden mantenerse en dormancia por más de 50 años (FAO, 2006).

Esta enfermedad microbiana es producida por la bacteria *Paenibacillus larvae* y puede llegar a causar pudriciones en las larvas, pre-pupas y pupas de las abejas. Además puede ser diseminada por acciones como el pillaje, la presencia de abejas de otros apiarios y la manipulación por parte de los apicultores, también puede propagarse por productos como la miel, que se comercializa en todo el mundo, pero no supone amenaza alguna a la salud humana (OIRSA, 2012).

2.2.1.1.1.1 Síntomas

Los síntomas característicos que se pueden observar en las larvas son un cambio gradual en la coloración normal blanca lechosa, primero a una parda clara, hasta llegar a una parda oscura, de aspecto pegajoso, los opérculos hundidos y porosos con restos resacos a manera de escamas, observándose en general un patrón irregular de postura en los marcos que integran la cámara de cría. (De la Sota & Bacci, 2005) (Demedio, 2010).

2.2.1.1.2 Loque Europea

Enfermedad importante que ataca a la cría y de desarrollo complejo ya que, depende de las condiciones ambientales y el crecimiento de la cámara de cría. Puede confundirse con Loque americana debido a que también produce la pudrición de la cría, aunque sus daños no son tan severos y es menos virulenta (FAO, 2006).

2.2.1.1.2.1 Síntomas

Melissococcus pluton es el nombre del agente primario causal al que se le atribuye el desencadenamiento de la enfermedad ya que, el desarrollo de la misma comprende un amplio complejo de microorganismos bacterianos que producen la muerte de las larvas antes de ser operculadas. Puede llegar a producir un debilitamiento de la población sin llegar a matar a la colmena (Coffey, 2007).

2.2.1.2 Virales

2.2.1.2.1 Cría ensacada

Conocida como “sacbrood”, es una enfermedad infecto contagiosa, que provoca la muerte de las crías en los estados de pre pupa y pupa, siendo poco el número de crías afectadas por lo cual no representa una amenaza para la economía de los apicultores (MAAREC, 2005).

2.2.1.2.1.1 Síntomas

Se pueden observar crías muertas esparcidas entre las crías vivas. La característica principal de la patología es la separación de la cutícula del cuerpo, semejándose a un saco lleno de líquido debido a la pudrición de la larva. El proceso inicia con un cambio en la coloración de las larvas hasta que al final se deseca completamente tornándose de color negro (De la Sota & Bacci, 2005).

2.2.1.3 Parasitarias

2.2.1.3.1 Varroasis

Ocasionada por el ácaro *Varroa destructor*, el cual, puede parasitar a la abeja tanto en los estados de cría y adulta, produce debilitamiento de las colonias debido a

que se alimentan de la hemolinfa de las abejas, lo que conlleva a la generación de grandes pérdidas por la baja producción de las mismas (FAO, 2006).

En el caso de Varroa, la hembra adulta es la que parasita a las abejas, siendo morfológicamente de mayor tamaño que el macho, de coloración corporal marrón rojizo y una gran cantidad de setas ubicadas dorsoventralmente. Pueden encontrarse en el interior de las celdas de los marcos y rápidamente caminar a la superficie de las mismas (Coffey, 2007).

2.2.1.3.1.1 Síntomas

Pueden presentarse diversas alteraciones en las abejas por la parasitosis de varroa de tipo directo tales como: desorientación, pérdida de la capacidad para volar, reducción del contenido proteínico de los hemocitos de la hemolinfa, baja producción de jalea real y concentración de ácidos grasos ocasionando alteraciones metabólicas lo que conduce a la reducción del peso, tamaño, longevidad, postura de la reinar y baja producción de semen por parte de los zánganos (Demedio, 2010).

Por otra parte, de manera indirecta debido al mecanismo de alimentación de las varroas, pueden convertirse en un vector transmisor de una importante cantidad de bacterias como *Paenibacillus larvae* responsable de la producción de Loque americana, esporas de hongos como *Ascophæra apis* agente causal de la cría yesificada y varias partículas virales (De la Sota & Bacci, 2005).

2.2.1.3.2 Acariosis

Producida por el ácaro *Acarapis woodi* R. produce una importante infestación del sistema traqueal de las abejas adultas, al igual que varroa la hembra tiene un mayor tamaño corporal que el macho, pero a diferencia de las anteriores ingresa al interior de las abejas por los espiráculos, donde por acción de su aparato bucal succiona la hemolinfa al perforar las paredes traqueales del hospedante (OIRSA, 2012).

2.2.1.3.2.1 Síntomas

No se pueden detectar signos visibles específicos producidos por el ataque de éstos parásitos, por lo cual, el método primario de detección del ácaro debe ser realizado por disección de la tráquea del individuo en el laboratorio, aunque es importante saber que la sola presencia de un individuo infestado por acarapsis puede ocasionar el contagio de una gran cantidad de los demás individuos formadores de las colonias (FAO, 2006).

2.2.1.4 Micóticas

2.2.1.4.1 Ascosferosis o Cría Yesificada

Enfermedad ocasionada por el hongo *Ascophæra apis*, el cual, afecta a las crías dándoles un aspecto de un pedazo de yeso; cuando las condiciones de humedad, temperatura, ventilación y sistema inmunitario de las abejas son deficientes permitiendo la proliferación del patógeno. La presencia de la enfermedad en el campo apícola se ha tornado importante debido a que se lo puede observar comúnmente en las colmenas mal manejadas ocasionando un grave problema económico para los apicultores (De la Sota & Bacci, 2005).

2.2.1.4.1.1 Síntomas

En la etapa inicial del ataque del patógeno se pueden observar larvas muertas de abeja, las mismas que no se han podido desarrollar correctamente y que se encuentran cubiertas por una capa miceliar formada por el hongo brindándoles una coloración que va desde el blanco, pasando por el gris y finalizando en el negro dependiendo del estado de crecimiento del microorganismo. Posteriormente, las larvas muertas se momifican hasta que toman el aspecto de un pedazo de yeso (FAO, 2006).

2.2.1.4.2 Aspergilosis

Enfermedad que se le atribuye a la acción de varios hongos del género *Aspergillus*, siendo su agente causal primario *Aspergillus flavus*, puede ocasionar que tanto las larvas como las pupas no se desarrollen y se momifiquen al ser cubiertas con el micelio del hongo. Es una patología que no reviste alta importancia por lo que su tratamiento no se hace necesario ya que, las mismas abejas remueven las larvas muertas. Pero el contacto con las colmenas infectadas puede causar problemas respiratorios a los humanos que las manejan (Coffey, 2007).

2.2.1.4.2.1 Síntomas

Las estructuras micelias blanquecinas del hongo se extienden a lo largo de la cutícula de la larva hasta formar un anillo alrededor de la cabeza y continúa por todo el exoesqueleto tornándose de color amarillo, verde o negro dependiendo del género de *Aspergillus* que se encuentre atacando a las abejas. También puede atacar a las abejas adultas donde se pueden observar ciertas manifestaciones como el abdomen abultado, incapacidad de volar, concluyendo con la muerte de las mismas que son cubiertas por el micelio de hongo una vez que han caído al suelo (OIRSA, 2012).

2.2.1.4.3 Nosemosis

Conocida como una de las más destructivas enfermedades que se presentan en las abejas adultas, es producida por *Nosema sp.* y puede causar graves daños a las colonias debido a su poder infectivo del tracto digestivo de las abejas, lo que conlleva a la disminución acelerada de los individuos de las colonias y por ende a graves pérdidas económicas a los apicultores por el bajo rendimiento productivo (FAO, 2006).

2.2.1.4.3.1 Síntomas

La alteración del sistema digestivo ocasiona graves problemas de disentería en los animales infectados, lo que se puede observar como manchas de color marrón en las afueras de las colmenas, otros efectos son la reducción de la producción de jalea real, pobre desarrollo de la colonia, que en ocasiones puede terminar en la pérdida total de las mismas (Coffey, 2007).

2.2.2 Contaminación medio ambiental por pesticidas

Tanto el desarrollo y hábitos de vida propios de las abejas como generadoras de varios productos de la colmena, así como agentes polinizadores permiten que ellas se conviertan en un importante indicador del nivel de contaminación que presenta el medio donde se desarrollan (Hilmi, Mejia, & Bradbear, 2011).

Desde varias décadas atrás la mala utilización de productos químicos como los plaguicidas en el mantenimiento de los cultivos ha provocado diversos y graves problemas de intoxicación en abejas que van desde daños a nivel corporal, hasta alteraciones de procesos vitales por ingreso de estos productos al tracto digestivo o directamente al sistema nervioso de las abejas por encontrarse restos de éstos químicos sobre el polen, néctar o agua que ellas utilizan (Demedio, 2010).

Uno de los signos más visibles de una intoxicación severa con productos químicos es la presencia de una gran cantidad de abejas pecoreadoras muertas en la piquera al ingreso de las colmenas. Antes de morir por envenenamiento se pueden observar abejas alteradas, con poco movimiento e inclusive inmóviles, pero que al llegar a la colmena llevan consigo partículas de estos productos contaminantes ocasionando que también los demás habitantes del interior de las colmenas resulten afectados (OIRSA, 2012).

2.3 Apicultura en el Ecuador

2.3.1 Reseña histórica

Los inicios de la apicultura en el Ecuador se remontan al año de 1870, cuando los religiosos Cristianos introdujeron las primeras colmenas de abejas traídas desde Francia hasta la ciudad de Cuenca de donde se fueron distribuyendo hacia otros sectores del país.

Luego de varios años, específicamente en la década de los 70, fueron introducidas al medio abejas africana (*Apis mellifera A*), las mismas que, producto de su emigración se fueron reproduciendo con las europeas y formando enjambres mucho más competitivos en relación con las abejas sin aguijón nativas del Ecuador.

Para el año de 1974, el entonces Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), crea el Programa de Apicultura, programa que por su destacado trabajo en el sector permite el ingreso del Ecuador a APIMONDIA en el año de 1977. Posterior a ello, en octubre de 1983 se organiza el Primer Congreso de Apicultores, el cual, fue el punto de partida para que varias provincias por iniciativa propia formaran sus propias asociaciones como es la Asociación de Apicultores de Pichincha (ADAP), quienes en 1995 mediante la organización de un nuevo Congreso de Apicultores conforman la Federación Nacional de Apicultores del Ecuador (FENADE) con la participación inicial de siete provincias (Cabrera, 2012).

Desde el año 2008 hasta la actualidad en el país la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad de Agro (AGROCALIDAD), es el ente rector del control sanitario, fitosanitario y de inocuidad de los alimentos, direccionados también al sector apícola. Esta entidad fue la encargada de realizar en el periodo 2013-2014 el Primer Catastro Nacional de Explotaciones Apícolas (AGROCALIDAD, 2016).

2.3.2 Situación actual de la apicultura en Ecuador

2.3.2.1 Número de apiarios, colmenas y promedio de producción

La Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD) mediante su Programa Nacional Sanitario Apícola (PRONSA), realizó el Primer Catastro Nacional de Explotaciones Apícolas durante los años 2013 y 2014, registrándose en dicho periodo que en el Ecuador existían 902 explotaciones apícolas, distribuidas de la siguiente manera: alrededor de 568 (63%) se ubicaron en la región sierra, 244 (27 %) en la costa y aproximadamente 90 (4 %) en la región amazónica. En cuanto al número de colmenas existentes dentro de los 902 apiarios registrados se contabilizaron un total de 12188 siendo Pichincha con 2778, Loja con 2146, Manabí con 1418 e Imbabura con 1025; las cuatro provincias con mayor presencia de colmenas en el país (AGROCALIDAD, 2016).

Por otro lado, se reportó en el PRONSA que en la temporada de desarrollo del mismo, en el Ecuador se presentó una demanda insatisfecha de 200 toneladas de miel para el año 2013. También se estimó la producción de los principales derivados obtenidos de las colmenas durante el mismo año, obteniéndose los siguientes datos: 129,93 toneladas de miel de abeja; 5,75 toneladas de polen; 31,53 kilos de propóleos; 12,18 kilos de jalea real y 1,16 toneladas de cera de abeja y que, alrededor del 90% de ésta producción se la realiza en el sector rural, debido tanto a las condiciones ambientales así como por la disponibilidad de alimento en dicha zona, aspectos que son requeridos por las abejas melíferas (AGROCALIDAD, 2016) (Vargas, Santiana, & Rosero, 2015).

2.4 La nosemosis, como enfermedad de notificación obligatoria en apicultura

A nivel mundial la nosemosis es considerada la segunda enfermedad más importante en las abejas. Es producida por el protozoo *Nosema apis* (Zander), en casos agudos de infección se observan en los alrededores de las colmenas manchas fecales de una coloración marrón, así como abejas muertas al ingreso de las colmenas. Mientras que en casos menos pronunciados las colonias no indican signos

visibles producidos por la infección, pero sin duda que cobra gran importancia debido a la disminución en la producción de miel y deficiencias en la polinización de varios cultivos de importancia agrícola (de Ruiter, 2013).

Esta patología parasitaria puede afectar a todas las castas de abejas en el estadio adulto, produciendo infecciones a nivel celular del epitelio que protege internamente al intestino medio, ocasionando algunos síntomas clínicos que incluyen desordenes digestivos, reducción del ciclo vital del hospedero, decrecimiento del tamaño poblacional y reducción de postura por parte de la abeja reina (Manzoor, Mathivanan, & Shah, 2013).

Debido a su distribución cosmopolita, la nosemosis se considera de estudio fundamental en zonas que presentan climas templados, puesto que, su prevalencia está estrechamente relacionada con los factores climáticos de temperatura, humedad y precipitación (De la Sota & Bacci, 2005).

2.4.1 Agente causal

2.4.1.1 Agentes etiológicos y patogenia

Los microsporidios son organismos unicelulares altamente evolucionados con un estilo de vida parasítica intracelular obligada, pertenecen al Orden Microsporidia y son altamente específicas tanto al huésped e inclusive al tejido que parasitan. Entre sus hospederos se encuentran los insectos y otros invertebrados e inclusive vertebrados como el hombre. En la actualidad más de 160 géneros y alrededor de 1300 especies han sido descritas en la literatura, permitiendo así denotar la gran diversidad de su morfología y las adaptaciones de su ciclo de vida (Gisder, y otros, 2010).

Estos parásitos pueden causar graves alteraciones a nivel celular de los hospederos, un ejemplo de ello son las microsporidias tanto de *Nosema apis* como *Nosema ceranae*, que atacan tanto a las abejas melíferas como a las abejas africanas y por su amplia distribución se han convertido en un patógeno cosmopolita (Martín, y otros, 2017).

Las esporas de resistencia pueden permanecer latentes en varios medios de cultivo naturales y por lapsos de tiempo diferentes como: 4,5 años en agua congelada, hasta 3 meses en la miel, hasta 2 meses en el suelo a la sombra y entre 10 a 20 días en cadáveres de abejas putrefactas. Por lo cual, de ser necesario se puede destruir las esporas cuando se encuentran en la miel al exponerla a calentamiento a 59 °C por 10 minutos (De la Sota & Bacci, 2005).

2.4.1.2 Agentes patógenos causantes de Nosemosis

Por mucho tiempo se mantuvo la tesis de que *Nosema apis* parasitaba únicamente a abejas melíferas europeas, mientras que *Nosema cerana* realizaba lo mismo pero con las abejas melíferas asiáticas. Hasta que, en el año de 1973 en la República Popular de China se encontraron colmenas con abejas europeas melíferas infectadas por esporas de *N. cerana*, desde ese momento hasta la actualidad esta especie ha ido relegando a *N. apis* como el principal agente causal de la nosemosis alrededor de todo el mundo sin que sea posible evitar su transmisión (Ritter, 2014).

En cuanto a la agresividad para parasitar a su hospedero *N. cerana* se muestra con un mayor poder infectivo sobre *N. apis*, por lo cual, se ha convertido en un grave problema para las colmenas, debido a que aumenta significativamente la mortalidad de los individuos que la integran, aunque cabe recalcar que hasta el momento son pocos los conocimientos que se tienen sobre los efectos adversos a nivel fisiológicos que produce *N. cerana* en las abejas para conducirlos hasta la muerte y posible desaparición de apiarios enteros (Forsgren & Fries, 2010).

Es por ello que debido a los efectos adversos que pueden producir en las colmenas y a la severidad de la infección se ha denominado a la nosemosis producida por *N. apis* como tipo A; la menos severa; y la producida por *N. cerana* como tipo C, debido a su mayor poder infectivo (Botías, Raquel, Barrios, Meana, & Higes, 2013).

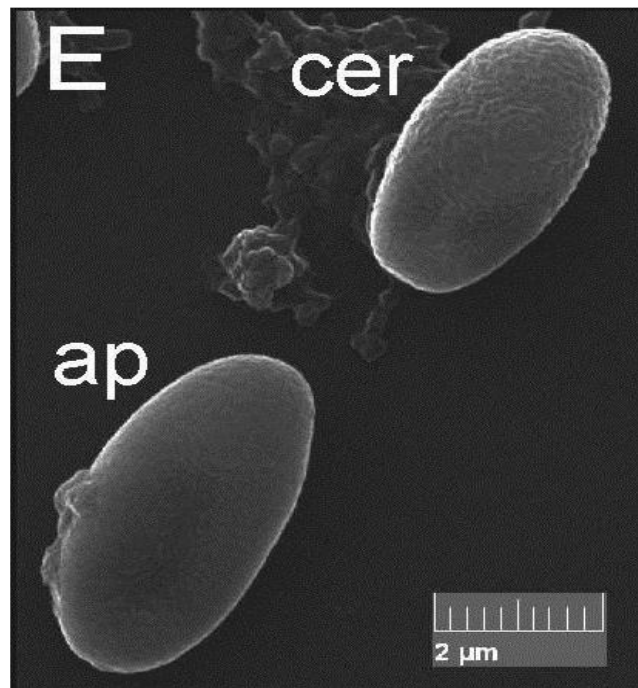


Figura 1 Esporas de las dos especies (*ap-N. apis*, *cer-N. ceranae*) provenientes de muestras de intestino de abejas

Fuente: (Ptaszyńska, Borsuk, Mułenko, & Demetraki-paleolog, 2014)

2.4.1.3 Antecedentes de *Nosema* sp.

Lebert en 1856 fue el primer investigador en identificar los cuerpos ovales de los microsporidios en los gusanos de seda (*Bombyx mori*) infectados. Por su parte Balbiani en 1882, sugirió la separación del taxón Microsporidia para *Nosema bombycis*, luego de encontrar en sus análisis varias diferencias con los organismos Ascomicetes, pero muchas similitudes con Esporozos. Para el año de 1977 Sprague designó el phylum Micróspora, el cual se mantuvo hasta el año 1992, causando mucha confusión hasta 1998 cuando Sprague y Becnel reconocieron que la designación de Balbiani era la correcta para este phylum (Franzen, 2008).

Posterior al descubrimiento de los microsporidios en los gusanos de seda se los fue identificando en algunas clases de animales como peces y varios

invertebrados. Por este motivo Alphonse Labbé, realizó una amplia revisión completa de los trabajos de investigación sobre microsporidios constituyéndose en la base para la subsecuente descripción de especies importantes de microsporidios como los de *Nosema apis*; descrita por Zander en 1909, patógeno que se creía responsable de producir disentería en las abejas melíferas infectadas y que gracias a sus hábitos de alimentación podrían transmitir las esporas infectivas (Franzen, 2008).

Al momento se encuentran descritas dos especies de microsporidios de las abejas: *Nosema apis* (Zander) parásito de las abejas europeas (*Apis mellifera*) y *Nosema ceranae* (Fries), el cual infecta tanto a las abejas asiáticas (*Apis ceranae*) y a las abejas europeas, hecho que ha sido detectado en el año 2004 en varias poblaciones de abejas localizadas alrededor de todo el mundo desconociéndose aún sus consecuencias patológicas. Además tiene una gran capacidad para reproducirse incluso en regiones donde se presentan altos niveles de temperatura, lo que lo convierte probablemente en un patógeno mucho más prevalente y con una importante capacidad de adaptación al medio (OIE, 2008).

2.4.1.4 Clasificación Taxonómica

Las especies *Nosema apis* Z. y *Nosema ceranae*, pertenecen al grupo de parásitos eucariotas obligados unicelulares cuyas formas vegetativas tienen la capacidad de vivir y reproducirse únicamente en el interior de la células del epitelio del intestino de las abejas. Taxonómicamente están ubicadas dentro del Reino Fungi, la Clase Microsporidia caracterizados por la generación de esporas de resistencia (Keeling, 2009) (OIRSA, 2012).

2.4.1.5 Morfología del Parásito

Las formas esporulares de resistencia de las microsporidias son conocidas como esporas, cuya característica principal es la forma oval que presentan, siendo sus medidas aproximadas 4 a 6 μm de largo por 2 a 4 μm de ancho, además al ser observadas con el microscopio óptico tienen un contorno oscuro en cuyo interior se aloja la forma vegetativa del hongo formada por dos núcleos (OIRSA, 2012).

Poseen una membrana gruesa conformada por tres capas que lo vuelven muy resistente, mientras que el núcleo del interior de las esporas no es visible. Se caracterizan por contar con un filamento polar enrollable de hasta 400 μm de largo, la cual, penetra en la matriz peritrófica del intestino de la abeja en la región posterior del ventrículo, el esporoplasma atraviesa el filamento e ingresa en el citoplasma de las células epiteliales, donde se reproduce (de Ruiter, 2013).

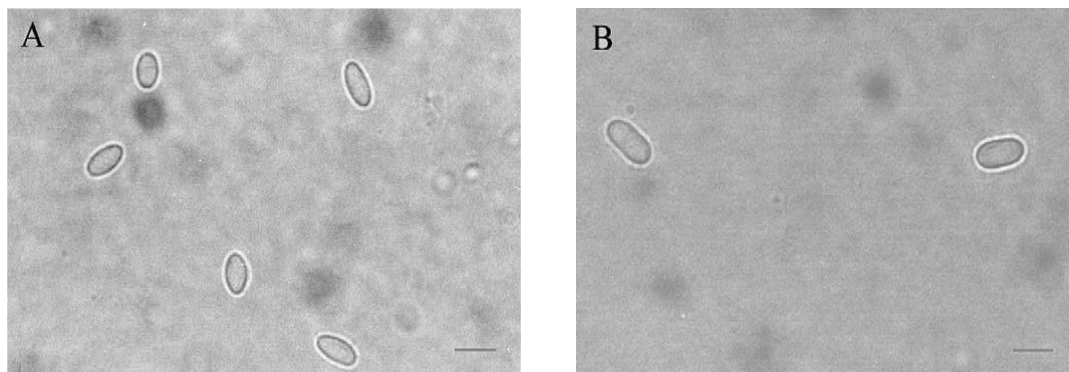


Figura 2 Esporas de *N. ceranae* (A) y esporas de *N. apis* (B).

Fuentes: (Fries, *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*), 2010)

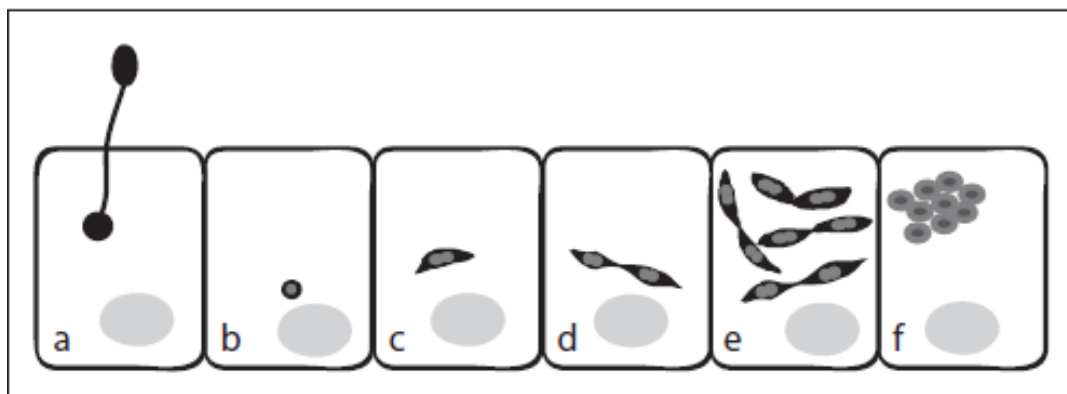
2.4.1.6 Ciclo biológico de *Nosema* spp y desarrollo de la enfermedad

Una vez que los esporoplasmas de *Nosema* sp. ingresan al organismo de las abejas a través del filamento polar, rápidamente pasan al interior del intestino a través del proventrículo donde los jugos gástricos intestinales favorecen a su germinación.

Luego de la germinación se ejerce una presión en el interior de la espora, produciéndose la evaginación del filamento polar con el cual logra atravesar las células de la pared ventricular y permite liberar el contenido esporular que invade las células del hospedante, donde utilizando sus componentes se multiplican rápidamente (Hornitzky, 2008).

Sin embargo es importante mencionar que, las microsporidias parasitarias no tienen la posibilidad de crecer o multiplicarse fuera de las células de sus hospederos, dependiendo totalmente de los productos obtenidos del proceso metabólico de los mismos, aunque hasta el momento la información de la interacción entre el parásito y su hospedero es muy limitada (Keeling, 2009).

Por otro lado, el inicio de la infección se produce en el ventrículo para posteriormente difundirse a la parte anterior. Al ingresar a la célula las esporas aumentan de tamaño e inicia la división celular, atravesando por los estadios de: meronte, merozoíte, esporonte y esporozoíto; concluyendo con la producción de esporas luego de 48 y 60 horas de iniciada la infección. Las células endoteliales que contienen en su interior a las esporas se desprenden del revestimiento intestinal, liberándose esporas; una parte de ellas infestan células endoteliales vecinas y otra parte se elimina en las heces permitiendo que se reinicie el ciclo de la enfermedad en otras abejas (De la Sota & Bacci, 2005).



Inicialmente las esporas extruyen el tubo polar el cual, perfora la membrana de la célula de su hospedante, luego inyecta el esporoplasma dentro de la misma célula. (a). Aparece el esporoplasma como un pequeño cuerpo esférico en el interior de la célula del hospedante (b) y luego desarrolla dentro un meronte en forma de eje (c) este empieza a dividirse dando origen a un par de merontes (d). Este par de merontes continúa dividiéndose (e) al tiempo que se dividen van desarrollando un esporonte de forma ovalada, los mismos que se condensan y se caracterizan por poseer una membrana plasmática gruesa.

Figura 3 Representación esquemática del ciclo de vida de *Nosema* sp.

Fuente: (Gisder, Möckel, Linde, & Genersch, 2011)

2.4.1.7 Factores de riesgo y transmisión de la enfermedad

En la naturaleza, ciertos grupos de individuos que dentro de ella se encuentran; como es el caso de *A. mellifera*; presentan una mayor probabilidad de padecer ciertas enfermedades, convirtiéndolas así en grupos vulnerables, debido a ciertos aspectos de tipo genético, ambiental y biológico, los mismos que al actuar de forma individual o en conjunto permiten el desarrollo de procesos que alteran el normal funcionamiento fisiológico y/o morfológico de los individuo (Pita, Vila, & Carpenente, 1997).

Por ello, la determinación de las características detectables que pueden elevar la posibilidad de adquirir y desarrollar una enfermedad son muy importantes, por ejemplo se ha llegado a determinar que el estrés que producen los pesticidas o los virus sobre el estados fisiológico de las abejas puede llegar a desencadenar una mayor predisposición de los organismos a padecer nosemosis y otras enfermedades (Bekele, Mor, Phelps, Goyal, & Armión, 2015).

Otros factores de riesgo que deben ser considerados por apicultores e investigadores como potenciales generadores y transmisores de enfermedades en las abejas melíferas son: Las prácticas de manejo de las colmenas orientadas a la producción de miel, debido a que por sus características constantemente deben ser transportadas a diferentes lugares en busca de floración de cultivos melíferos, la profesionalización de los operadores en el manejo sanitario de las colmenas, el tamaño de los apiarios, la aplicación de productos químicos para el tratamiento de enfermedades, la calidad y procedencia del polen que utilizan las abejas para su alimentación, podrían conducir a la adquisición en mayor o menor grado de esporas infectivas por parte de los hospederos (Aránzazu, y otros, 2017).

En cuanto a las vías de transmisión de la enfermedad, tenemos que la principal forma de contaminación con esporas de *Nosema* sp. entre abejas se produce en el interior de las colmenas, en épocas en las que debido a las bajas temperaturas ambientales prefieren permanecer en el interior de las mismas. La acumulación de deyecciones; que contienen esporas del hongo; excretadas por los insectos infectados

producen la contaminación de todos los elementos que forman la colmena (Bailey, 1953) (De la Sota & Bacci, 2005).

Por otro lado, cuando las condiciones climáticas mejoran, es el momento propicio para que las abejas salgan de las colmenas en busca de alimento y agua, es aquí cuando otra buena parte de las heces son eliminadas por las abejas durante el vuelo contaminando así los lugares que ellas han visitado en busca de sus recursos, permitiendo así que por las condiciones favorables que se presentan, las esporas que quedan pueden reproducirse y continúen su ciclo vital en nuevos hospederos que ingieren los alimentos contaminados (Michalczyk & Sokół, 2014).

Otras formas de contaminación horizontal se pueden presentar cuando las obreras realizan el trabajo de limpieza de los panales con restos de heces contaminadas, las esporas pueden ingresar al tracto digestivo de las reinas al ser alimentadas con jalea real proporcionadas por las nodrizas infectadas. Además, la deriva de abejas infectadas y el pillaje de miel pueden ser otras formas de contaminación indirecta y en forma directa el paso de alimento de abeja a abeja; proceso conocido como trofalaxis produce una importante forma de expansión de la enfermedad (De la Sota & Bacci, 2005) (OIRSA, 2012).

Cabe destacar además que, el manejo inadecuado que los apicultores le brindan a sus colmenas puede potencialmente convertirlas en medios de difusión importantes de la enfermedad, debido a que, por diversas situaciones se podrían llegar a movilizar y colocarlas junto a colmenas sanas permitiendo así que las esporas de *Nosema* sp. se dispersen con facilidad llegando a convertirse en un problema integral de los apiarios (NBU, 2015).

2.4.1.8 Sintomatología y efectos provocados por Nosemosis

Dentro de los síntomas agudos que se pueden presentar en las abejas por la infección de *Nosema* sp. se incluyen a alteraciones digestivas debido a la pérdida de absorción del alimento por parte de las células que forman el epitelio del canal alimentario, inclusive la coloración normal marrón del ventrículo cambia a una

blanquecina, generando de ésta manera la excreción de heces líquidas de coloración marrón (Michalczyk & Sokół, 2014).

Varios estudios científicos sugieren que *N. ceranae* es mucho más virulenta que *N. apis* tanto a nivel individual del insecto como a nivel del total de la colonia (Gisder, y otros, 2010). La infección producida por *Nosema*, incrementa la mortalidad de las abejas obreras pero no tienen ninguna influencia en el consumo de alimento (Williams, Shutler, Burgher-maclellan, & Rogers, 2014).

Aunque cabe recalcar que la diferencia más significativa que existe entre los dos tipos de *Nosema*, radica en la capacidad de *N. ceranae* para causar la muerte total de una colmena infestada en el lapso de ocho día después de la exposición al parásito a diferencia de *N. apis*, la cual, puede mantener enfermas a las abejas causándoles paulatinamente la muerte (Nabian, Ahmadi, Shirazi, & Gerami, 2011).

Sin embargo, en muchos casos una gran parte de las colonias infectadas no manifiestan signos claros de la presencia del patógeno en el organismo de las abejas, sin que, esto signifique una importante disminución del rendimiento productivo de miel y la eficiencia polinizadora (de Ruiter, 2013).

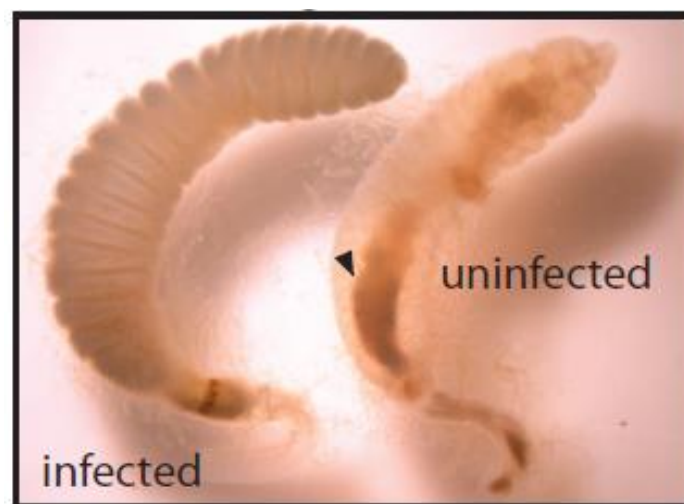


Figura 4 Imágenes de intestinos de abejas: lado izquierdo intestino infectado por *Nosema* sp. y del lado derecho intestino sin infección

Fuente: (Snow, 2016)

2.4.1.9 Diagnóstico de la enfermedad

La Organización Mundial para la Salud Animal con sus siglas en inglés OIE, recomienda en su Manual de Pruebas Diagnósticas y Vacunación para Animales Terrestres del año 2004, la recolección de abejas adultas tomadas de la piquera de las colmenas para la aplicación de técnicas utilizadas en el diagnósticas de *Nosema* sp. (Topolska & Hartwig, 2005).

En el caso de la nosemosis los síntomas clínicos no son una guía clara del padecimiento de la enfermedad, debido a que pueden confundirse con otras enfermedades. Por lo que, la confirmación mediante técnicas de laboratorio se hace necesario para determinar la severidad de la infección y en base a ello planificar las acciones posteriores que se realizaran para controlar la o las enfermedades.

2.4.1.9.1 Microscopía Óptica

La microscopía óptica, es el primer paso para diagnosticar de manera real la presencia de esporas de *Nosema* sp. en el sistema digestivo de abejas sospechosas de padecer nosemosis. Para ello, se capturan abejas obreras adultas de la piquera, teniéndose primero que cubrir la entrada de las piquera o cualquier posible entrada de las abejas al interior de la colmena, para luego preparar un macerado con sus abdómenes (Shimanuki & Knox, 2000).

Con el macerado obtenido se procede a realizar el diagnóstico inicial utilizando un microscopio óptico, donde con una amplificación de 400x se pueden observar las esporas de *Nosema* sp. con su forma oval característica junto con otras partículas que se encuentran en el macerado. Por las características refringentes que presentan las esporas se puede utilizar un microscopio de contraste de fases para observarlas con mayor claridad (Fries, y otros, 2013).

Cabe mencionar que, al utilizar la técnica de microscopía óptica no se pueden distinguir las especies de *Nosema* que se encuentran infectando a las muestra de intestinos de abejas analizados, ya que, no existen diferencias morfológica

distinguibles, por lo que se hace necesario utilizan técnicas moleculares para identificar a cada una de las especies (Martín, y otros, 2007).

2.4.1.9.2 Índice de infestación

Luego de detectar la presencia de esporas de *Nosema* en las muestras analizadas, es necesario determinar el índice de infestación de esporas por abeja, para lo cual se utiliza un hematocitómetro o cámara de Neubaur para contar el número de esporas que se pueden observar en una región específica de la cámara. Dicha región tiene un volumen conocido, gracias a los datos de profundidad y área de cada campo óptico donde se contarán las esporas. Con todos estos datos es posible extrapolar el número total de esporas en toda la muestra analizada. Hay que mencionar que el tamaño de la cámara de conteo puede variar dependiendo del modelo y fabricación, aunque por lo general tiene una profundidad de 0,1 mm y un área de 0,025mm² (Human, y otros, 2013).

2.4.1.9.3 Tinciones

2.4.1.9.3.1 Tinción Giemsa

La técnica de tinción Giemsa permite acentuar ciertos detalles de las esporas de *Nosema* sp. ya que debido a las propiedades refractivas que ellas presentan, en muchos casos no se las puede observar con claridad. Esta técnica permite visualizar de mejor manera la forma ovalada de las paredes celulares de las microsporidias ya que el citoplasma toma una colocación azul grisácea pálida y el núcleo se observa purpura intenso. Esta técnica se la puede utilizar para colorear esporas que se encuentran en preparaciones de fluidos citológicos, pedazos de tejido o artefactos contaminados (Gool & Dankert, 1985) (Garcia, 2002).

Para proceder a realizar esta tinción, hay que primero preparar una solución, diluida la misma que se obtiene al reducir la concentración del producto comercial stock mezclándolo con una solución buffer PBS (pH 7,4) hasta obtener una concentración equivalente a una parte del tinte comercial con nueve partes de la solución buffer (Fries, y otros, 2013).

2.4.1.9.3.2 Inmunofluorescencia indirecta

La microscopía de inmunofluorescencia permite detectar biomoléculas específicas en el interior de las células. Para ello, se utiliza ciertos anticuerpos junto con tintes fluorescentes que al ingresar dentro de las células se unen de manera similar a un sistema “llave-cerradura” con el antígeno que posee la biomolécula que se desea identificar, por eso, los tintes que se utilizan en esta técnica deben poseer la capacidad de atravesar la membrana plasmática o delgadas secciones protectoras que se interpongan entre las moléculas de los anticuerpos y sus biomoléculas meta, además antes de iniciar el proceso de tinción es importante fijar los tejidos o las células que se van a teñir para obtener mejores resultados en el desarrollo de la técnica (Suzuki, Matsuzaki, Hagiwara, & Aoki, 2007).

Al hablar de los agentes fluorescentes que se utilizan en la preparación de las muestras para identificar las microsporidias de *Nosema* sp. hay que mencionar que le brindan una luminosidad brillante intensa a la lámina de quitina que poseen ellas poseen su pared celular. Uno de estos agente es el FB 28 o Calcofluor, el cual facilita la observación de las esporas de resistencia de *Nosema* utilizando un microscopio fluorescente, aunque al no tratarse de un tinte específico pueden teñir también otros hongos de menor tamaño o ciertas particular que contengan quitina (Garcia, 2002).

El método diagnóstico de fluorescencia permite diferenciar detalles como la forma, el tamaño, concavidades y estrías que presentan las microsporidias. La calidad de la resolución que se obtenga de las visualizaciones dependerá del tinte que se utilice, ya que cada tipo de tinte podrá teñir una lámina de quitina de grosor específico. Es así que, se trata de una técnica de diagnóstico de laboratorio que se puede aplicar de forma rápida, simple y de alta sensibilidad en la obtención de resultados relevantes en el diagnóstico de Nosemosis (Gool & Dankert, 1985).

Para iniciar el diagnóstico con la técnica de fluorescencia es importante contar con un protocolo adecuado que permita realizar el diagnóstico de la enfermedad. En rasgos generales tenemos que, primero se deben fijar los tejidos o fluidos a ser examinados. Luego se debe adiciona el agente fluorescente en este caso FB28, para posteriormente aplicar una co-tinción con otros tintes como PI, Hoesch,

entre otros. Finalmente cuando se tienen preparadas correctamente las muestras se proceden a observar con un microscopio adecuado para este propósito (Snow, 2016).

2.4.2 Métodos de control y tratamiento

Uno de los métodos para el control de nosemosis es la esterilización del material contaminado, para ello se utiliza una solución al 80% de ácido acético (una parte de agua por cuatro partes de ácido acético glacial); para fumigar el piso y las paredes de las colmenas. Es importante manejar con extremo cuidado el ácido y no ponerlo en contacto con la piel y los ojos por su poder corrosivo, lo cual también afecta a las piezas metálicas, las cuales deben ser desinfectadas en una solución de agua caliente mezclada con sosa caustica. Es importante también colocar en los espacios entre cada caja torundas de algodón embebidas en 100 ml de ácido acético y dejarlo actuar por una semana, ello ocasionará el control de las esporas y no contamina la miel o el polen contenido en las celdas. Finalmente antes de volver a utilizar las colmenas se las debe dejar airear completamente (NBU, 2015).

En cuanto a la utilización de productos químicos la única alternativa existente hasta el momento es el uso de fumagilina; sustancia extraída del hongo *Aspergillus fumigatus*. Este producto resulta eficaz en el control del parásito ya que, controla la forma vegetativa de ambas especies de *Nosema* sp. pero no destruye a las esporas de resistencia, constituyéndose en un producto que únicamente controla la infección. La dosis recomendada de uso del producto es 25mg del ingrediente activo mezclado con un litro de jarabe de azúcar, debiéndose proporcionar 4 L. de jarabe por colonia (OIRSA, 2012).

Finalmente, como métodos preventivos de la infección por nosemosis se deben considerar ciertas medidas de manejo de las colmenas, como: mantener buenas condiciones de ventilación, protección de temperaturas extremas y humedad, además, es importante asegurarse que si se necesitan adquirir colmenas, éstas provengan de lugares seguros libres de enfermedades y al manejar las colmenas se utilicen equipos en lo posible desinfectados, y de ser posible cambiar las colmenas una vez cada dos años para evitar la proliferación de enfermedades (FAO, 2006).

2.5 Situación de la Nosemosis

2.5.1 En el mundo

Las abejas de todo el mundo, cada vez presentan nuevos problemas de salud debido a la difusión constante de varias enfermedades provenientes de aspectos como la movilización o importación ilegal de abejas, la deriva y la enjambración. Estos se han constituido en un verdadero atentado a la sanidad de la abejas ya que, en muchos casos se desconoce la procedencia original de las nuevas poblaciones, pudiendo convertirse en fuentes potenciales de enfermedades lo que, representa un importante riesgo sanitario no solo a nivel local sino mundial (Ritter, 2014).

Es importante mencionar que, *N. ceranae*, a diferencia de *N. apis*, posee una gran e importante habilidad para diseminarse a través de las poblaciones tanto de *A. cerana* como de *A. mellifera*, lo que le ha permitido distribuirse alrededor de todo el planeta donde se utilizan estas especies de abejas con fines tanto productivos y como agentes polinizadores de varios cultivos de importancia alimenticia para la humanidad (Klee, y otros, 2011).

Es tal la capacidad para diseminarse la enfermedad que se ha reportado por primera vez en el año 2005 la presencia de ambas especies de *Nosema* en las abejas melíferas en países del continente europeo donde la apicultura representa un importante sector en su economía, es así que en Alemania, Francia, Suiza, y España gran parte de sus colonias contaban con la presencia del patógeno pero con diferentes grados de prevalencia (Martín, y otros, 2007).

En la región norte del continente americano, específicamente en los Estados Unidos de Norteamérica, y el Canadá, además de la China en el continente asiático y en Australia *Nosema ceranae* fue reportada entre los años 2008 y 2011. Donde se analizaron muestras de abejas adultas que no presentaban comportamiento o signos morfológicos de la infección. Las muestras fueron recolectadas en diferentes regiones geográficas de los países bajo estudio, llegándose a concluir mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la presencia del parásito en el interior de los insectos analizados (Chen & Huang, 2010) (Copley & Jabaji, 2011).

Una revisión completa del estado sanitario de las abejas a nivel mundial fue publicado en la revista científica *Bee World*, donde se indican referencialmente la distribución de las enfermedades, parásitos y virus que afectan a las abejas fundamentado en estudios, investigaciones y reportes científicos autorizados por organizaciones reconocidas a nivel mundial referente a la investigación en el género *Apis* (Figura 5).

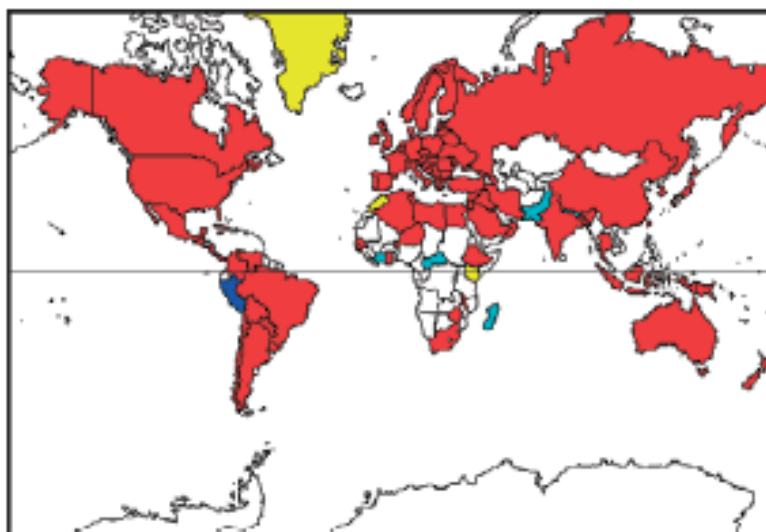


Figura 5 Distribución mundial de la Nosemosis-

Fuente: (Ellis & Munn, 2015)

Descripción del estatus de Nosemosis utilizada en el reporte de la figura 5

Descripción del estatus	Color del país	Criterio empleado
Presente	Rojo	Reportado en un artículo revisado previamente, una revisión o investigación autorizada, reportada por su aparente relevancia mostrando signos reconocibles en campo o utilizando técnicas de laboratorio.
Sospecha de presencia	Amarillo	Reporte anecdótico o testimonial, mediante diagnóstico de campo sin presentar síntomas obvios de la enfermedad.
Sospecha de ausencia	Celeste	Investigaciones limitadas realizadas sin resultados negativos, reporte anecdótico sobre la ausencia de la enfermedad sin síntomas en campo.
Ausencia	Azul	Rigurosamente sin sobrevivencia, los análisis de laboratorio no son apropiados.
No existe información	Blanco	No existe información disponible, reportes anecdóticos de la ausencia de condiciones asintomáticas.

Fuente: (Ellis & Munn, 2015)

2.5.2 América Latina

A nivel de Latino América la prevalencia y distribución de *Nosema cerana*; como única especie parasitaria interna de *Apis mellifera* ha sido reportada en el año 2007 en Sao Paulo-Brasil y en el 2008 en la Región Sur Este de la provincia de Buenos Aires-Argentina, aunque debido a la falta de esfuerzos investigativos por parte de otros países de la región aún no se llega a conocer en su totalidad el nivel de prevalencia y distribución de las especies de *Nosema* en toda la región (Ivernizzi, y otros, 2017).

Además dada la extensión de la apicultura a nivel de todo el continente y relacionada con la reducción de insectos polinizadores se desarrollaron otros trabajos investigativos en los que se documentan la presencia de *Nosema cerana*, en otras

especies polinizadoras como melipónidas y *Polybia scutellaris* (Avispas sociales) en diversas áreas geográficas de Argentina y Brasil, donde utilizando la técnica PCR dúplex se descartó la presencia de *Nosema apis* y se confirmó la presencia de las esporas de *Nosema ceranae*, lo que podría convertirse en un gran problema a nivel sudamericano debido a la capacidad de desplazamiento de las diferentes especies de insectos polinizadores (Porrini, y otros, 2017).

Es importante mencionar también, que el primer diagnóstico referente a los niveles de prevalencia de las especies del género *Nosema* spp. en Uruguay fue presentado en el año 2009, donde, se analizaron 29 muestras de abejas infectadas recolectadas entre los años 2007, 2008, parte del 2004 y antes de 1990. debido a graves pérdidas de colonias que se registraron en esos años en las temporadas de otoño e invierno en diversas regiones a lo largo del país oriental, producto de dichas pérdidas se vieron afectadas las reservas productivas de miel y polen (Ivernizzi, y otros, 2017).

Otro país importante en el sector apícola de la región es Chile, donde el primer reporte de la presencia de *N. ceranae* fue en el año 2012, el estudio se desarrolló en la V Región de Valparaíso debido a la muerte inexplicable de 2915 colmenas de un total de 6167 existentes en la región de estudio. Para el diagnóstico se aplicó la técnica molecular PCR multiplex, con la que, se reafirmó la presencia de *N. ceranae* y se descartó la presencia de *N. apis*. Este hecho permitió concluir que la falta de capacitación en el manejo y control sanitario de las colmenas son factores de riesgo que permiten diseminar con mayor facilidad la enfermedad (Bravo, y otros, 2014).

2.5.3 Ecuador

Las investigaciones referentes a la detección y prevalencia de *Nosema* sp. en *A. mellifera* en el Ecuador son muy limitadas, únicamente se encuentra disponible un trabajo de tesis impulsado por AGROCALIDAD realizado en el año 2015, donde se detalla que entre los meses de abril y mayo del mismo año se muestrearon un total de 280 colmenas de 56 apiarios provenientes de las provincias de Pichincha, Imbabura, Carchi y Esmeraldas, donde se llegó a determinar un nivel de prevalencia del 83,93%

de esporas de *Nosema* en abejas de los apiarios analizados, para ello se utilizó la técnica de conteo de esporas con hematocitómetro como método de principal de diagnóstico (Vivas, 2015).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 Ubicación de los lugares de investigación

3.1.1 Ubicación Política

Ubicación Política de los lugares designados para la investigación

Provincia	Cantón	Parroquia	
Carchi	Mira	Uyuma	
	Montufar	La Paz San Gabriel	
	Tulcán	San Luis	
Imbabura	Antonio Ante	Natabuela Santiago del Rey	
	Cotacachi	El Sagrario Imantag Quiroga	
	Ibarra	Guayllabamba La Carolina San Antonio	
	Cayambe	Cayambe Santa Rosa de Cusubamba	
Pichincha	Mejía	Machachi Aloasí	
	Pedro Moncayo	Nayón	
	Rumiñahui	Sangolquí	
	Quito		Amaguaña Guayllabamba Pifo Pintag

3.1.2 Ubicación Geográfica

Ubicación geográfica de las provincias designadas para la investigación

Provincia	Límites			
	Norte	Sur	Este	Oeste
Carchi	Colombia	Imbabura	Sucumbíos	Esmeraldas
Imbabura	Carchi	Pichincha	Sucumbíos	Esmeraldas
Pichincha	Imbabura	Cotopaxi	Napo	Santo Domingo de los Tsáchilas y Esmeraldas

3.1.3 Ubicación Ecológica

Tabla 1

Ubicación ecológica de las provincias destinadas para la investigación

Provincia	Altitud (m.s.n.m)			Clima (°C)	Precipitación anual (mm)	Hum. Rel. Med (%)
	Max	Med	Min			
Carchi	4768	3461	1200	-12 a 27	809,40	86
Imbabura	4944	3781	200	-5 a 35	652,90	79
Pichincha	5790	2953	115	-14 a 35	781,90	74

Max=Máxima; **Med**=Media; **Min**=Mínima; **Hum. Rel. Med**=Humedad relativa media; **m.s.n.m**=Metros sobre el nivel del mar.

Fuente: (INAMHI, 2014,2015)

3.2 Materiales

3.2.1 Materiales utilizados en el campo

3.2.1.1 Geo-referenciación de apiarios y factores de riesgo

- Encuesta epidemiológica (Anexo N° 1)
- Sistema de posicionamiento Geográfico (GPS), marca: Garmin, modelo: Map 60Cs.

3.2.1.2 Muestreo de colmenas

- Hojas de registro (Anexo N° 2)
- Equipo de apicultura (Overol, guantes de caucho, velo, botas, ahumador y palillos de fósforo)
- Frascos plásticos de boca ancha
- Trozos de esponja
- Etiquetas adhesivas
- Cinta adhesiva
- Marcadores permanentes
- Esferográficos
- Caja térmica
- Hielo

3.2.1.3 Materiales de laboratorio

- Mandil blanco
- Cajas petri de plástico sin división 100 x 15 mm
- Pinzas entomológicas recta de 10 cm, marca: Ento Sphinx
- Hojas de bisturí N° 10
- Mango de bisturí N° 4
- Tubos de ensayo de cristal, de 3 mL
- Paletas de madera
- Pipetas Pasteur, de 3mL
- Cámara de Neubauer
- Porta objetos
- Cubre objetos

- Micropipetas graduada, rango de 0,5 a 10 μL , marca: Boeco
- Micropipetas graduada, rango de 10 a 100 μL , marca: Boeco
- Micropipetas graduada, rango de 100 a 1000 μL , marca: Boeco
- Puntas plásticas desechables, para pipetas de hasta 0,5 μL
- Puntas plásticas desechables, para pipetas de hasta 10 μL
- Puntas plásticas desechables, para pipetas de hasta 100 μL
- Toallas de papel absorbente
- Vasos de precipitación, de 50 mL
- Tubos de reacción de 2mL, marca: Eppendorf
- Gradilla plástica para tubos de ensayo
- Papel para limpieza de lentes de microscopio

3.2.1.4 Reactivos

- Agua destilada
- Solución stock Giemsa, marca: Merck
- Tabletas PBS, marca: Oxoid
- Etanol al 95%, marca: Merck
- Glutaraldehido, marca: Acofarma
- Triton X-100 (PBST), marca: SIGMA
- Agente colorante fluorescente 28 (FB28), marca: SIGMA
- Agente colorante de ADN Hoesch, marca: SIGMA

3.2.1.5 Equipos

- Refrigerador vertical, marca: Indurama
- Microscopio óptico binocular, marca: Olympus, modelo:
- Vortex mixer, marca: Boeco, modelo: VM-300
- Microscopio electrónico de fluorescencia, marca: Olimpus, modelo: CX40
- Incubadora, marca: VWR Scientific products, modelo: VWR300

3.3 Métodos

3.3.1 Levantamiento de información base y contacto con apicultores

Como primer paso se estableció la zona de trabajo, de acuerdo a la base de datos disponible en el Primer Censo Apícola desarrollado por AGROCALIDAD en el año 2015 de las asociaciones de apicultores establecidos en las provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha (Anexo N° 3). Con esta información se procedió a contactar a los líderes y/o representantes de dichas Asociaciones para planificar una reunión de trabajo, en la que se pudo dar a conocer el objetivo de la investigación a desarrollarse y su alcance.

Adicionalmente, se levantó la información base sobre el número y ubicación de los apiarios pertenecientes a los apicultores que mostraron su interés por formar parte del trabajo de diagnóstico de sus colmenas.

3.3.2 Muestreo

3.3.2.1 Geo-referenciación de apiarios, aplicación de encuesta epidemiológica y muestreo de colmenas

Una vez recolectada la información base, se elaboró y difundió el respectivo cronograma de trabajo a desarrollarse, donde se indicaron cada una de las actividades y el plazo para cumplirlas.

En el cronograma de trabajo se detallaron las fechas tentativas establecidas para visitar los apiarios, con la finalidad de registrar la ubicación exacta de los mismos mediante geo-referenciación utilizando el equipo de posicionamiento geográfico (GPS). Por otra parte, hay que mencionar que los datos obtenidos podrían ser utilizados en estudios complementarios posteriores.

También se aplicaron las encuestas epidemiológicas (Anexo N° 1) a los apicultores propietarios de los apiarios visitados con el objetivo de tener un panorama general del manejo y finalidad de sus colmenas. Luego de lo cual, se procedió a tomar las muestras de las colmenas.

3.3.2.2 Geo-referenciación de apiarios utilizando la aplicación EpiCollect 5

Como una forma de registro electrónico complementario de la posición geográfica y datos generales de los apiarios visitados se utilizó la aplicación web EpiCollect 5, la misma que permite fácilmente generar formularios (cuestionarios); en forma de proyectos web con el consecuente almacenamiento de datos, los cuales, se recopilan incluyendo posicionamiento GPS y medios de comunicación. Para el correcto almacenamiento de datos es necesario utilizar un dispositivo electrónico portátil e inteligente (teléfono celular o Tablet); ello permitirá además de almacenar los datos en la red observarlos utilizando aplicaciones complementarias como Google Maps, tablas y gráficos.

Para empezar a utilizar esta aplicación, es necesario crear una cuenta de usuario, en la página web de la aplicación. Posterior a ello se debe diseñar un proyecto en el cual se irán creando los formularios (cuestionarios) con el número de preguntas necesarias para cubrir datos generales de los apiarios, e inclusive se pueden registrar fotografías y audios que contengan información relevante para la investigación.

Una vez creados los formularios y posterior a la descarga de la aplicación en un dispositivo móvil se fueron registrando uno a uno los siguientes datos: hora y fecha del muestreo, posicionamiento geográfico de los apiarios, información referencial y de contacto de los propietarios y generalidades sobre las condiciones, tipo y número de colmenas a ser muestreadas.

El uso de esta aplicación en el desarrollo de la investigación tuvo dos objetivos, ya que a más de convertirse en una herramienta de respaldo en la generación de datos referentes al trabajo de campo, permitió registrar y controlar en tiempo real el avance del cronograma de trabajo de campo propuesto al inicio del proyecto de investigación.

3.3.3 Estimación del tamaño y selección de la muestra

Para el muestreo se estratificaron los apiarios de acuerdo a la base de datos generada por AGROCALIDAD (Anexo N° 3), según el número de apiarios en cada provincia. A cada apiario se le asignó un código único de referencia y dentro de ellos se realizó el mismo procedimiento con cada una de las colmenas a ser muestreadas.

La estratificación de los apiarios se realizó de acuerdo al número de colmenas contenidas en los apiarios bajo estudio, con ello se pudo obtener los estratos que se indican en la Tabla 2.

Finalmente, luego de establecer las identificaciones pertinentes, con el uso de la función “números al azar” de Excel se seleccionaron los apiarios a ser muestreados.

Tabla 2
Estratificación de los apiarios según el número de colmenas

Número de colmenas	Tamaño del apiario
Menos de 10	Pequeño
Entre 11 y 50	Mediano
Entre 51 y 150	Grandes
Más de 150	Extra grandes

Pasando al tema de la estimación del tamaño de la muestra para estudios epidemiológicos, (Mateu & Casal, 2003), mencionan que se deben tomar en cuenta los siguientes parámetros: a) nivel de confianza de la prueba diagnóstica (95%), b) error estándar del muestreo (5%) y c) una precisión absoluta del estudio del 5%. Por lo que, para estimar el tamaño de la muestra para realizar una encuesta epidemiológica se debe aplicar la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z^2 \times p \times (1 - p)}{d^2}$$

Dónde:

n: Número de muestras

Z: Valor del intervalo de confianza (Coeficiente)

p: Frecuencia esperada del factor a estudiar

d: Precisión absoluta del estudio

Luego de haber obtenido el tamaño de la muestra, se procedió a recalcular este dato aplicando un factor de corrección en función del número de colmenas por provincia; de acuerdo a la información generada por AGROCALIDAD (Anexo N° 3), aplicando la siguiente fórmula:

$$n_o = \frac{N \times n}{N + n}$$

Dónde:

N: Total de apiarios por provincia

n: Número de muestras (obtenido con la fórmula anterior)

n_o: Número final de muestras corregido

3.3.3.1 Cálculos realizados para la obtención del número de muestras

Z=1,96 (95%)

p= 0,5 (porcentaje de prevalencia de *Nosema* sp. esperado en los apiarios de la zona de estudio)

d=0,05 (precisión absoluta del estudio del 95%)

$$n = \frac{(1,96)^2 \times 0,5 \times (1 - 0,5)}{(0,05)^2} = 384,16$$

El resultado que se obtuvo al aplicar la fórmula del tamaño de la muestra sin el factor de corrección, fue de 384 muestras (apiarios) en las tres provincias, pero

debido al hecho de que se utilizarán tres métodos diagnósticos en la investigación, se pudo reducir la precisión del estudio al 90% (0,1), con lo cual el tamaño recalculado de la muestra (colmenas) para las tres provincias fue de 96 apiarios, como se indica a continuación:

$$n = \frac{(1,96)^2 \times 0,5 \times (1 - 0,5)}{(0,1)^2} = 96,04$$

Posterior a la aplicación de la fórmula de corrección del número de muestras totales en las tres provincias, se procedió a calcular el número de muestras por cada provincia en base al número total de apiarios reportados por AGROCALIDAD (Anexo N° 3), razón por la cual, se obtuvieron las siguientes tallas de muestra (número de apiarios):

Para Pichincha:

N=108 (total de apiarios en la provincia)

n=96 (muestra calculada)

$$n_o = \frac{108 \times 96}{108 + 96} = 50,82$$

El número corregido de apiarios a ser muestreados para la provincia de Pichincha, fue de 51.

Para Imbabura:

N=74 (total de apiarios en la provincia)

n=96 (muestra calculada)

$$n_o = \frac{74 \times 96}{74 + 96} = 41,79$$

El número corregido de apiarios a ser muestreados para la provincia de Imbabura, fue de 42.

Para Carchi:

N=40 (total de apiarios en la provincia)

n=96 (muestra calculada)

$$n_o = \frac{40 \times 96}{40 + 96} = 28,23$$

El número corregido de apiarios a ser muestreados para la provincia de Carchi, fue de 28.

Una vez determinado el número de colmenas a ser muestreadas por apiario, dependiendo del número de colmenas que contenidas en cada apiario. Con este antecedente se asignó una proporción adecuada de colmenas que deberían ser muestreadas para cada apiario según su tamaño, ello con el objetivo de elevar el nivel de precisión del estudio.

Complementariamente se calculó la cantidad promedio de colmenas por apiario, con lo cual se obtuvo el número máximo de colmenas a ser muestreadas tanto por apiario como por provincia.

La proporción asignada de colmenas según el tamaño de los apiarios fue la siguiente:

- Apiarios pequeños (menos de 10 colmenas): la proporción asignada fue de 1/2 del total de colmenas, con lo cual se muestrearon un número máximo de 5 colmenas en éste tipo de apiario.
- Apiarios medianos (entre 11 y 50 colmenas); la proporción asignada fue de 1/3 del total de colmenas, con lo cual se muestrearon un número máximo de 17 colmenas por apiario.
- Apiarios grandes (51 a 150 apiarios); la proporción asignada fue de 1/4 del total de colmenas; con lo cual se muestrearon un número máximo de 37 colmenas por

apiario.

- Apiarios extra grandes (más de 150 colmenas); la proporción asignada fue de 1/8 del total de colmenas; con lo cual se muestrearon un número máximo de 45 colmenas por apiario.

De acuerdo a las proporciones asignadas se calcularon tanto el número de apiarios como el número de colmenas que deberían ser muestreadas por cada provincia:

Tabla 3
Número de apiarios y colmenas estimadas para muestreo en la provincia de Pichincha

Tamaño del apiario	Núm. de apiarios	Proporción	NASM	NCSM
Pequeños	56	½	30	150
Medianos	45	⅓	16	256
Grandes	3	¼	2	74
Extra grandes	4	⅛	2	100
TOTAL	108		50	580

Núm: Número; NASMC: Número de apiarios a ser muestreados; NCSM: Número de colmenas a ser muestreadas

Tabla 4
Número de apiarios y colmenas estimadas para muestreo en la provincia de Imbabura

Tamaño del apiario	Núm. de apiarios	Proporción	NASM	NCSM
Pequeños	46	½	31	155
Medianos	25	⅓	10	160
Grandes	3	¼	1	37
Extra grandes	0	⅛	0	0
TOTAL	74		42	352

Núm: Número; NASMC: Número de apiarios a ser muestreados; NCSM: Número de colmenas a ser muestreadas

Tabla 5
Número de apiarios y colmenas estimadas para muestreo en la provincia del Carchi

Tamaño del apiario	Núm. de apiarios	Proporción	NASM	NCSM
Pequeños	19	½	15	75
Medianos	18	1/3	11	176
Grandes	2	¼	1	37
Extra grandes	1	1/8	1	45
Total	40		28	333

Núm: Número; NASMC: Número de apiarios a ser muestreados; NCSM: Número de colmenas a ser muestreadas

Total de apiarios a ser muestreados en las tres provincias= 120

Total de colmenas a ser muestreadas en las tres provincias= 1265

Cabe mencionar que, los datos presentados en las tablas 3, 4 y 5 representan el tamaño ideal de la muestra que se debería tomar en la investigación, pero hay que tomar en cuenta la predisposición y colaboración de todos los apicultores para contribuir con el desarrollo del trabajo; con lo cual, a lo largo del trabajo de campo el número de muestras se vio afectado.

3.3.4 Colecta de muestras

Se procuró coleccionar únicamente abejas adultas de la piquera (entrada) de las colmenas, siguiendo el protocolo modificado por (Fries, y otros, 2013), para recolección de muestras destinadas al análisis de Nosemosis, el cual se detalla a continuación:

- Antes de iniciar con la recolección se debe cubrir la entrada de las colmenas que van a ser muestreadas utilizando pedazos de esponjas u otro material disponible como papel o madera, esto con el objetivo de recolectar únicamente abejas adultas pecoreadoras, elevando así la precisión del diagnóstico.

- Posteriormente, con la ayuda de los frascos plásticos de boca ancha de 100 mL se realiza un barrido de la parte frontal de las colmenas donde se apilonan las abejas para dejarlas caer en el interior del frasco hasta obtenerse un número aproximado de entre 25 y 35 individuos por muestra; este procedimiento se lo repite en cada una de las colmenas a ser muestreadas.
- Luego se cierran los frascos con las muestras y se los rotulan indicando el código asignado a cada apiario y colmena además de la fecha de recolección, así: A1-C1-fecha (A: apiario, C: colmena).
- Finalmente se colocan los frascos con las muestras dentro de una caja térmica, la cual contiene hielo en su interior para mantenerlas a 5°C hasta que puedan ser transportadas al laboratorio de Sanidad Animal, de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, donde se las mantuvo en refrigeración a 4°C por 48 horas para que las abejas cesen sus funciones vitales y se las pueda analizar.

3.3.5 Fase de laboratorio

3.3.5.1 Pruebas diagnósticas

3.3.5.1.1 Microscopía óptica

3.3.5.1.1.1 Preparación de muestras

- En el laboratorio, se retiró el frasco de la refrigeradora y se tomaron 20 abejas, las que se depositaron sobre una caja Petri plástica descartable, donde con la ayuda de una pinza de disección y el bisturí se separaron el abdomen del tórax de cada una de las abejas.
- Luego de separarlos del resto del cuerpo, se colocan los abdómenes en un tubo de ensayo de vidrio previamente esterilizado y se les añade 1 mL de agua destilada, para luego macerarlos utilizando una paleta de madera hasta formar una mezcla homogénea.

- El macerado obtenido se lo separó de las partículas de mayor tamaño utilizando una pipeta Pasteur plástica y se colocó 1 mL del macerado en un tubo de reacción Eppendorf.
- Una vez separado el macerado, con la ayuda de una micro pipeta se colocan 10 μ L del mismo sobre un portaobjetos limpio y se la cubre con un cubre objetos de cristal y se procede a analizarla con la ayuda del microscopio óptico con un aumento de 400x.
- Este procedimiento se lo debe repetir con cada una de las muestras a ser analizadas.

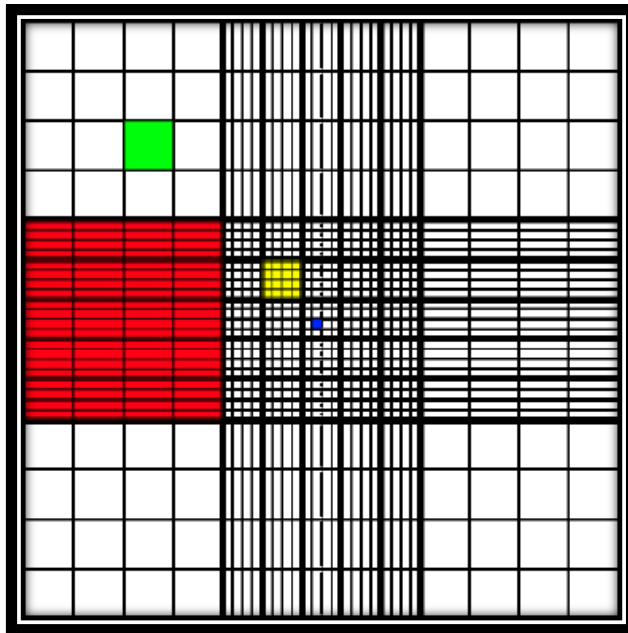
Este procedimiento facilitó el diagnóstico inicial de la presencia de las microsporidias de *Nosema* sp. en las muestras analizadas, pero se debe analizar las muestras con mucha precaución ya que las esporas tienen un alto poder refractivo de la luz lo que ocasiona en algunos casos que no se distingan correctamente por su translucidez, para lo cual, la graduación de la entrada de luz con el diafragma del microscopio mejorará la resolución de las microsporidias.

3.3.5.2 Estimación de la concentración de Esporas mediante el uso del hematocitómetro

- Primero se debe limpiar con mucho cuidado tanto el hematocitómetro (Cámara de Neubauer) como el vidrio cobertor utilizando papel especial para limpieza de lentes y agua destilada; con ello se evitará la presencia de impurezas que puedan producir errores de conteo.
- Sobre el hematocitómetro limpio y seco colocamos el cubre objetos y por uno de los bordes añadimos cuidadosamente una gota de la muestra con la ayuda de la micro pipeta para que la misma se pueda deslizar e ingresar al interior de la cámara por capilaridad, este paso lo realizamos en cada una de las dos cámaras que posee el hematocitómetro.
- Luego dejamos que la muestra se estabilice por unos pocos minutos y procedemos a realizar el conteo de las esporas en cada uno de los campos de color azul; como se indica en la figura N° 6, utilizando el microscopio óptico con un aumento de 400x.

- Además al momento de realizar el conteo se debe tener cuidado de contar las esporas que se encuentre total o parcialmente dentro de la cuadrícula de conteo como se indica en la figura N° 7.
- De darse el caso de observarse una gran cantidad de esporas tal que, no se puedan contar, se deberá preparar una dilución adicionando un mL de agua destilada y homogenizarla con la ayuda de un vortex a la muestra hasta que se pueda contar con facilidad las esporas, los mL que se hubieren adicionado en las diluciones deberán tenerse muy en cuenta al momento de aplicar la fórmula para calcular el número de esporas totales por muestra.
- Esta técnica permite calcular el número de partículas por mL de la muestra original, haciendo referencia a un volumen conocido de la muestra que se deposita en la cámara
- Para conocer el número de esporas en la muestra se aplicará la siguiente fórmula:

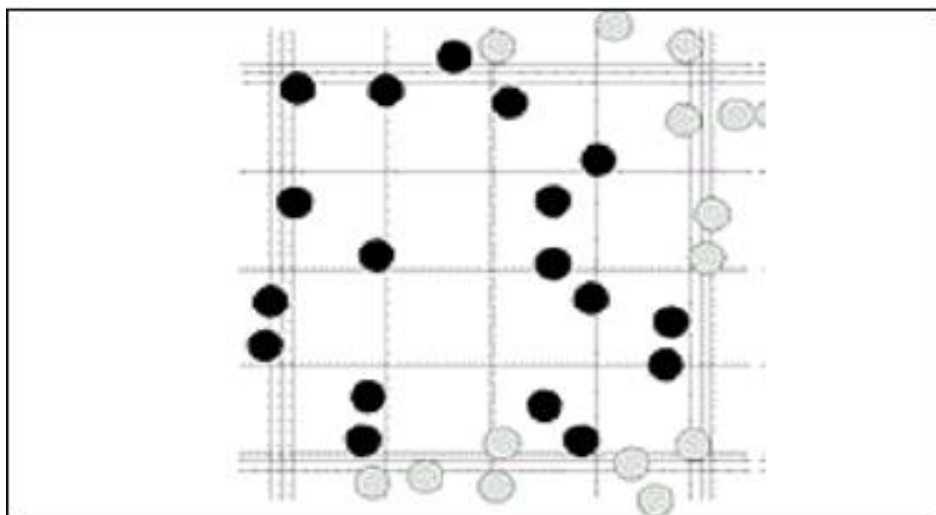
$$\text{Núm de esporas por ml} = \frac{\text{Promedio de esporas totales contadas} \times \text{factor de dilución}}{\text{Area de la cámara (mm)} \times \text{Profundidad de la cámara (mm)}}$$



Cuadrado rojo= 1mm^2 , cuadrado verde= $0,0625\text{mm}^2$, cuadrado amarillo= $0,04\text{mm}^2$ y cuadrado azul= $0,0025\text{mm}^2$, a una profundidad de $0,1\text{mm}$.

Figura N° 6 Cuadrícula del hematocitómetro

Fuente: (Human, y otros, 2013)



Al momento de realizar el conteo de esporas, solo se contarán a aquellas que se encuentren totalmente o parcialmente dentro de la cuadrícula y no se contarán aquellas que se encuentren en la línea inferior e izquierda de la cuadrícula como se indica en el ejemplo (círculos de color negro).

Figura N° 7 Conteo de esporas en el hematocitómetro

Fuente: (Human, y otros, 2013)

3.3.5.3 Tinción Giemsa

Esta técnica permite confirmar el diagnóstico positivo realizado con microscopía óptica de la presencia de *Nosema* sp. Para ello, antes de realizar el proceso de teñido de las esporas, se debe preparar una solución Giemsa al 10%, la cual, se obtiene al diluir el colorante Giemsa (stock) comercial en una solución PBS (pH 7.4) en una proporción 1:9.

3.3.5.3.1 Preparación de muestras

- El primer paso es realizar un frotis del macerado obtenido de los abdómenes de las abejas sobre un porta objetos y se lo deja secar por 20 minutos a temperatura ambiente.
- Posterior a ello, se realiza el siguiente procedimiento para fijar las esporas. Se coloca sobre el frotis unas gotas de metanol al 95 % cubriendo por completo la placa y se lo deja actuar por 5 minutos.
- Luego se elimina el exceso de metanol volteando las placas, para luego regresarlas a la posición inicial y se coloca sobre la misma placa unas gotas de la solución Giemsa al 10%, para dejar actuar el colorante por 10 minutos.
- Transcurrido ese tiempo, se enjuaga cuidadosamente las placas dejando caer sobre ellas un pequeño chorro de agua destilada.
- Se deja secar completamente las placas a temperatura ambiente, para finalmente observarlas con la ayuda de un microscopio óptico con un aumento de 400x, para diferenciar las estructuras de las microsporidias.

3.3.5.4 Microscopía de Inmunofluorescencia Indirecta

Esta técnica permite realizar un tercer diagnóstico confirmativo de la presencia de microsporidias de *Nosema* sp. en las muestras analizadas, por lo cual, se debe procurar conservar las esporas obtenidas en el macerado que se utilizó para realizar las primeras técnicas de diagnóstico en el mejor estado natural posible.

Para conservar cada muestra y evitar la germinación de las microsporidias de *Nosema*, se tomará 1mL del macerado obtenido de los abdómenes de las abejas bajo estudio y se lo colocará en un tubo de reacción Eppendorf, se le añadirá 0.5mL de

una solución de glutaraldehído al 3%, para luego homogeneizar la mezcla agitando con la ayuda de un vortex mecánico y se las almacenarán en refrigeración a 4°C por lo menos dos horas para luego continuar con el procedimiento.

3.3.5.4.1 Preparación de muestras

- Previo al análisis con la técnica de fluorescencia indirecta se debe realizar un frotis de los macerados de las muestras que presentaron mayor porcentaje de infestación, luego de analizarlas con microscopía óptica y, realizar el conteo de esporas con la técnica del hematocitómetro.
- Luego de realizado el frotis se dejará secar la placa por el lapso de 5 minutos a temperatura ambiente, transcurrido ese tiempo se realizan dos lavados de 10 minutos cada uno de las placas con una solución PBS + 0,1% Triton X-100 (Solución PBST). Para cada lavado se colocarán sobre las placas 1 ml de la solución PBST utilizando una micropipeta graduada. Al consumirse los 10 primeros minutos de deja escurrir el exceso de la solución detergente y se realiza el segundo lavado.
- Posterior a los lavados se incuban las placas distribuyendo sobre ellas 500 µL del colorante fluorescente FB28, conocido también como Calcofluor Blanco M2R, y se deja actuar por 24 horas manteniéndolas a 4°C en cámara húmeda y protegidas de la luz directa.
- Al día siguiente se lavarán por dos ocasiones más las muestras nuevamente utilizando la solución PBST, por 10 minutos cada lavado.
- Adicionalmente se realiza una co-tinción utilizando el colorante Hoesch en una dilución 1:2000, distribuyendo 200 µL del mencionado colorante sobre las placas lavadas y procederá a incubarlas nuevamente 10 segundos a 4°C en cámara húmeda y protegidas de la luz directa.
- Después se realizan dos nuevos lavados de las placas con la solución PBST para eliminar el exceso de colorante.
- Finalmente se deja secar las placas totalmente a temperatura ambiente en un lugar protegido de la luz directa y se procederá a visualizar las placas utilizando el microscopio de fluorescencia marca Olympus; modelo: CX40.

3.3.6 Interpretación de resultados

3.3.6.1 Microscopía óptica

Para el caso de microscopía óptica se determinaron como positivas las muestras en las que se pudieron observar la presencia de por lo menos una espora de *Nosema* sp, luego de realizar un barrido total de observación de cada muestra; caso contrario se designó a la muestra como negativa.

3.3.6.2 Conteo de esporas mediante el uso del hematocitómetro

Luego de haber obtenido la concentración de esporas por abeja mediante la utilización del método del hematocitómetro, procedemos a determinar el grado de infestación por abeja, para ello, se deben clasificar las colmenas infestadas en tres grupos considerando el número de esporas por abeja como se indica en la tabla 6.

Tabla 6 Niveles del grado de infestación de Nosema

Grado de infestación	Número de esporas por abeja (millones)
Bajo	0.1 – 5.0
Medio	5.1-10.0
Alto	Más de 10.1

Fuente: (Yücel & Dogaroglu, 2005)

3.3.7 Análisis estadístico de resultados

3.3.7.1 Pruebas estadísticas para determinación de diferencias significativas en el cálculo de los resultados por variables

El objetivo de aplicar las pruebas de significancia estadística es evaluar la probabilidad de que el efecto que se desea observar difiera de la hipótesis nula, dicha significancia se expresa en intervalos de confianza del 95%, cuyo rango incluye la medida estimada que se obtiene de los datos estudiados con una probabilidad (p) de incluir al valor real del 95% (Merletti, Solkolne, & Vineis, 2011).

Para determinar la diferencia significativa de cada una de las variables expuestas para evaluar la relación entre la exposición y respuesta en el presente trabajo investigativo se empleó la prueba de la tendencia de Chi cuadrado χ^2 .

3.3.7.2 Aplicación de pruebas estadísticas

Para realizar cada uno de los análisis estadísticos se utilizó el software de acceso libre disponible en la red Epi Info7, el cual permite a los investigadores desarrollar sistemas de vigilancia de enfermedades mediante el análisis de datos utilizando estadísticas epidemiológicas.

El correcto análisis de los datos se fundamenta en la elaboración de una buena base de datos de todas las variables a ser analizadas, la misma que será creada en Excel y posteriormente será integrada al programa Epi Info 7 para el posterior análisis de los datos.

3.3.7.3 Determinación de factores de riesgo

Para el análisis de dichos factores y debido al tipo de estudio de cohorte se utilizó la medida OR (Odds Ratio o Caso-Control), esto se lo aplicó en función de las encuestas epidemiológicas aplicadas a los apicultores donde se detallan ciertos factores de riesgo que podrían influir en la presencia o no de *Nosema* sp.

Los factores de riesgo tomados en cuenta fueron: localización, factores de manejo (trashumancia, tipo de apiario, conocimiento del apicultor, captura de enjambres) y tipo de colmena, como aspectos de riesgo de mayor importancia.

CAPÍTULO IV

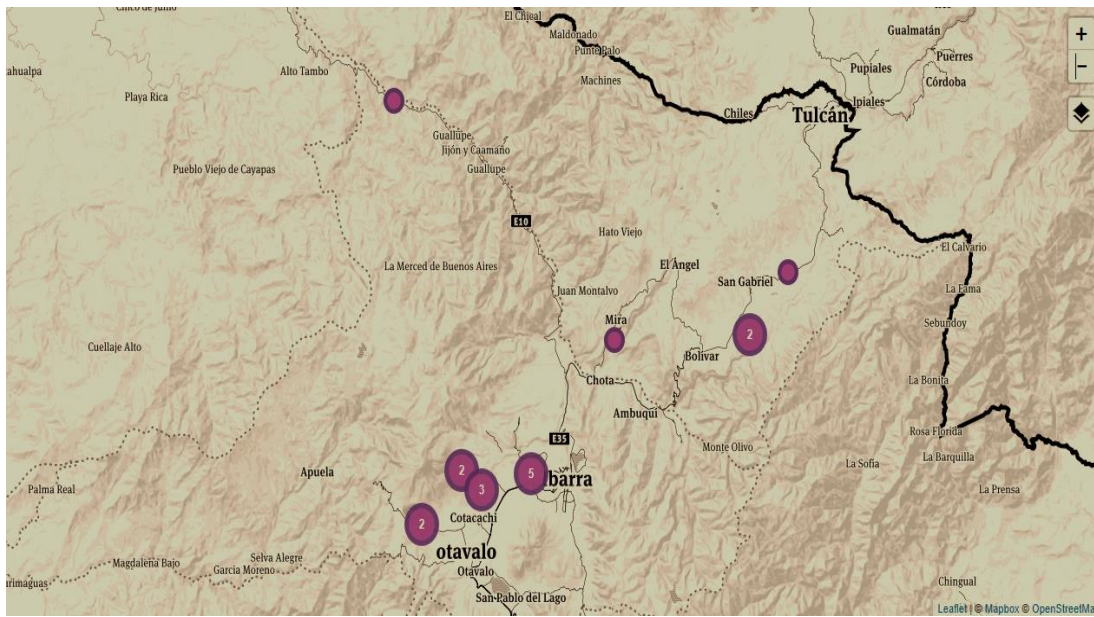
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Origen geográfico y localización de las muestras

Durante el periodo comprendido entre los meses de mayo y agosto del año 2017, se muestrearon un total de 30 apiarios ubicados en las provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha; los mismos que fueron georreferenciados como se indica en las Figuras 8 y 9.

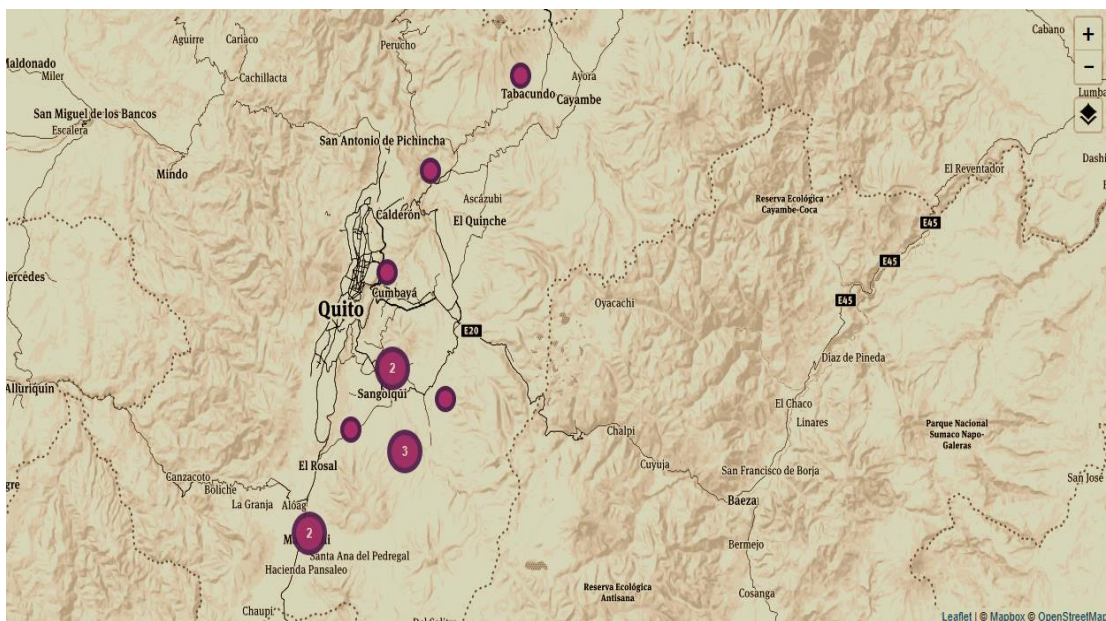
Es importante mencionar, que la base de datos existente de la georreferenciación de los apiarios no se la presenta en este documento. Esto se debe a que, el manejo de la misma es confidencial y no se la puede exponer en un documento público de acceso libre; ya que, como lo mencionaron varios apicultores se han dado muchos casos de pérdida o destrucción de las colmenas. Por eso al tener esta información a mano se podrían producir ciertos inconvenientes los cuales atentarían al trabajo cooperativo que llevan a cabo los entes investigativos como es caso de la Universidad de Las Fuerzas Armadas-ESPE y los apicultores, afectando el desarrollo de futuros trabajos referentes a el área de apicultura.

De ser necesaria la constatación física de la base de datos georreferenciados estará disponible en el Laboratorio de Sanidad Animal de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria- IASA de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE; bajo la responsabilidad del Docente Investigador Dr. Jorge Ron Román PhD.



● Apiarios

Figura 8 Distribución de apiarios en las provincias de Carchi e Imbabura



● Apiarios

Figura 9 Distribución de apiarios en la provincia de Pichincha

Tabla 7
Distribución del número de colmenas muestreadas en función del total de colmenas existentes en los apiarios bajo estudio

Id. Apiario	Núm. Total de colmenas	Núm. de colmenas muestreadas	Porcentaje de muestreo
1	81	23	28.40%
2	43	10	23.30%
3	11	5	45.50%
4	88	12	13.60%
5	47	14	29.80%
6	18	7	38.90%
7	18	7	38.90%
8	83	14	16.90%
9	38	14	36.80%
10	20	5	25.00%
11	71	13	18.30%
12	45	10	22.20%
13	44	14	31.80%
14	107	25	23.40%
15	16	5	31.30%
16	10	4	40.00%
17	29	10	34.50%
18	14	6	42.90%
19	23	7	30.40%
20	12	5	41.70%
21	33	12	36.40%
22	5	2	40.00%
23	13	5	38.50%
24	11	5	45.50%
25	38	12	31.60%
26	20	7	35.00%
27	6	5	83.30%
28	5	3	60.00%
29	48	15	31.30%
30	2	2	100.00%
TOTAL	999	278	23.78%

Id: identificación; Núm: Número

Además, en la Tabla 7 se detallan los datos recopilados del total de colmenas contenidas en cada uno de los apiarios bajo estudio, con lo cual, se determinó el número de colmenas a ser muestreadas dependiendo del tamaño del apiario.

Con ello se constata que, del total de colmenas existentes en los 30 apiarios analizados se muestreo el 23.78% (278/999) de ellas, convirtiéndola así en un

tamaño de muestra adecuado para obtener resultados representativos al desarrollar los análisis estadísticos de los datos obtenidos.

Por ende, las conclusiones obtenidas con el muestro serían válidas para aplicarlas a la totalidad de la población de abejas ubicadas en las zonas geográficas seleccionadas, ya que al realizar la extrapolación de los datos los resultados obtenidos en las pruebas estadísticas son confiables.

Tabla 8
Distribución de colmenas existentes y muestreadas en función del apicultor

	Col. Existentes	Col. Muestreadas	% De Muestreo
Apicultor 1	529	60	11.34%
Apicultor 2	15	5	33.33%
Apicultor 3	393	54	13.74%
Apicultor 4	176	33	18.75%
Apicultor 5	146	23	15.75%
Apicultor 6	325	25	7.69%
Apicultor 7	15	5	33.33%
Apicultor 8	10	4	40.00%
Apicultor 9	55	10	18.18%
Apicultor 10	49	13	26.53%
Apicultor 11	15	5	33.33%
Apicultor 12	78	12	15.38%
Apicultor 13	18	7	38.89%
Apicultor 14	15	5	33.33%
Apicultor 15	49	15	30.61%
Apicultor 16	3	2	66.67%
TOTAL	1891	278	14.70%

Col: Colmenas; %: Porcentaje

4.2 Descripción de la muestra en función de provincia, cantón, apiario y tipo de colmena

Tabla 9
Frecuencia de colmenas muestreadas por provincia y cantón

Provincia	Cantón	N° Apiarios	N° Colmenas	Porcentaje
Carchi		4	37	13.31%
	Mira	1	25	8.99%
	Montufar	2	10	3.60%
	Tulcán	1	2	0.72%
Imbabura		13	126	45.32%
	Antonio Ante	2	27	9.71%
	Cotacachi	7	54	19.42%
	Ibarra	4	45	16.19%
Pichincha		13	115	41.37%
	Cayambe	2	14	5.04%
	Mejía	2	7	2.52%
	Pedro Moncayo	1	12	4.32%
	Quito	7	77	27.70%
	Rumiñahui	1	5	1.80%
Total		30	278	100.00%

N°: Número

Luego de haber analizado los apiarios, pasamos a las colmenas donde un total de 278 colmenas se muestrearon entre en el mismo espacio de tiempo destinado para la investigación, éstas se encontraron distribuidas en las provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha como se puede observar en la Tabla 9.

El alto porcentaje de colmenas muestreadas tanto en Imbabura como en Pichincha (45,32% y 41,37% respectivamente), se debe a la gran concentración de colmenas en las mencionadas provincias según lo reportado en el Primer Catastro Nacional de Explotaciones Apícolas realizado por AGROCALIDAD, (2016).

Por otro lado en la misma Tabla 9, se puede observar también la distribución de colmenas muestreadas en cada uno de los Cantones pertenecientes a las Provincias bajo estudio.

Tabla 10
Distribución general de colmenas por tipo

Tipo de colmena	Nº	Porcentaje
A (1 piso)	91	32.73%
B (1 piso, 1 shalo)	132	47.48%
C (1 piso, 2 shalos)	29	10.43%
D (2 pisos)	14	5.04%
E (2 pisos, 1 shalo)	6	2.16%
G (3 pisos)	6	2.16%
Total	278	100.00%

Nº: Número; shalo: media alza

En cuanto a la distribución general de colmenas por su tipo hay que destacar que el porcentaje más alto (47,48%; 132/278) de colmenas muestreadas, fueron de tipo B (1 piso y 1 shalo), lo cual indica que se encontraban en fase de producción de miel. De forma adicional hay que mencionar que los otros tipos de colmenas en producción son: C (1 piso y 2 shalos; 10,43%) y E (2 pisos y 1 shalo; 2,16%). El detalle de la distribución de las colmenas por tipo se puede observar en la Tabla 10.

Luego, al analizar la distribución de colmenas por el tipo, en cada una de las provincias en las cuales se intervino, (ver Tabla 11), se puede apreciar la misma tendencia, en donde se refleja un mayor porcentaje de colmenas muestreadas pertenecientes al tipo B, con la excepción de la provincia de Imbabura donde gran parte de los apicultores se dedican a la reproducción de colmenas.

Tabla 11
Distribución de colmenas por el tipo en las provincias intervenidas

Provincia	Pichincha		Imbabura		Carchi	
Tipo de colmena	Nº Col.	Frec.	Nº Col.	Frec.	Nº Col.	Frec.
A	25	21.74%	63	50.00%	3	8.11%
B	62	53.91%	48	38.10%	22	59.46%
C	19	16.52%	2	1.59%	8	21.62%
D	2	1.74%	10	7.94%	2	5.41%
E	1	0.87%	3	2.38%	2	5.41%
G	6	5.22%	0	0.00%	0	0.00%
TOTAL	115	100.00%	126	100.00%	37	100.00%

Nº Col: Número de colmena; Frec: Frecuencia

4.3 Análisis de la prevalencia de *Nosema* sp. en la zona bajo estudio

4.3.1 Determinación de la prevalencia general del *Nosema* sp.

El 23,38% (66/278) del total de colmenas muestreadas resultaron positivas a la presencia de esporas de *Nosema* sp. luego de realizar el análisis microscópico de las suspensiones, dato que se puede observar en detalla en la tabla 12.

Tabla 12

Presencia general de *Nosema* sp. en las colmenas analizadas

Presencia de <i>Nosema</i> sp.	Frecuencia	Porcentaje
Negativa	213	76.62%
Positiva	65	23.38%
Total	278	100.00%

Hay que mencionar que, el porcentaje (23.38%) de *Nosema* sp. determinado en éste estudio se observa elevado en comparación con los datos reportados por La Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD) en el año 2015, los mismos que indican que la prevalencia del parásito en el Ecuador sería del 9%.

Por otra parte, es importante indicar que, la información referente a la prevalencia de *Nosema* sp. en el país es escasa, debido a que únicamente se dispone de un trabajo de tesis realizado por Vivas, (2015), donde con un número similar de colmenas (n=280) y algo mayor de apiarios (n=56) prácticamente en la misma Zona de Estudio de la presente investigación, se llegó a determinar una prevalencia de *Nosema* sp. por colmenas del 40,71% (114/280), información que dista de los datos obtenidos en el presente estudio (23,38%:65/278), considerando que la época del año en la que se recolectaron las muestras es la misma en ambos casos.

Y aunque la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), no maneja datos del nivel de prevalencia de *Nosema* sp. a nivel de Latino América debido a la falta de reportes científicos de la presencia del patógeno en algunos países de la región; entre los que se incluye al Ecuador; menciona además que *Nosema* sp. se ha

desplazado rápidamente por todo el mundo convirtiéndose así en una enfermedad cosmopolita ubicada en segundo lugar en importancia debido a los efectos nocivos que produce sobre *A. mellifera* luego de *Varroa* sp. (OIE, 2017).

A nivel regional se han reportado casos puntuales de la prevalencia de las microsporidias del hongo en países con un mayor desarrollo en el área sanitaria apícola como es el caso de Argentina donde (Molineri & Schnittger, 2017) llegaron a determinar 64% de positividad en una muestra de 363 colmenas pertenecientes a 59 apiarios distribuidos en la región central de ese país, además dichos sectores presentan climas templados y subtropicales, similares condiciones a las que se presentaron en los zonas de estudio de la presente investigación.

Otro caso puntual es el de Uruguay, donde (Ivernizzi, y otros, 2017) reportaron que, en ese país se registró un nivel de incidencia de Nosemosis inferior al 30% de un total de 29 muestras analizadas las que fueron recolectadas en diferentes años (n=26 obtenidas entre los años 2007-2008, n=2 en el 2004 y n=1 antes de 1990), manteniéndose constante dicho nivel de infestación desde la década de los 90, nivel que comparado con el obtenido en el presente trabajo es similar aunque no se tienen datos de años anteriores al año 2015 en el Ecuador.

4.3.2 Presencia de *Nosema* sp. a nivel de provincia, apiario y cantón

Tabla 13
Presencia de *Nosema* por Provincia

Presencia de <i>Nosema</i> sp	Provincia			Total
	Carchi	Imbabura	Pichincha	
Negativa	30	109	74	213
Positiva	7	17	41	65
TOTAL	37	126	115	278

En la Tabla 13 se refleja que la distribución de *Nosema* sp. por provincia presentó una diferencia significativa $p < 0,05$, observándose que en las colmenas de la provincia de Pichincha se presenta un mayor índice de prevalencia del patógeno, ya que, de un total de 65 colmenas positivas a la presencia de *Nosema* sp. 41 de ellas fueron muestreadas en Pichincha lo que representa el 63,08% del total de muestras

positivas, en tanto que en Imbabura se registraron 17 muestras positivas (26,15%) y en Carchi las restantes 7 (10,77%).

4.3.3 Distribución de *Nosema* sp. a nivel de apiario y cantón

Tabla 14
Distribución de apiarios infectados por provincia

Provincia	Cantón	Presencia de <i>Nosema</i>		Total
		Negativa	Positiva	
Carchi		2	2	4
	Mira	0	1	1
	Montufar	1	1	2
	Tulcán	1	0	1
Imbabura		6	7	13
	Antonio Ante	0	2	2
	Cotacachi	5	2	7
	Ibarra	1	3	4
Pichincha		5	8	13
	Cayambe	1	1	2
	Mejía	0	2	2
	Pedro Moncayo	0	1	1
	Quito	4	3	7
	Rumiñahui	0	1	1
TOTAL		13	17	30

Por otro lado, no se evidenció diferencia significativa ($p>0,05$), en la distribución de apiarios infectados tanto a nivel de provincia como de cantón, lo que quiere decir que la presencia de *Nosema* sp. está repartida parcialmente de forma uniforme en las tres provincias con un porcentaje del 56.67% (17/30), pero la gran diferencia se presenta en la distribución del patógeno dentro de los apiarios, es decir a nivel de colmena.

Tabla 15
Presencia de *Nosema* sp. a nivel de las colmena ubicadas en cada uno de los cantones de las provincias bajo estudio

Provincia	Cantón	Presencia de <i>Nosema</i>		Total
		Negativa	Positiva	
Carchi		30	7	37
	Mira	19	6	25
	Montufar	9	1	10
	Tulcán	2	0	2
Imbabura		109	17	126
	Antonio Ante	23	4	2
	Cotacachi	50	4	7
	Ibarra	36	9	4
Pichincha		74	41	115
	Cayambe	13	1	2
	Mejía	4	3	2
	Pedro Moncayo	0	12	1
	Quito	55	22	7
	Rumiñahui	2	3	1
TOTAL		213	65	278

Por otro lado observamos que, al analizar la distribución de colmenas positivas a Nosemosis por Cantón se evidenció una diferencia significativa con un valor de $p < 0,05$; constatándose que de las 65 colmenas positivas, el 33,85% de ellas (22/65) estuvieron localizadas en el Cantón Quito, mientras que un 18,46% (12/65) y 13,85% (9/65) se encontraban en los Cantones Pedro Moncayo y Ibarra, respectivamente.

Además, los Cantones que presentaron el mayor porcentaje de colmenas infestadas fueron Pedro Moncayo y Rumiñahui con el 100% (12/12) y 60% (3/5) respectivamente. Cabe mencionar que, esta situación podría presentarse debido al manejo inadecuado que le proporcionan a sus colmenas los apicultores pues en ambos casos, el muestreo se efectuó en un solo apiario por Cantón.

Es así que, (Araneda, Cumian, & Morales, 2015) y (Pacini, y otros, 2016), señalan que es de mucha importancia considerar que las colmenas se vuelven mucho más susceptible al ataque de enfermedades como *Nosema* sp, si las mismas se encuentran bajo situaciones de estrés como pesticidas, otros patógenos y mal nutrición, produciendo sinergias negativas que conducen a la reducción del tiempo de vida de las abejas, debido a que afectan al sistema inmunológico en general de las colonias y contribuyendo a la pérdida de muchas colonias.

4.3.4 Distribución de resultados generales en función del nivel de infestación de *Nosema* sp.

Tabla 16
Frecuencia de colmenas infectadas con *Nosema* sp. en función del nivel de infestación.

Nivel de infestación	Frecuencia	Porcentaje
1 (Bajo)	59	90.77%
2 (Medio)	5	7.69%
3 (Alto)	1	1.54%
Total	65	100.00%

De acuerdo a lo que se indica en la Tabla 16, es importante destacar que, de un total de 65 colmenas infectadas con *Nosema* sp. el 90,77% (59/65) de ellas, se encuentran dentro del nivel de infestación bajo (entre 0,1 a 5 millones de esporas/abeja).

Adicionalmente, se puede observar en la Tabla 16 la distribución del nivel de infestación en colmenas donde se puede destacar que existen 5 colmenas con nivel medio (nivel 2: 5 a 10 millones de esporas/abeja) de las cuales 4 pertenecen al apiario 25 propiedad del apicultor N° 1.

Este hecho se lo debe relacionar con lo mencionado por, (Ptaszy, Borsuk, & Zdybicka-barabas, 2016), quienes aseveran que los métodos de manejo de las colmenas al ser bien utilizados permiten controlar la infección causada por *Nosema* sp, además si se da el caso de encontrarse las colmenas dentro de explotaciones agropecuarias las buenas prácticas agrícolas y la conservación de buenas condiciones culturales permitirán mantener en buenas condiciones fisiológicas a los habitantes de las colmenas. Esto se puede evidenciar en el hecho de que las dos colmenas restantes

con niveles de infestación moderado (nivel 2) y alto (nivel 3: más de 10 millones de esporas/abeja) se localizan en la provincia del Carchi (Apiario N° 4) e Imbabura (Apiario N° 14), provincias con prevalencias de infección de *Nosema* sp. muy por debajo de la evidenciada en Pichincha.

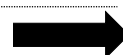
De esta manera, el análisis estadístico permitió determinar una diferencia significativa de la distribución de Nosemosis en las colmenas de los diferentes apiarios bajo estudio en base al nivel de infección con un nivel de confianza del 95%; $p < 0,05$.

4.3.5 Distribución de resultados positivos de *Nosema* en función del grado de infección a nivel apicultor, apiario y colmenas.

Tabla 17
Distribución de la presencia de *Nosema* por apicultor, por apiario y por colmena

Apicultor	Presencia de <i>Nosema</i>		Total
	Negativa	Positiva	
Apicultor 1			
Api 1	23	0	23
Api 2	3	7	10
Api 25	0	12	12
Api 29	11	4	15
Apicultor 2			
Api 3	5	0	5
Apicultor 3			
Api 4	6	6	12
Api 8	12	2	14
Api 9	12	2	14
Api 13	12	2	14
Apicultor 4			
Api 5	3	11	14
Api 6	6	1	7
Api 7	7	0	7
Api 10	5	0	5
Apicultor 5			
Api 11	11	2	13
Api 12	7	3	10
Apicultor 6			
Api 14	19	6	25
Apicultor 7			
Api 15	5	0	5
Apicultor 8			
Api 16	4	0	4
Apicultor 9			
Api 17	10	0	10
Apicultor 10			
Api 18	5	1	6
Api 19	7	0	7
Apicultor 11			
Api 20	5	0	5
Apicultor 12			
Api 21	12	0	12
Apicultor 13			
Api 22	2	0	2
Api 23	4	1	5

Continua



Apicultor 14			
Api 24	4	1	5
Apicultor 15			
Api 26	7	0	7
Api 27	2	3	5
Api 28	3	0	3
Apicultor 16			
Api 30	0	2	2
TOTAL	212	66	278

Api: Apiario

Al observar la tabla 17, se puede establecer que existe diferencia significativa $p < 0,05$, en cuanto a la presencia de *Nosema* sp. en las colmenas de acuerdo al apiario en el cual se encuentran, lo cual quiere decir que, el manejo de las colmenas por parte de los apicultores tiene algún grado de influencia en la presencia del patógeno. Por ejemplo, tenemos el caso del apicultor N° 3, el mismo que de los cuatro apiarios con los que cuenta todos están infectados con *Nosema* sp.. Además, hay que sumar el hecho de que dichos apiarios están localizados en la provincia de Pichincha, la cual se ha demostrado en el presente trabajo es una zona de alta infestación de *Nosema* sp.

En la tabla 18 se presenta la distribución de colmenas por apiario y por apicultor, positivas a la infección por *Nosema* sp. en función del nivel de infestación; donde, con un valor de $p < 0,05$, se puede apreciar que el 62,50% (10/16) de los apicultores tienen por lo menos uno de sus apiarios infestados por Nosemosis.

Tabla 18
Distribución de colmenas por apiario con presencia positiva de *Nosema* según el nivel de infección

Apicultor	Nivel de infestación				Total
	0 (Nulo)	1 (Bajo)	2 (Medio)	3 (Alto)	
Apicultor 1					
Api 2	3	7	0	0	10
Api 25	0	8	4	0	12
Api 29	11	4	0	0	15
Apicultor 3					
Api 4	6	5	0	1	12
Api 8	12	2	0	0	14
Api 9	12	2	0	0	14
Api 13	12	2	0	0	14
Apicultor 4					
Api 5	3	11	0	0	14
Api 6	6	1	0	0	7
Apicultor 5					
Api 11	11	2	0	0	13
Api 12	7	3	0	0	10
Apicultor 6					
Api 14	19	5	1	0	25
Apicultor 10					
Api 18	5	1	0	0	6
Apicultor 13					
Api 23	4	1	0	0	5
Apicultor 14					
Api 24	4	1	0	0	5
Apicultor 15					
Api 27	2	3	0	0	5
Apicultor 16					
Api 30	0	2	0	0	2
TOTAL	212	60	5	1	278

Api: Apiario

4.3.6 Resultados de la identificación y valoración de los factores de riesgo

4.3.6.1 Determinación de los factores de riesgo por apiario

Al momento de analizar los factores de riesgo que tienen algún nivel de influencia en la prevalencia de Nosemosis en los apiarios analizados se pudieron evidenciar algunos factores que por su variabilidad en su ausencia o presencia están relacionados de manera directa con la infestación del hongo; siendo los principales:

el manejo deficiente de las colmenas por parte de los apicultores, desconocimiento de la enfermedad, trashumancia de colmenas, captura de enjambres y falta de asesoramiento técnico.

4.3.6.1.1 Análisis del factor de riesgo para *Nosema* sp. por captura de enjambres

Tabla 19
Captura de enjambres en los apiarios como factor de riesgo en la presencia de *Nosema* sp.

Captura de enjambres	Presencia de <i>Nosema</i> sp.		Total
	No	Si	
No	4	8	12
Si	9	9	18
Total	14	17	30

Al momento de analizar la relación existente entre el hecho de que los apicultores capturen enjambres en sus apiarios y dentro de ellos por lo menos 1 colmena haya obtenido un resultado positiva a la presencia de *Nosema* sp. , se llegó a determinar que el mismo no es un factor de riesgo debido al valor obtenido de Odd Ratio= 0.5.

Ya que, como se puede observar en la tabla 19 no hay una clara tendencia de la presencia de Nosemosis en relación a la captura de enjambres, debido a que en apiarios que no capturan enjambres se encontró un mayor número de ello positivos a la presencia del patógeno, mientras que, aquellos que capturan enjambres es igual la proporción de apiarios positivos y negativos a la presencia de *Nosema* sp.

4.3.6.1.2 Análisis del factor de riesgo presencia de *Nosema* spp. en relación a la asistencia técnica

Se llegó a determinar que el tipo de asesoramiento técnico que reciben los apicultores no es un factor de riesgo, esto se determinó mediante la prueba de chi-cuadrado llegándose a concluir que no existe diferencia significativa $p > 0,05$ entre la presencia del patógeno en los apiarios que reciben como los que no reciben asesoría técnica, por ello hay que mencionar que los apiarios que reciben asistencia técnica

tienen la misma posibilidad de que sus colmenas sean infectadas con Nosemosis que aquellos que no la reciben.

4.3.6.1.3 Análisis del factor de riesgo presencia de *Nosema* sp. en relación a la trashumancia de colmenas

Se determinó que la acción de trashumancia que realizan los apicultores con sus colmenas se constituye en un factor de riesgo, ya que con un valor de OR= 2.25, significa que los apiarios que son objeto de trashumancia por parte de los apicultores tienen 2.25 veces más de padecer Nosemosis.

Este hecho se ratifica con lo aseverado por (Banaszak, y otros, 2013), quienes indican que la movilización e introducción de especies de insectos como *Apis mellifera*, en varios ecosistemas con el objetivo de actuar como agentes polinizadores o producir miel, pueden incrementar el riesgo de infectar colonias de insectos nativos con múltiples patógenos, y de igual manera las especies de insectos domésticas nativas también pueden actuar como vectores de dispersión de parásitos y enfermedades asociadas e inclusive transferirlas a otros congéneres (por ejemplo *Varroa* en *Apis*, *Nosema* sp. en *Bombus* y el hongo *Ascospaera apis* en *Megachiles*).

Según (FAO, 2006), las abejas originarias de alguna zona geográfica específica del planeta están generalmente mucho mejor adaptadas al clima, cambios en su alimentación, la presencia de patógenos y otros factores que podrían poner en riesgo el desarrollo normal de su ciclo vital. Por ello la importación de especies y razas de abejas foráneas se convierte en un aspecto innecesario, esta conclusión se deriva del hecho de que la introducción de colonias de abejas a nuevas áreas geográficas ha tenido efectos desastrosos en la proliferación y rápida dispersión de enfermedades y parásitos.

Por lo cual, la trashumancia en el caso de los apiarios bajo estudio se convierte en un grave problema sanitario para el sector apícola de la zona bajo análisis y otros lugares cercanos al mismo, puesto que en el trabajo investigativo se llegó a determinar que el 88.33% (25/30) apiarios son movilizados durante algún momento del año, siendo sus destinos principales provincias no solo de la sierra

ecuatoriana sino también de costas como: Cotopaxi e Imbabura (9/25), Pichincha (9/25), Manabí (3/25), Guayas y Los Ríos (1/25).

Por ello, como lo señala (AGROCALIDAD, 2016), es prioritaria la necesidad de desarrollar un estudio a nivel nacional que permita realizar una posible zonificación del territorio en función de la presencia de enfermedades de las abejas como la Nosemosis y con ello además establecer los niveles de infestación en colmenas. Además indica que, existen limitantes para el control de enfermedades y dentro de ellas la falta de reportes o notificaciones científicas de las mismas a nivel nacional. Este aspecto se corrobora con la casi nula información sobre Nosemosis que existe a nivel nacional a excepción de la tesis generada por (Vivas, 2015), es por ello que, se hace indispensable generar mayor cantidad de información y reportes científicos que aborden temas que permitan esclarecer el panorama sanitario apícola del Ecuador como una de las primeras fuentes de desarrollo del sector a nivel nacional y porque no regional.

Finalmente, como un aspecto complementario de los análisis estadísticos del manejo de las colmenas por parte de los apicultores, cabe mencionar que de los 30 apiarios analizados en la zona de estudio perteneciente a 16 apicultores los cuales refirieron en el 62.50% no utilizar registros técnicos o económicos para el manejo de sus apiarios y colmenas; lo cual reafirma el hecho de la falta de un correcto procedimiento de manejo de sus apiarios y por otro lado tenemos que 68.75% de ellos pertenecen a una asociación de apicultores así 5 en la asociación de Pichincha, 1 en Carchi y 5 en Cotacachi, siendo ellos los pocos apicultores que tienen un mayor acceso a capacitaciones técnicas y seguimiento sanitario de sus colmenas, lo que refleja que aún se debe trabajar arduamente en el área apícola del país para permitir su desarrollo .

4.4 Resultados de los métodos diagnósticos.

4.4.1 Microscopía óptica

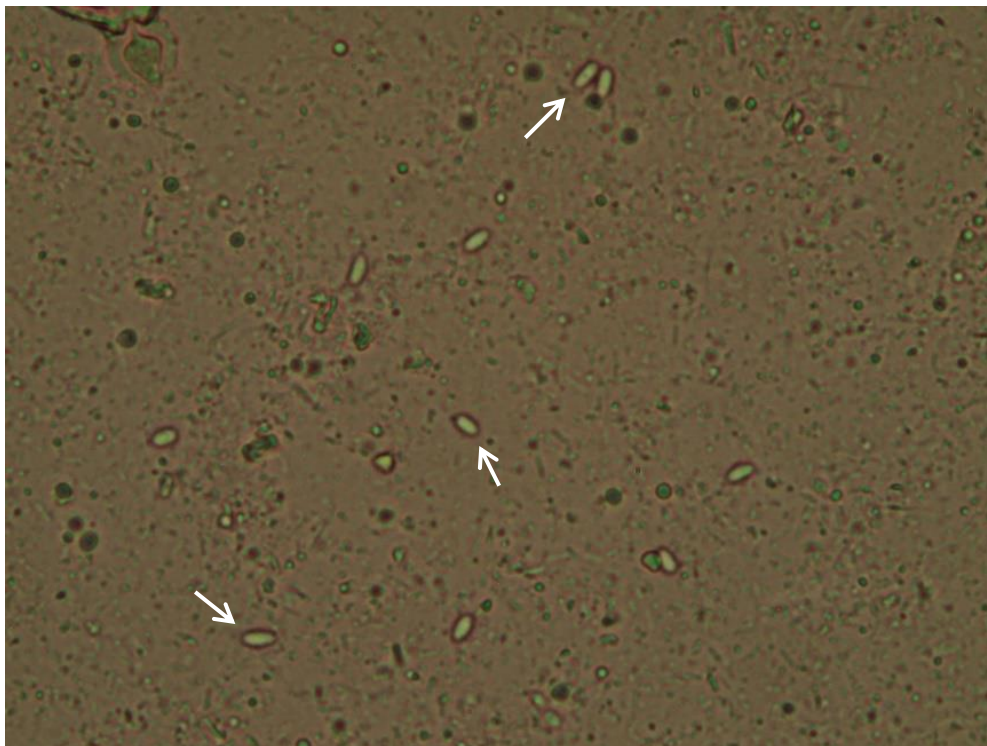


Figura 10 Esporas de *Nosema* sp. bajo microscopía óptica con poco paso de luz, aumento de 40x.

En las Figuras 10 y 11; se pueden observar las esporas de *Nosema* sp. con su forma oval característica. Debido a su poder de refringencia se debe graduar el paso de luz con el diafragma del microscopio óptico para mejorar la resolución de las esporas y con ello asegurar el diagnóstico inicial de la presencia del patógeno en las abejas analizadas.



Figura 11 Esporas de *Nosema* sp. bajo microscopía óptica con poco paso de luz, aumento de 40x.

4.4.2 Tinciones

4.4.2.1 Giemsa

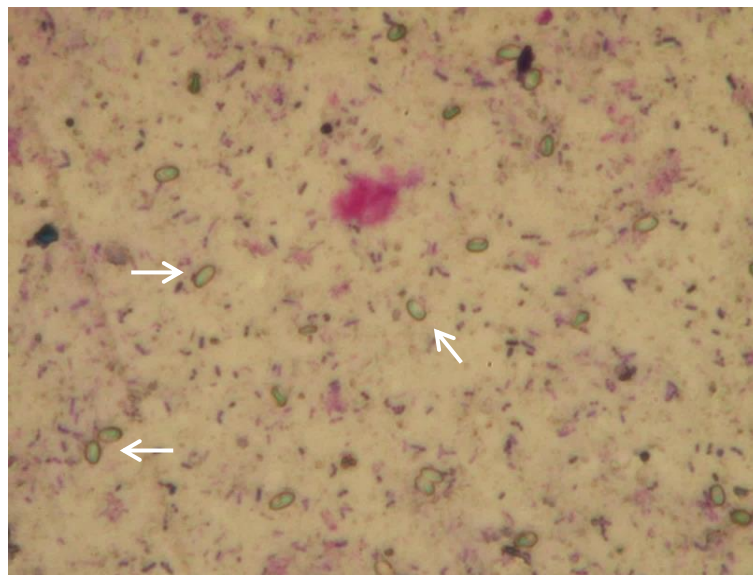


Figura 12 Esporas de *Nosema* sp. teñidas con el colorante Giemsa, bajo microscopía óptica con poco paso de luz, aumento de 40x.

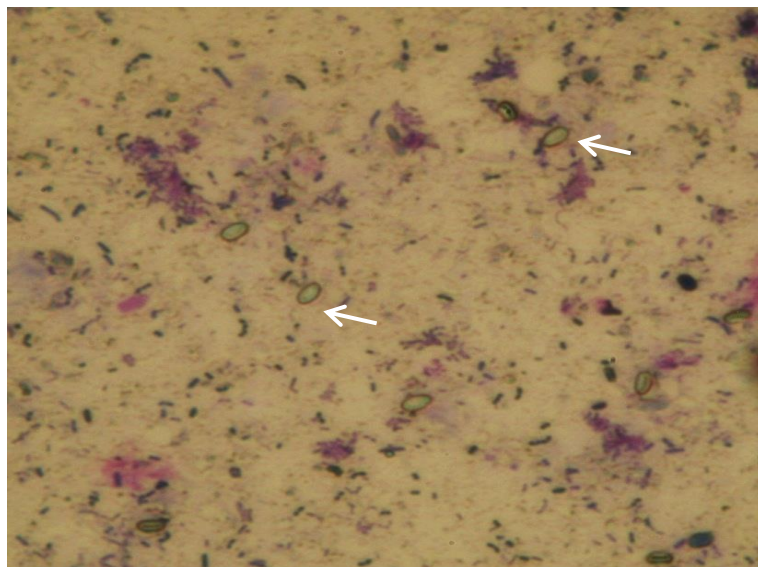


Figura 13 Esporas de *Nosema* sp. teñidas con el colorante Giemsa, bajo microscopía óptica con mayor paso de luz, aumento de 40x.

En las Figuras 11 y 12 se pueden observar las esporas de *Nosema* sp. teñidas con el colorante Giemsa, cuya característica principal es la coloración únicamente de la pared celular de la microsporidia. Este procedimiento permite confirmar el diagnóstico inicial con microscopía óptica ya que, a más de observar su forma característica se asegura de la tinción que se diferencia de la tinción de otro tipo de células o partículas, puesto que estas últimas se tiñen todas sus estructuras.

4.4.2.2 Inmunofluorescencia Indirecta

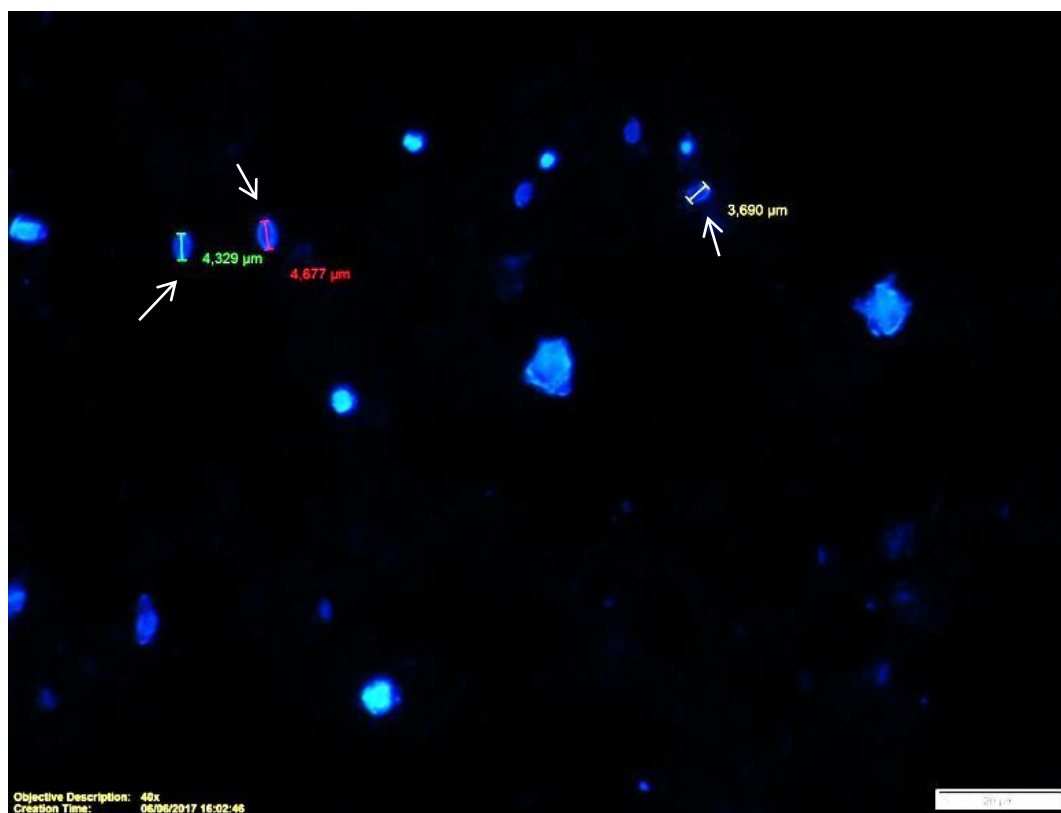


Figura 14 Esporas de *Nosema* sp. marcadas con el colorante Hoesch (tinte de ADN), bajo microscopio de fluorescencia, aumento de 40x.

En cuanto al análisis con la técnica de fluorescencia indirecta en la Figura 14, se puede observar las esporas de *Nosema* sp. teñidas con el colorante Hoesch el cual tiene la capacidad de marcar el ADN de las células que se encuentren en la muestra analizada, se pueden distinguir claramente las formas ovales de las esporas y adicionalmente se pudo tomar las medidas aproximadas de ellas las mismas que se encontraban en alrededor de 4μm y 6μm lo que nos indica que morfológicamente se tratan de las estructuras que estamos buscando.

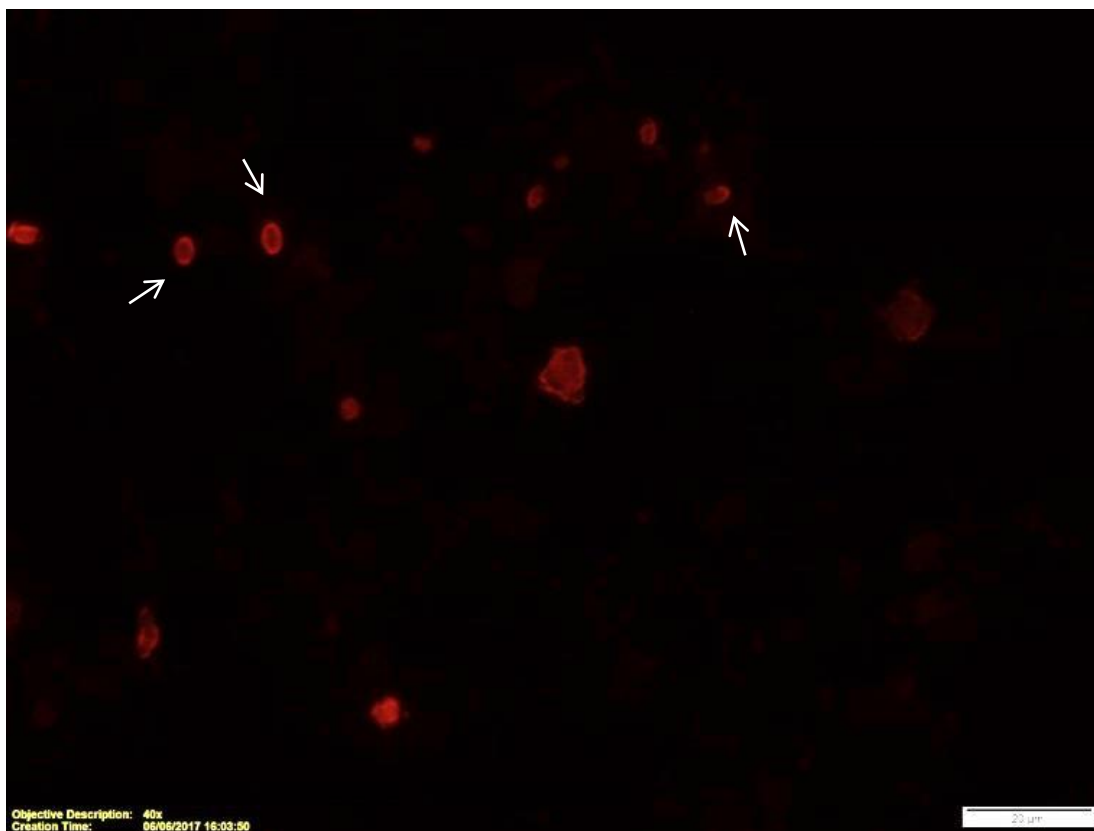


Figura 15 Esporas de *Nosema* sp. marcadas con el colorante FB28 (tinte de quitina), bajo microscopio de fluorescencia, aumento de 40x.

Finalmente en la Figura 15, se puede distinguir las mismas esporas de la Figura 14, pero la coloración roja de las esporas nos indica resultado positivo al marcaje con el colorante FB28 o calcofluor el cual es un tinte específico de quitina; polisacárido componente de la pared celular de los hongos. Esta tinción específica nos permite confirmar de forma definitiva que se tratan de las microsporidias de *Nosema* sp. las mismas que se encuentran parasitando al 23.74% de colmenas analizadas en el presente estudio.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Al momento de comparar la efectividad de los métodos diagnósticos utilizados en el presente trabajo para determinar la presencia de *Nosema* sp. en las colmenas ubicadas dentro del área de estudio, se puede mencionar que, una vez afinados los protocolos y la metodología a seguir en cada una de las técnicas diagnósticas, todas tienen su grado de efectividad. Aunque, sin duda se puede colocar en primer lugar a la microscopia de Inmunofluorescencia Indirecta, ya que al utilizar el colorante fluorescente FB28, este tiene la capacidad de teñir específicamente la quitina que poseen las paredes de las microsporidias de *Nosema* sp. brindándonos así la posibilidad de recocer con mayor certeza las características morfológicas que presenta el patógeno en estudio.
- El presente trabajo investigativo permitió reportar la prevalencia de Nosemosis en la región Andina norte del Ecuador a nivel de cuatro estratos: provincia 100%, cantón 90.91%, apiario 56.67% y colmena 23.38%; denotándose un índice de infestación máximo del 23.74%, el mismo que corresponden a un nivel moderado de parasitación con la necesidad de mantener un monitoreo constante para evitar posibles incrementos del porcentaje máximo de infestación.
- La georreferenciación de los apiarios analizados permitió establecer una base de datos general de las características y condiciones en las que se encuentran dichos apiarios así como también establecer los contactos de los apicultores para con esta información poder generar una serie de estudios complementarios que

permitan mejorar la calidad de vida de las abejas y de así también de los apicultores que dependen de ellas.

- Por otro lado, al analizar los puntos de georreferenciación de los apiarios y generar mapas satelitales de la ubicación de cada uno de ellos se logró identificar dos zonas de alta concentración de apiarios la primera en la provincia de Imbabura en el cantón Cotacachi (12/30) y la segunda en la provincia de Pichincha (7/30) específicamente en el sector del Valle de Los Chillos, lo que los convierte en zonas de alto riesgo de transmisión de enfermedades por el desplazamiento que realizan las abejas en busca de alimento.
- La captura de enjambres no se constituyó en un factor de riesgo de transmisión de Nosemosis en las apiarios y colmenas estudiadas, esto podría derivarse del hecho de que las especies de *A. mellifera* nativas por su nivel de adaptación tienen un mayor grado de tolerancia y resistencia a la presencia de ciertos parásitos y patógenos provenientes de ecosistemas diferentes.
- La trashumancia que realizan los apicultores con sus colmenas no únicamente entre provincias de la región sierra sino también de la costa, corresponde a un factor de riesgo de adquirir y aún más preocupante de transmitir, al observarse 2.25 veces más de infestaciones en apiarios que realizan trashumancia, lo cual podría elevar la dispersión del patógeno y complicar así el estado sanitario de las abejas a nivel nacional.
- La falta de asesoramiento técnico específicamente en el tema de Nosemosis no puede ser considerado como un factor de riesgo que incremente o disminuya la posibilidad de la presencia de la enfermedad en las colmenas estudiadas. Aunque, cabe destacar que la falta de estudios en el país referentes al tema no

permiten generar experiencias que permitan brindar una guía técnica a los apicultores para reducir la prevalencia de esta y otras enfermedades en sus apiarios.

- En términos generales la información sanitaria compartida por los apicultores al momento de aplicar las encuestas epidemiológicas, permitió evaluar el manejo que los mismos les brindan a sus colmenas llegándose a inferir que, en su gran mayoría las prácticas de manejo que se practican no son muy adecuadas para mantener sus colmenas en un buen estado en aspectos nutricionales, sanitarios y reproductivos.
- Para prevenir una mayor presencia de *Nosema* sp. y reducir en cierto grado la ya existente en la zona de estudio, es importante generar planes integrados de manejo de las colmenas, los cuales estén orientados a mejorar aspectos como la nutrición, higiene, bioseguridad, control de plagas y otros agentes extraños a la actividad, trashumancia, uso de productos químicos de uso veterinario, cosecha y poscosecha de miel y otros derivados de la colmena, el mismo que luego de haber sido desarrollado deberá ser difundido con el mayor número de apicultores posibles de manera que se pueda homogeneizar el manejo general de las colmenas de ser posible a nivel nacional, un modelo de plan lo podemos encontrar en forma ampliada en el ANEXO N°4.

5.2 Recomendaciones

- Se debe mejorar el manejo que se da a las colmenas, procurando siempre tomar en cuenta aspectos como la ubicación, condiciones ambientales y asepsia de los materiales que se utilizan en el trabajo habitual con la colmenas, esto evitará que las abejas desarrollen con normalidad sus actividades y no pasen largos periodos de tiempo en el interior de las colmenas ocasionando gran acumulación de heces las cuales podrían convertirse en potenciales fuentes de inóculo de las microsporidias al utilizar estos mismos materiales para trabajar con otras colmenas.
- Es importante cuidar el aspecto nutricional de las abejas para con ello mantenerlas fisiológica e inmunológicamente listas para enfrentar posibles brotes de enfermedades, por lo que es recomendable utilizar por lo menos una vez cada tres meses promotores alimenticios en base de vitaminas y aminoácidos los mismos que mantendrán los niveles necesarios de los mismos en el organismo de las abejas.
- Es necesario extender el muestreo de los apiarios a nivel nacional, ya que factores como la trashumancia pueden extender la frontera de expansión de parásitos y patógenos que afectan a las abejas, de esta manera se podría establecer prevalencias e índices de infestación que permitan generar planes de manejo sanitario acorde a las necesidades que se presenten en el sector apícola del país.
- Es fundamental el promover la investigación de temas como el propuesto en este trabajo, ya que no se dispone de la información necesaria para establecer y desarrollar campañas de capacitación que permitan conocer a los apicultores las implicaciones que conllevan el manejar inadecuadamente sus colmenas, ya que

no únicamente derivan en disminución del índice de producción de miel y otros productos derivados de las colmenas, sino que además se convierten en un grave problema de desequilibrio ambiental de los ecosistemas con los que contamos en el Ecuador.

5.3 Bibliografía

- AGROCALIDAD. (2016). *Resolucion 0241*. Recuperado el 21 de marzo de 2017, de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2016/07/resolucion-241.pdf>
- Araneda, X., Cumian, M., & Morales, D. (2015). *Distribution , epidemiological characteristics and control methods of the pathogen Nosema ceranae Fries in honey bees Apis mellifera L . (Hymenoptera , Apidae)* *Distribución , características epidemiológicas y métodos de control del patógeno Nosema ceran.* Recuperado el 19 de agosto de 2017, de <http://www.scielo.cl/pdf/amv/v47n2/art02.pdf>
- Aránzazu, M., Picher, M., Amaia, E., Bernal, J. L., Bernal, J., García-Chao, M., . . . Martín-Hernández, R. (2017). *Risk factors associated with honey bee colony loss in apiaries in Galicia, NW Spain*. Recuperado el 23 de julio de 2017, de <https://doi.org/10.5424/sjar/2017151-9652>
- Arizmendi, M. (2009). *La crisis de los polinizadores. CONABIO. Biodiversitas*. Recuperado el 25 de junio de 2017, de <http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv85art1.pdf>
- Bailey, L. (1953). *The Transmission of Nosema Disease*. Recuperado el 18 de julio de 2017, de <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0005772X.1953.11094815>
- Banaszak, J., Bogusch, P., Bosch, J., Castro, L., Comba, M., Dathe, H., . . . Haeseler, V. (2013). *Polinizadores y biodiversidad*. Recuperado el 18 de junio de 2017, de http://apolo.entomologica.es/cont/materiales/informe_tecnico.pdf
- Becerril, S. (2006). *El legado de las abejas*. Recuperado el 25 de junio de 2017, de http://www.pronat.com.mx/imagenes/libros_pdf/El_legado_de_las_abejas.pdf
- Bekele, A. Z., Mor, S. K., Phelps, N. B., Goyal, S. M., & Armién, A. G. (2015). *A case report of Nosema ceranae infection in honey bees in Minnesota, USA*. Recuperado el 17 de febrero de 2017, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25555200>
- Botías, C., Raquel, H., Barrios, L., Meana, A., & Higes, M. (2013). *Nosema spp . infection and its negative effects on honey bees (Apis mellifera iberiensis) at the colony level* *Nosema spp . infection and its negative effects on honey bees (Apis mellifera iberiensis) at the colony level*. Recuperado el 18 de febrero de 2017, de

<https://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/1297-9716-44-25>

- Bradbear, N. (2005). *La apicultura y los medios de vida sostenibles*. Recuperado el 18 de junio de 2017, de <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/008/y5110s/y5110s00.pdf>
- Bravo, J., Carbonell, V., Valdebenito, C., Figueroa, C., Valdovinos, C., Hernández, R., . . . Delporte, C. (2014). *Identification of Nosema ceranae in the Valparaíso District , Chile*. Recuperado el 18 de febrero de 2017, de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2014000300021
- Cabrera, J. (2012). *La apicultura en el Ecuador: Antecedentes históricos*. Recuperado el 20 de febrero de 2017, de <https://se148c6884df32392.jimcontent.com/.../Apiterapia%20en%20Ecuador.pdf>
- Charbonneau, L., Hillier, N., Rogers, R., Williams, G., & Shutler, D. (2016). *Effects of Nosema apis N ceranae and coinfections on honey bee Apis mellifera learning and memory*. Recuperado el 18 de febrero de 2017, de <http://dx.doi.org/10.1038/srep22626>
- Chen, Y. P., & Huang, Z. Y. (2010). *Nosema ceranae, a newly identified pathogen of Apis mellifera in the USA and Asia*. Recuperado el 18 de febrero de 2017, de <https://link.springer.com/article/10.1051/apido/2010021>
- Chen, Y. P., & Huang, Z. Y. (2010). *Nosema ceranae, a newly identified pathogen of Apis mellifera in the USA and Asia**. Recuperado el 18 de febrero de 2017, de <https://link.springer.com/article/10.1051/apido/2010021>
- Coffey, M. (2007). *Parasites of the Honeybee*. Recuperado el 09 de julio de 2017, de [https://www.agriculture.gov.ie/media/migration/publications/2008/Honeybee Publication.pdf](https://www.agriculture.gov.ie/media/migration/publications/2008/Honeybee%20Publication.pdf)
- Copley, T., & Jabaji, S. (2011). *Honeybee glands as possible infection reservoirs of Nosema ceranae and Nosema apis in naturally infected forager bees*. Recuperado el 25 de julio de 2017, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22053729>
- De la Sota, M., & Bacci, M. (2005). *Enfermedades de las abejas. Manual de procedimientos*. Recuperado el 14 de marzo de 2017, de http://www.senasa.gov.ar/sites/default/files/ARBOL_SENESA/ANIMAL/ABEJAS/PROD_PRIMARIA/SANID_APICOLA/EES/INFLUENZA/manual_de_enfermedades_de_las_abejas_2005.pdf

- de Ruiter, A. (2013). *Nosemosis de las abejas melíferas*. Recuperado el 14 de marzo de 2017, de http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.02.04_NOSEMOSIS_FINAL.pdf
- Demedio, J. (2010). *Guía Técnica de Sanidad Apícola*. Recuperado el 14 de marzo de 2017, de <http://teca.fao.org/sites/default/files/resources/sanidadapicola.pdf>
- Duttmann, C., Demedio, L., & Verde, M. (2013). *La Apicultura y Factores que Influyen en Producción, Calidad, Inocuidad y Comercio de la Miel*. Recuperado el 18 de febrero de 2017, de <http://www.inta.gob.ni/biblioteca/images/pdf/guias/guia%20de%20apicultura.pdf>
- Ellis, J. D., & Munn, P. A. (2015). *The worldwide health status of honey bees*. Recuperado el 25 de julio de 2017, de <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0005772X.2005.11417323>
- FAO. (2006). *Honey bee diseases and pests: a practical guide*. Recuperado el 09 de julio de 2017, de <http://www.fao.org/3/a-a0849e.pdf>
- FAO. (2016). *Línea Base del Servicio Ecosistémico de la Polinización en Chile*. Recuperado el 18 de junio de 2017, de www.fao.org/chile
- Forsgren, E., & Fries, I. (2010). *Veterinary Parasitology Comparative virulence of Nosema ceranae and Nosema apis in individual European honey bees*. Recuperado el 15 de julio de 2017, de <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.010>
- Franzen, C. (2008). *Microsporidia: A Review of 150 Years of Research*. Recuperado el 22 de febrero de 2017, de <https://benthamopen.com/ABSTRACT/TOPARAJ-2-1>
- Fries, I. (2010). *Nosema ceranae in European honey bees (Apis mellifera)*. Recuperado el 20 de febrero de 2017, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19909977>
- Fries, I., Chauzat, M.-P., Chen, Y.-P. P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., . . . Geoffrey R. (2013). *Standard methods for nosema research*. Recuperado el 16 de febrero de 2017, de [papers2://publication/doi/10.3896/IBRA.1.52.1.14%5Cnhttp://www.ibra.org.uk/articles/The-COLOSS-BEEBOOK-nosema](http://www.ibra.org.uk/articles/The-COLOSS-BEEBOOK-nosema)
- Garcia, L. S. (2002). *MINIREVIEW Laboratory Identification of the Microsporidia*. Recuperado el 25 de julio de 2017, de

<http://jcm.asm.org/content/40/6/1892.figures-only?cited-by=yes&legid=jcm;40/6/1892>

- Genersch, E. (2010). *Honey bee pathology: Current threats to honey bees and beekeeping*. Recuperado el 20 de febrero de 2017, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20401479>
- 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 ?* Recuperado el 22 de febrero de 2017, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20228103>
- Gisder, S., Möckel, N., Linde, A., & Genersch, E. (2011). *A cell culture model for Nosema ceranae and Nosema apis allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia*. Recuperado el 30 de julio de 2017, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20880328>
- Gool, T. V., & Dankert, J. (1985). *Human microsporidiosis : Clinical , diagnostic and therapeutic aspects of an increasing infection*. Recuperado el 29 de julio de 2017, de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14651223>
- Hilmi, M., Mejia, D., & Bradbear, N. (2011). Recuperado el 16 de marzo de 2017, de <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/i0842e/i0842e04.pdf>
- Hornitzky, M. (2008). *Nosema Disease Literature review and three year survey of beekeepers*. Recuperado el 14 de marzo de 2017, de <http://www.rirdc.gov.au>
- Human, H., Brodschneider, R., Dietemann, V., Dively, G., Ellis, J. D., Forsgren, E., . . . Pirk, C. (2013). *Miscellaneous standard methods for Apis mellifera research*. Recuperado el 18 de febrero de 2017, de <http://www.ibra.org.uk/articles/Miscellaneous-standard-methods-for-Apis-mellifera-research>
- INAMHI. (2014,2015). *Análisis de las condiciones climáticas registradas en el Ecuador continental en el año 2013 y su impacto en el sector agrícola*. Recuperado el 02 de agosto de 2017, de <http://www.serviciometeorologico.gob.ec/analisis-de-las-condiciones-climaticas-registradas-en-el-ecuador-continental-en-el-ano-2013-y-su-impacto-en-el-sector-agricola/>
- Ivernizzi, C., Abud, C., Tomasco, I., Harriet, J., Ramallo, G., Katz, H., . . . Mendoza, Y. (2017). *Presence of Nosema ceranae in honeybees (Apis mellifera) in Uruguay*. Recuperado el 29 de julio de 2017, de <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.03.006>

- Keeling, P. (2009). *Five questions about microsporidia*. Recuperado el 22 de febrero de 2017, de <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000489>
- Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Ruz, M., . . . Paxton, R. J. (2011). *Widespread dispersal of the microsporidian Nosema ceranae , an emergent pathogen of the western honey bee , Apis mellifera*. Recuperado el 20 de julio de 2017, de https://www.researchgate.net/publication/51392317_Widespread_dispersal_of_the_microsporidian_Nosema_ceranae_an_emergent_pathogen_of_the_western_honey_bee_Apis_mellifera
- Krieger, K. (2015). *Bee now 2015*. Recuperado el 16 de marzo de 2017, de <http://www.beenow.bayer.com>
- MAAREC. (2005). *BEE DISEASES & THEIR CONTROL*. Recuperado el 09 de julio de 2017, de <http://maarec.cas.psu.edu>
- Manzoor, M., Mathivanan, V., & Shah, G. (2013). *Nosemosis and Its Effect on Performance of Honey Bees-a Review*. Recuperado el 22 de febrero de 2017, de https://ijpbs.net/cms/php/upload/2205_pdf.pdf
- Martin, R., Aránzazu, M., Prieto, L., Martínez, A., Garrido, E., & Higes, M. (2007). *Outcome of Colonization of Apis mellifera by Nosema ceranae* □. Recuperado el 20 de julio de 2017, de <http://aem.asm.org/content/73/20/6331>
- Martín, R., Higes, M., Sagastume, S., Juarranz, A., Almeida, J., Budge, G., . . . Boonham, N. (2017). *Microsporidia infection impacts the host cell ' s cycle and reduces host cell apoptosis*. Recuperado el 22 de febrero de 2017, de <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0170183>
- Mateu, E., & Casal, J. (2003). *Tamaño de la Muestra*. Recuperado el 20 de marzo de 2017, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000118&pid=S0120-4823201300010000800007&lng=es
- Merletti, F., Solkolne, C., & Vineis, P. (2011). *Epidemiologia y Estadística*. Recuperado el 21 de marzo de 2017, de http://ddd.uab.cat/record/72764/%5Cnhttp://www.atmosfera.unam.mx/editorial/rica/acervo/vol_19_2/2.pdf
- Michalczyk, M., & Sokół, R. (2014). *Nosemosis in honey bees*. Recuperado el 18 de julio de 2017, de http://www.uwm.edu.pl/polish-journal/sites/default/files/issues/articles/michalczyk_and_sokol_2014.pdf

- Molineri, A., & Schnittger, L. (2017). *Distribution and prevalence of Nosema apis and N. ceranae in temperate and subtropical eco-regions of Argentina*. Recuperado el 14 de agosto de 2017, de <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2016.11.002>
- Nabian, S., Ahmadi, K., Shirazi, N., & Gerami, A. (2011). *First Detection of Nosema ceranae, a Microsporidian Protozoa of European Honeybees (Apis mellifera) In Iran*. Recuperado el 18 de febrero de 2017, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3279895/>
- NBU. (2015). *The National Bee Unit*. Recuperado el 20 de julio de 2017, de Common Pests , Diseases and Disorders of the Adult Honey Bee: www.gov.uk/apha
- OIE. (2008). *Nosemosis of honey bees*. Recuperado el 22 de febrero de 2017, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3640932/>
- OIE. (2017). *TEXTO GENERAL DE INTRODUCCIÓN CON INFORMACIÓN DE FONDO PARA LOS CAPÍTULOS DEL CÓDIGO SANITARIO PARA LOS ANIMALES TERRESTRES SOBRE LAS ENFERMEDADES DE LAS ABEJAS*. Recuperado el 17 de marzo de 2017, de <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/informaciones-especificas-y-recomendaciones/enfermedades-de-los-abejas/>
- OIRSA. (2012). *PATOLOGÍA DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES Y PLAGAS DE LAS ABEJAS MEFÍFERAS*. Recuperado el 18 de junio de 2017, de <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Manuales%20apco las/Attachments/5/manpato.pdf>
- Pacini, A., Giacobino, A., Molineri, A., Cagnolo, N. B., Aignasse, A., Zago, L., . . . Giacobino, A. (2016). *Risk factors associated with the abundance of Nosema spp . in apiaries located in temperate and subtropical conditions after honey harvest*. Recuperado el 19 de agosto de 2017, de <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2016.1245396>
- Pita, S., Vila, M., & Carpena, J. (1997). *Investigación: Determinación de factores de riesgo* . Recuperado el 20 de marzo de 2017, de http://www.fisterra.com/mbe/investiga/3f_de_riesgo/3f_de_riesgo2.pdf
- Porrini, M., Porrini, L., Garrido, M., De Melo, C., Porrini, D., Muller, F., . . . Eguaras, M. (2017). *Nosema ceranae in South American Native Stingless Bees and Social Wasp*. Recuperado el 29 de julio de 2017, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28389730>

- Ptaszy, A., Borsuk, G., & Zdybicka-barabas, A. (2016). *Are commercial probiotics and prebiotics effective in the treatment and prevention of honeybee noseiosis* C ? Recuperado el 19 de agosto de 2017, de <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-015-4761-z>
- Ptaszyńska, A. A., Borsuk, G., Mułenko, W., & Demetraki-paleolog, J. (2014). *Differentiation of Nosema apis and Nosema ceranae spores under Scanning Electron Microscopy (SEM) Diferenciación de esporas de Nosema apis y Nosema ceranae bajo microscopio electrónico de barrido (MEB)*. Recuperado el 13 de septiembre de 2017, de <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3896/IBRA.1.53.5.02>
- Ritter, W. (2014). *Las enfermedades de las abejas constituyen un problema de ámbito mundial*. Recuperado el 18 de junio de 2017, de http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Publications_%26_Documentation/docs/pdf/bulletin/Bull_2014-2-ESP.pdf
- Rogg, H. W. (2000). *MANUAL DE ENTOMOLOGÍA AGRÍCOLA DE ECUADOR*. Recuperado el 26 de junio de 2017, de <https://catalog.hathitrust.org/Record/101255440>
- Schmidt, J. O. (1997). *Bee Products: Properties, Applications, and Apitherapy*. Recuperado el 16 de marzo de 2017, de http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4757-9371-0_2
- Shimanuki, H., & Knox, D. (2000). *Diagnosis of Honey Bee Diseases*. Recuperado el 23 de julio de 2017, de <https://www.ars.usda.gov/is/np/honeybeediseases/honeybeediseases.pdf>
- Snow, J. W. (2016). *A fluorescent method for visualization of Nosema infection in whole-mount honey bee tissues*. Recuperado el 30 de julio de 2017, de <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2016.01.007>
- Suzuki, T., Matsuzaki, T., Hagiwara, H., & Aoki, T. (2007). *Technical Advancement Recent Advances in Fluorescent Labeling Techniques for Fluorescence Microscopy*. Recuperado el 13 de septiembre de 2017, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18224244>
- Topolska, G., & Hartwig, A. (2005). *DIAGNOSIS OF Nosema apis INFECTION BY INVESTIGATIONS OF TWO KINDS OF SAMPLES : DEAD BEES AND LIVE BEES*. Recuperado el 25 de julio de 2017, de <http://www.jas.org.pl/pdf/86.pdf>
- Vargas, J., Santiana, I., & Rosero, H. (2015). *Memorias-I Congreso de Apicultura y Meliponicultura en Ecuador*. Recuperado el 21 de junio de 2017, de

http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/40285/1/memorias_resumenes_2015.pdf

Vivas, J. (2015). *PREVALENCIA DE NOSEMA (Nosema spp .) EN COLMENARES DE LA REGIÓN NORTE Y CENTRO NORTE DEL ECUADOR*. Recuperado el 29 de julio de 2017, de <http://www.dspace.uce.edu.ec:8080/bitstream/25000/7811/1/T-UCE-0004-62.pdf>

Williams, G. R., Shutler, D., Burgher-maclellan, K. L., & Rogers, R. E. (2014). *Infra-Population and -Community Dynamics of the Parasites Nosema apis and Nosema ceranae , and Consequences for Honey Bee (Apis mellifera) Hosts*. Recuperado el 20 de julio de 2017, de <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0099465>

Yücel, B., & Dogaroglu, M. (2005). *The Impact of Nosema apis Z. Infestation of Honey Bee(Apis mellifera L.) Colonies after Using Different Treatment Methods and their Effects on the Population Levels of Workers and Honey Production on Consecutive Years*. Recuperado el 12 de agosto de 2017, de <http://www.pjbs.org>