



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

“Optimización de un protocolo de PCR múltiple y convencional para el diagnóstico y caracterización molecular de *Nosema apis* y *Nosema ceranae* en apiarios de las provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha – Ecuador”

Elaborado por
Sandoval Morejón, Elizabeth Dayana

Director
Dr. Ron-Román, Jorge, Ph.D.



CONTENIDO

Introducción

Objetivos

Materiales y métodos

Hipótesis

Resultados y discusión

Conclusiones

Recomendaciones

Agradecimientos





Apis mellifera: abeja de miel europea de importancia económica y para ecosistemas

Enfermedad que afecta abejas de miel

- Virus
- Bacterias
- Hongos
- Ácaros

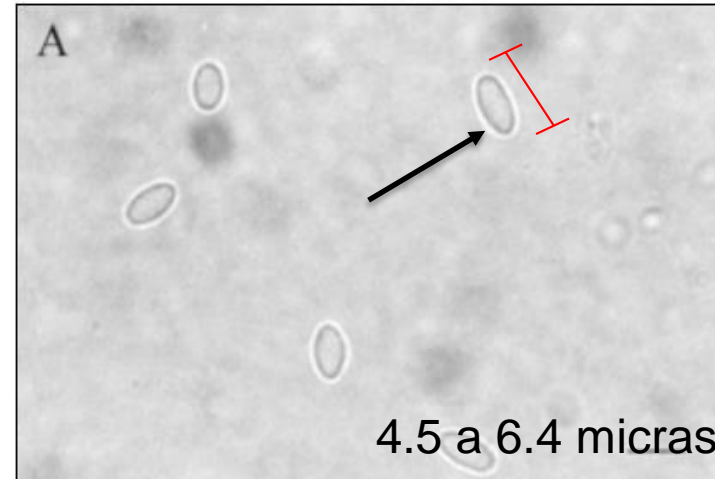
Nosemosis

Microsporidios

Distribución mundial

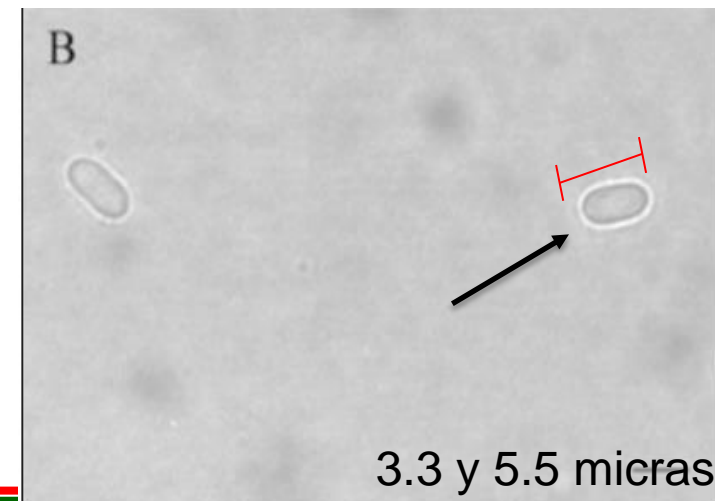
Diferencia en tamaño de 1 μm

Nosema apis



Zander (1909)

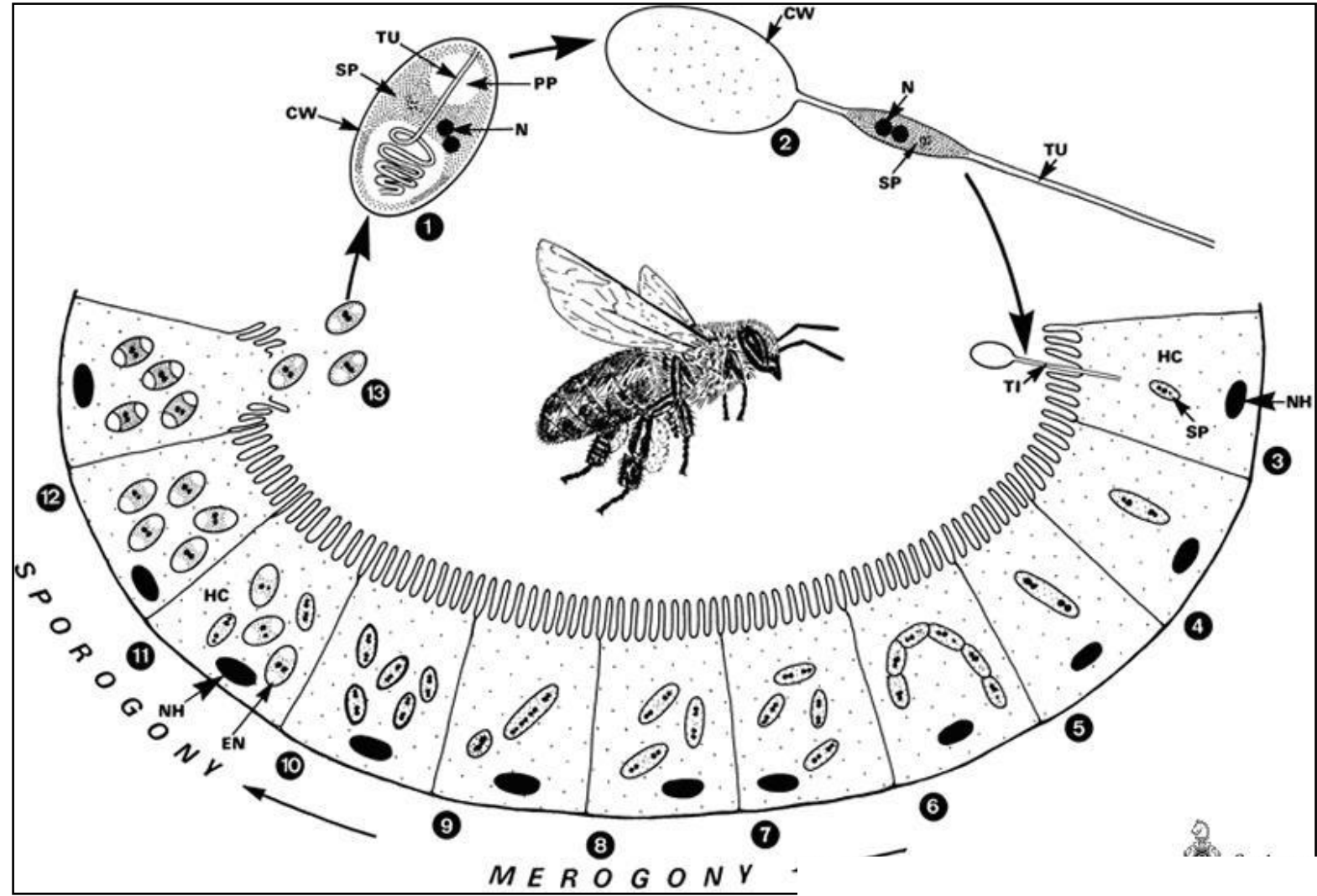
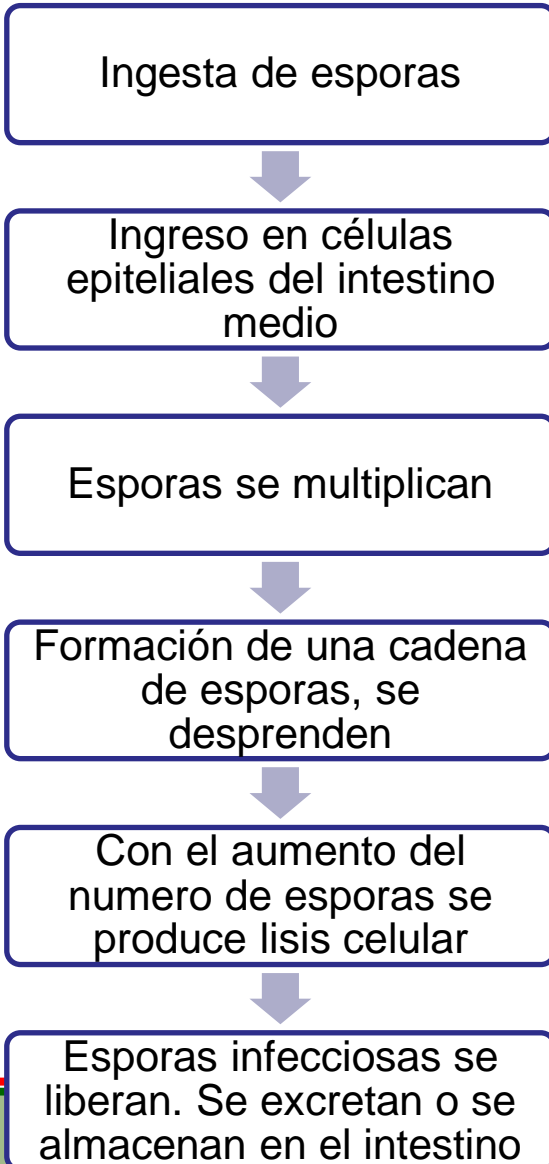
Nosema ceranae



Patógeno descrito en *Apis cerana*

Recientemente descubierto en *A. mellifera* (2006)

Ciclo biológico



Fuente: Springer Life Sciences

Transmisión



transmisión horizontal

En individuos

a través de los excrementos de las abejas enfermas



ingesta de alimentos contaminados



al momento que las abejas limpian el material fecal de individuos infectados

Entre colmenas

desplazamiento de abejas infectadas y zánganos,



el intercambio de material contaminado entre colmenas



el mal saneamiento de apiarios



visitar flores contaminadas

Síntomas



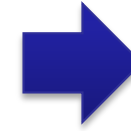
- Manchas marrones del tipo fecal en panales
- Presencia de abejas enfermas y/o cadáveres a la entrada de la colmena



Efectos negativos



- Disminución ingesta alimentos
- Envejecimiento prematuro
- Disminución de esperanza de vida



Colapso de colonias

N. apis



disentería, debilitamiento, deterioro de la locomoción

Reina



N. ceranae



alteraciones en la vida de la abejas, y en actividades de forrajeo

Zángano



Más patógeno que *N. apis*



Abejas obreras (pecoreadoras)



Técnicas de diagnóstico

Microscopía →



Técnicas
moleculares →

PCR →

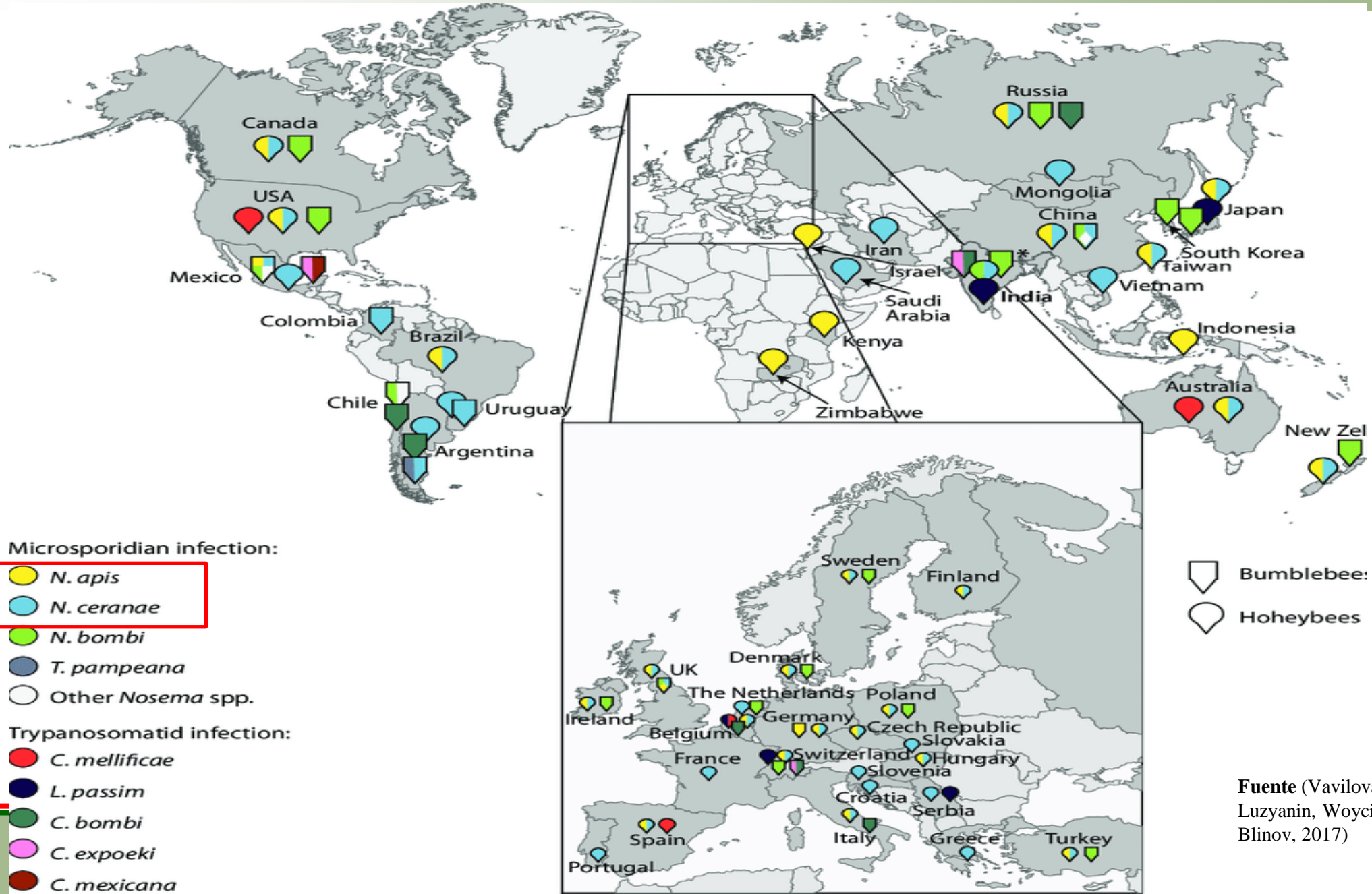
- Convencional
- Múltiple
- En Tiempo Real

Tratamiento, control y prevención de la enfermedad

es necesario adoptar buenas prácticas de gestión y manejo



Distribución mundial de *Nosema* spp.



Fuente (Vavilova, Konopatskaia, Luzyanin, Woyciechowski, & Blinov, 2017)

Situación de nosemosis en Ecuador



Reportes previos de Nosema sp.

	Prevalencia	Método diagnóstico
Vivas (2015)	40.71% colmenas 83.93% apiarios	Microscopio óptico
Amoguimba (2015)	57.14% Chimborazo 100% (5/5) Tungurahua 100% (6/6) Bolívar (apiarios)	Microscopio óptico
AGROCALIDAD (2016)	9% en apiarios a nivel nacional	No definido
Fuentes-Hidalgo (2017) (tesista)	23.38% colmenas 56.67% apiarios	Microscopio óptico



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Nosemosis
enfermedad de
distribución
mundial

de importancia
económica

disminución
producción de
miel, pérdida de
colonias



infección por *N. ceranae* más
mortífera que la
infección por *N. apis*

sin datos en
Ecuador del tipo
de *Nosema*

Afectaría
apicultura en
Ecuador

Afecta
economía de
familias
dedicadas a
esta actividad



necesidad de
tener datos
actuales

medidas de
tratamiento y
control

Técnicas
moleculares

Objetivo General

- Optimizar un protocolo de PCR múltiple y convencional para el diagnóstico y caracterización molecular de *Nosema apis* y *Nosema ceranae* en apiarios de las provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha – Ecuador.

Objetivo Específicos

- Optimizar un protocolo de extracción de ADN a partir de abejas.
- Optimizar un protocolo de Reacción en Cadena de la Polimerasa múltiple (PCR-múltiple) y convencional para diagnóstico e identificación de *Nosema* spp.
- Seleccionar, clonar, secuenciar y analizar la filogenia de muestras positivas a *Nosema* spp. de apiarios de Carchi, Imbabura y Pichincha-Ecuador.
- Analizar la sensibilidad analítica y sensibilidad diagnóstica de la prueba de PCR-múltiple.



ZONA DE ESTUDIO

- Carchi
- Imbabura
- Pichincha



OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

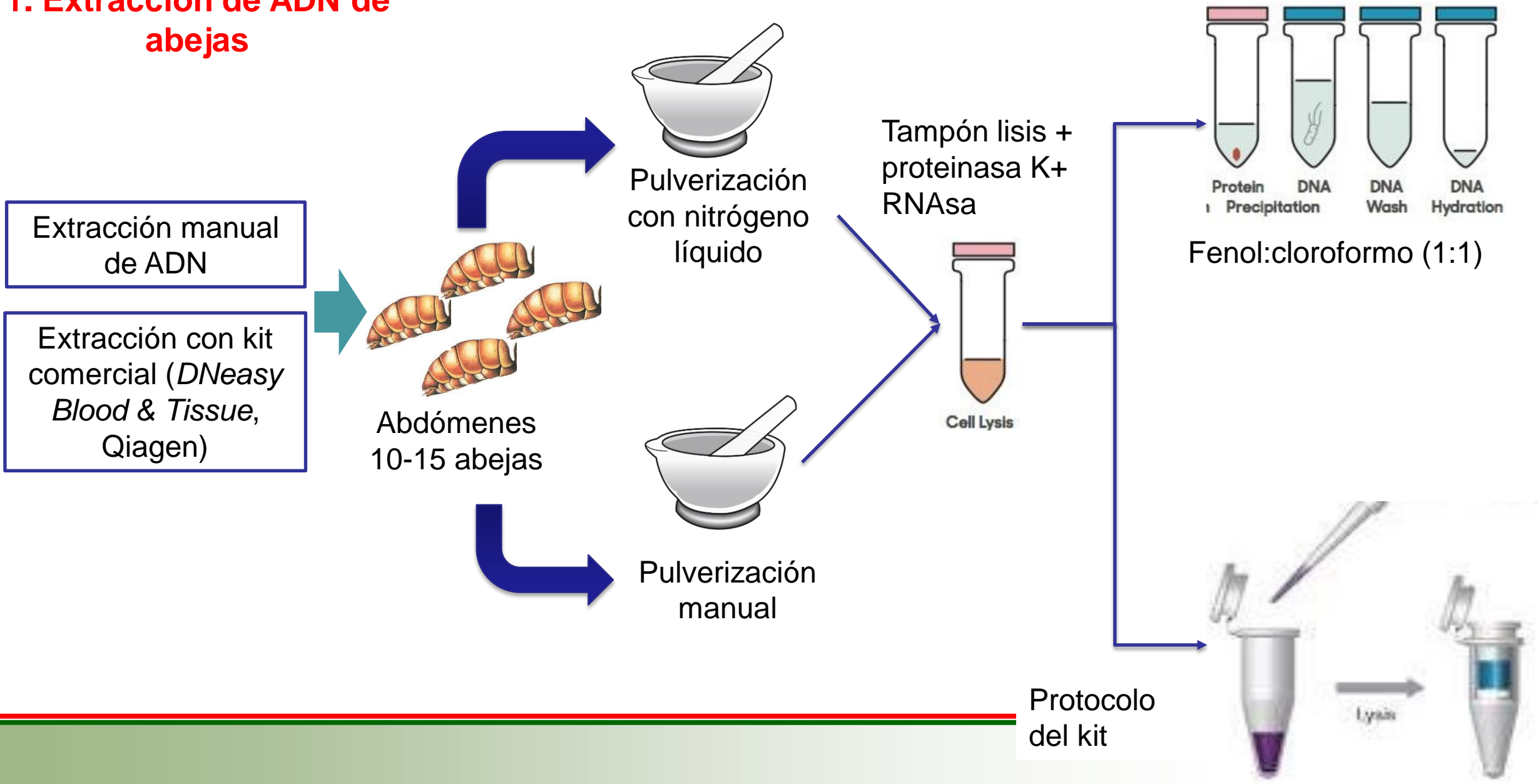
“Estudio epidemiológico de Nosema sp. en apiarios de las provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha – Ecuador, mediante microscopía de fluorescencia” – Ing. Luis Fuentes Hidalgo



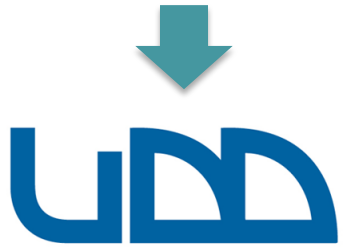
- 181 muestras de colmenas de 29 apiarios
- Muestras de abejas adultas

Provincia	Número de colmenas	Número de apiarios
Carchi	34	4
Imbabura	74	13
Pichincha	73	12
TOTAL	181	29

1. Extracción de ADN de abejas



2. Obtención de controles de ADN positivos



Universidad del Desarrollo

Chile

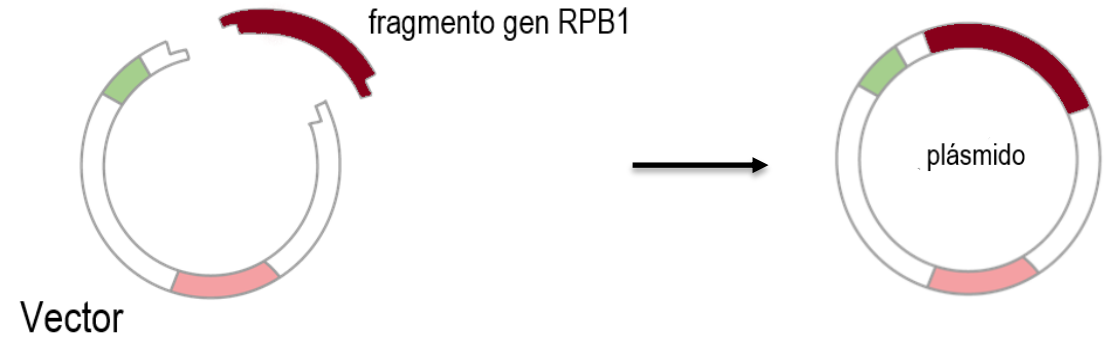
Muestras de ADN de
N. apis y *N. ceranae*



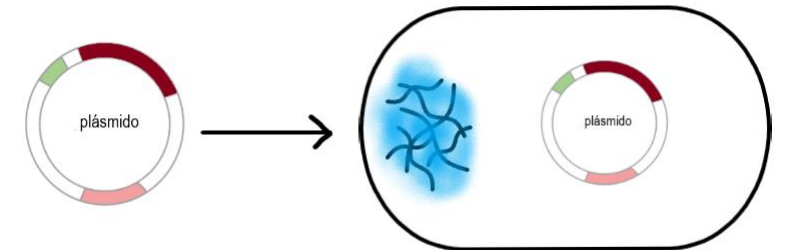
Clonación de los fragmentos de interés

MATERIALES Y MÉTODOS

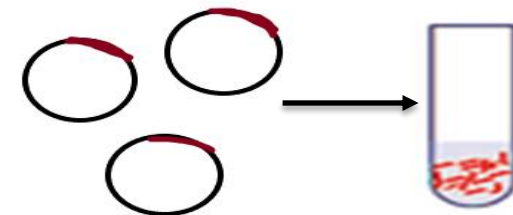
1. Ligación del fragmento al vector



2. Transformación de las células (Clonación Química)

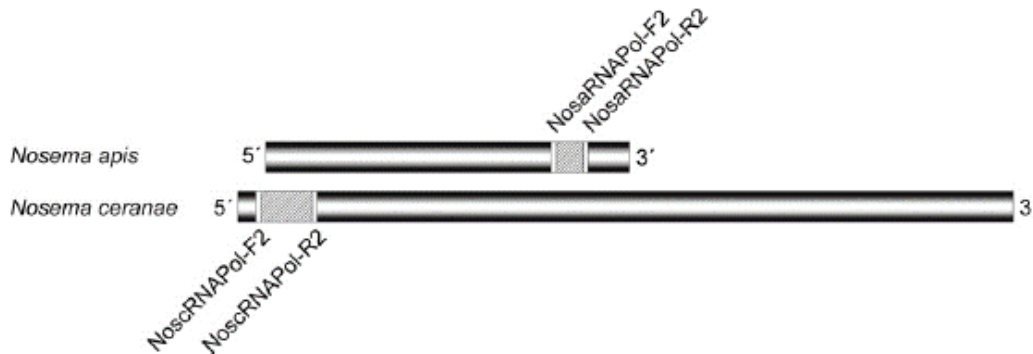


3. Purificación de plásmidos

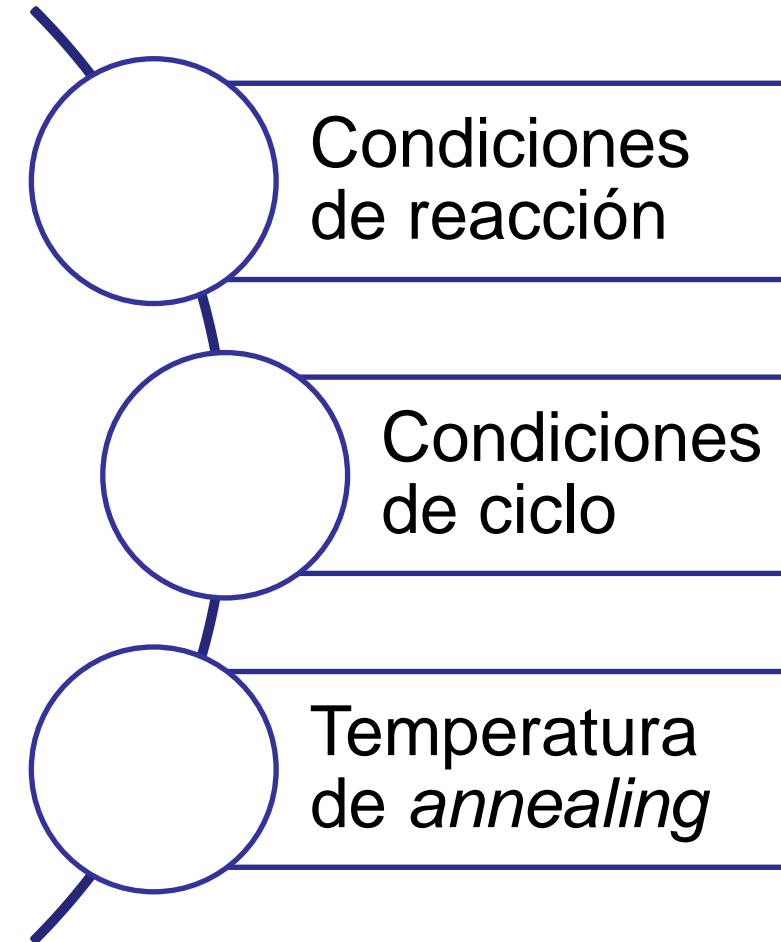


3. Optimización de un protocolo de PCR convencional para *Nosema* spp.

Nombre del Cebador	Secuencia (5'-3')	Especie	Tamaño fragmento
NosaRNAPol-F2 NosaRNAPol-R2	AGCAAGAGACGTTTCTGGTACCTCA CCTTCACGACCACCCATGGCA	<i>Nosema apis</i>	297 pb
NoscrNAPol-F2 NoscrNAPol-R2	TGGGTTCCCTAACCTGGTGGTTT TCACATGACCTGGTGCTCCTTCT	<i>Nosema ceranae</i>	662 pb
COI-F COI-R	GGGTCCAAGACCAGGAACTGGAT GCGCGGAAATTCCTGATATATGAAGAGAAAA	<i>Apis mellifera</i>	119 pb



Amplificación de un fragmento del gen RPB1



4. Optimización de un protocolo de PCR múltiple

PCR triple

→ 3 pares de cebadores

Condiciones de reacción

Reactivos		Concentración final		
Buffer de PCR		2X	1X	-
Cebadores (μM)	Na-F/R	0,5	0,5	0,5
	Nc-F/R	0,5	0,5	0,5
	COI-F/R	0,5	0,1	0,075
Enzima Taq polimerasa (U/ μL)		0,625	1,25	2,5
Cloruro de magnesio (mM)		2	2,5	-

Condiciones de ciclo

N° ciclos	Proceso	T °C	Tiempo
1	Denaturalización inicial	95	5 min
35-40	Denaturalización	94	1 min
	Annealing primer	67	1 min
	Extensión	72	1 min
1	Extensión final	72	10 min



4. Optimización de un protocolo de PCR múltiple

PCR doble

→ 2 pares de cebadores

Condiciones de reacción

Reactivo	Variación de concentración
Cloruro de Magnesio	2 mM – 1,5 mM
Enzima Taq Polimerasa	0,625 U/μL – 2,5 U/μL
Cebadores	0,05 μM – 0,5 μM

Condiciones de ciclo

N° ciclos	Proceso	T °C	Tiempo
1	Denaturalización inicial	95	5 min
35-40	Denaturalización	94	1 min
	Annealing primer	67	1 min
	Extensión	72	1 min
1	Extensión final	72	10 min



5. Secuenciación

Muestras positivas a
N. apis y *N. ceranae*



Productos de PCR



Secuenciación MacroGen-Corea



Secuenciación en ambos
sentidos

6. Caracterización molecular y análisis filogenético

Análisis de secuencias y
electroferograma



comparación con secuencias en el GenBank



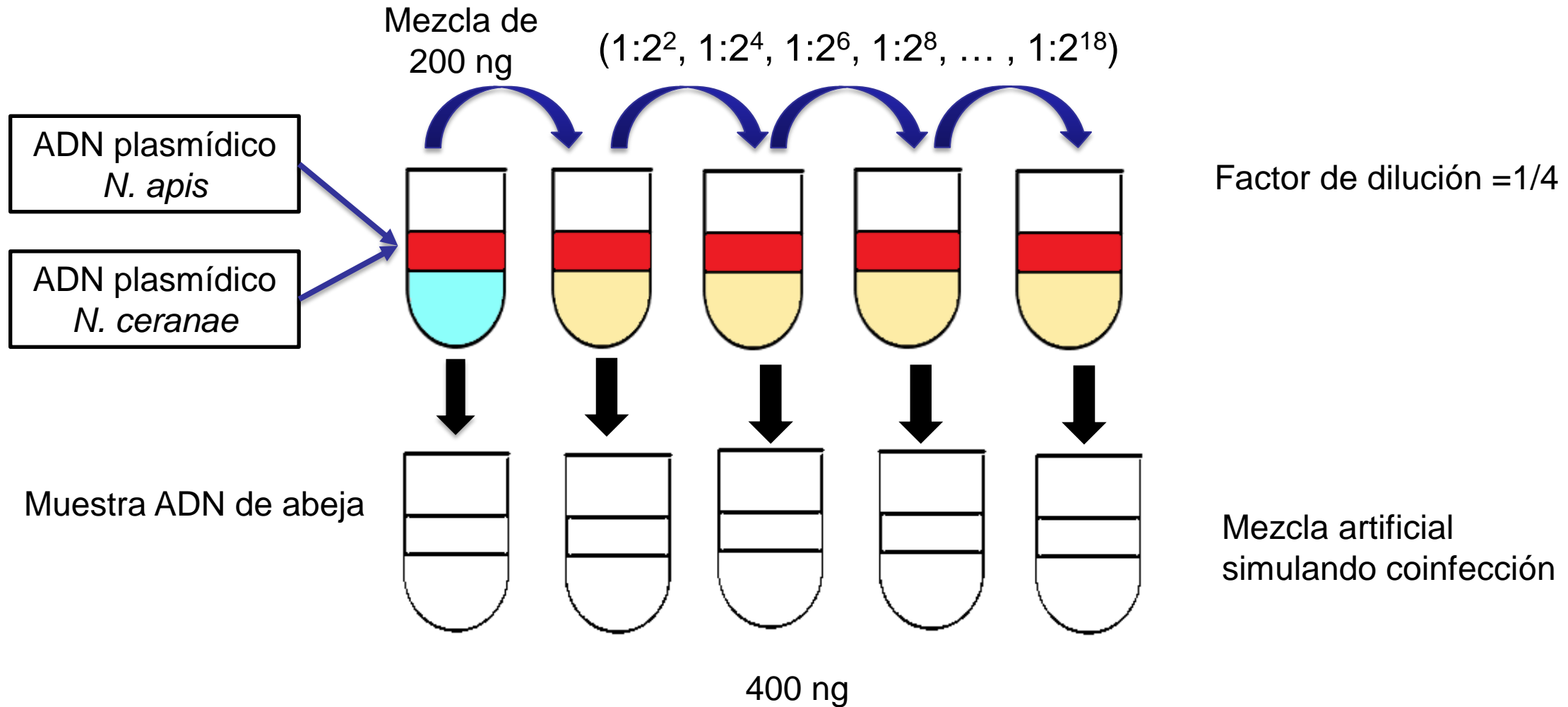
Construcción de dos árboles filogenéticos



Modelo evolutivo Kimura
2 parámetros y
1000 repeticiones



7. Sensibilidad Analítica



8. Sensibilidad diagnóstica

	Número de colmenas	
	Se sabe son positivos a <i>Nosema</i> por PCR-m	Se sabe son negativos a <i>Nosema</i> por PCR-m
Positivos a microscopia	Verdaderos positivos (VP)	Falsos positivos (FP)
Negativos a microscopia	Falsos negativos (FN)	Verdaderos negativos (VN)

$$\text{Especificidad diagnóstica} = \frac{VN}{VN + FP}$$

$$\text{Sensibilidad diagnóstica} = \frac{VP}{VP + FN}$$



HIPÓTESIS

- H_0 : La prueba de PCR múltiple desarrollada no permite el diagnóstico de las especies de *Nosema*: *N. apis* y *N. ceranae*,
- H_1 : La prueba de PCR múltiple desarrollada permite el diagnóstico de las especies de *Nosema*: *N. apis* y *N. ceranae*,



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Extracción de ADN de abejas

Método de extracción	Concentración de AND (ng/μL)	Pureza del ADN (260/280)
Kit-nitrógeno	53,09	1,63
Kit comercial	82,57	1,72
Manual-nitrógeno	996,07	1,80
Manual	3425,00	1,85

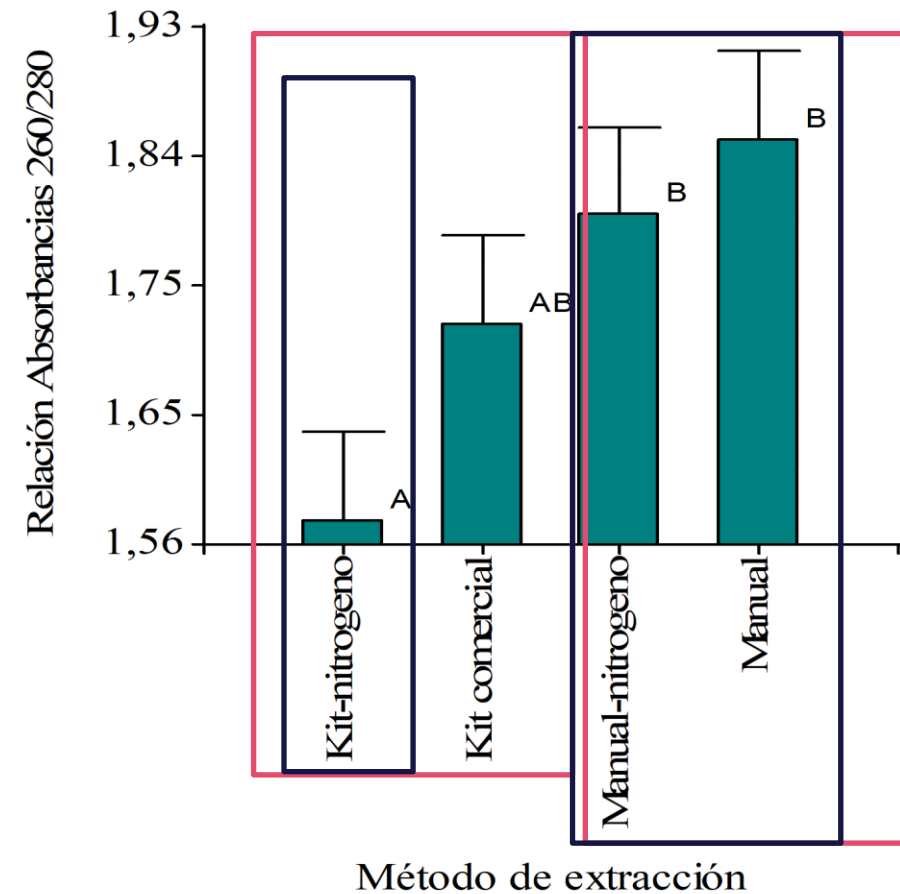
(ANOVA)

Diferencia significativa ($P < 0,05$)

(Prueba de Duncan)

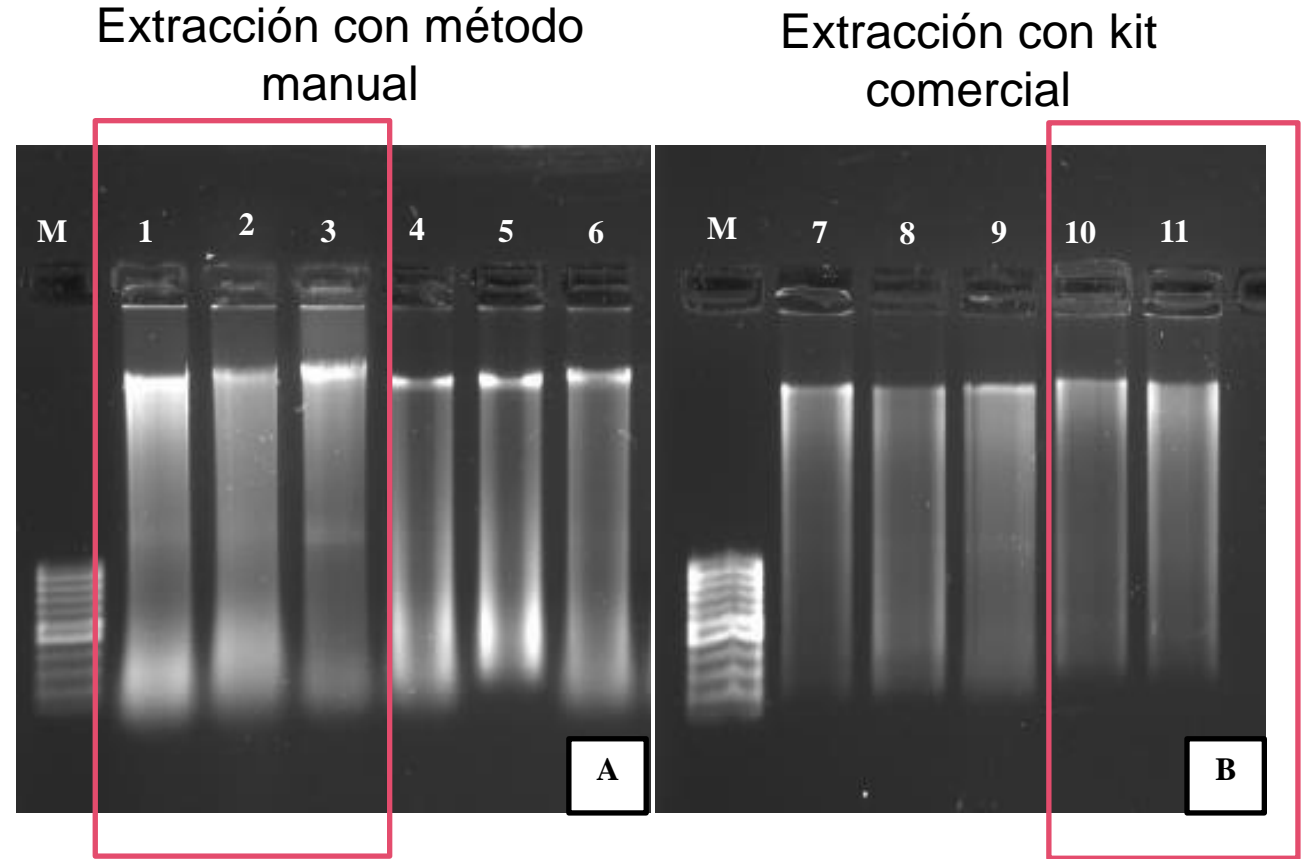
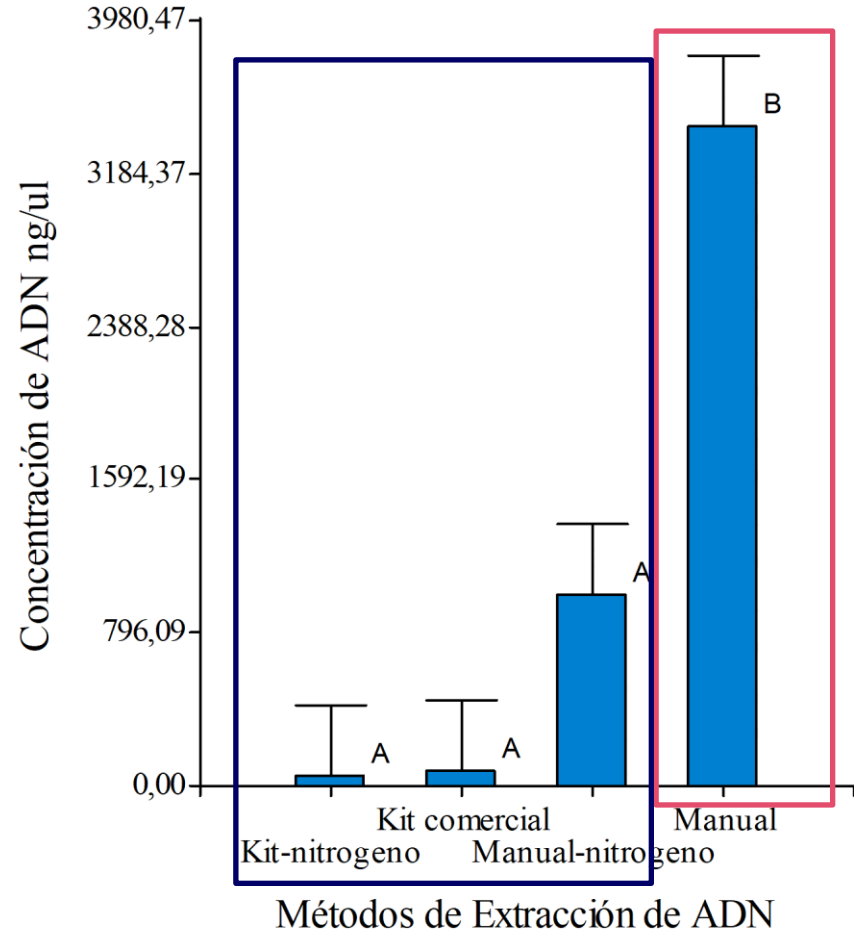
Diferencia significativa

Estadísticamente no son diferentes



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Extracción de ADN de abejas

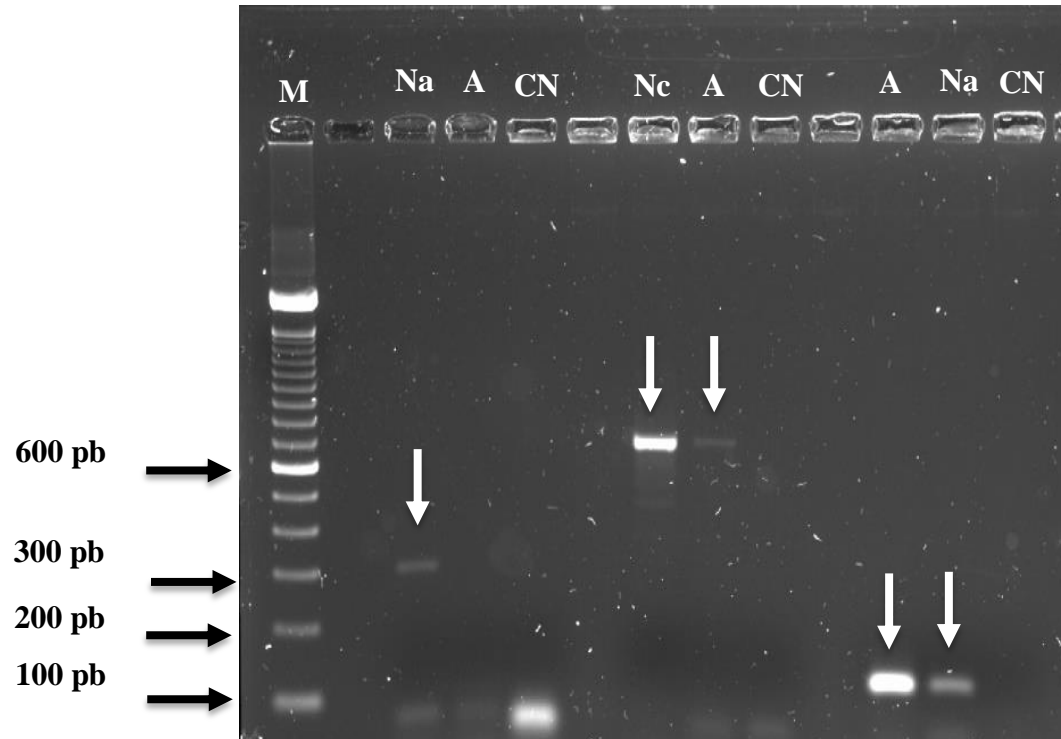


■ Uso de nitrógeno líquido



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

2. Optimización de un protocolo de PCR convencional



- Na= *N. apis* → 297 pb
- Nc= *N. ceranae* → 662 pb
- A= *A. mellifera* → 119 pb
- CN= control negativo

Condiciones de reacción

Reactivos	Unidad	Concentración final
H ₂ O	μL	-
Buffer	X	1
Primer F	μM	0,5
Primer R	μM	0,5
MgCl ₂	mM	2
dNTP (mezcal)	mM	0,8
Taq	U/μL	0,625
ADN	ngr	100

Condiciones de reacción

- 35 ciclos
- Ta= 67

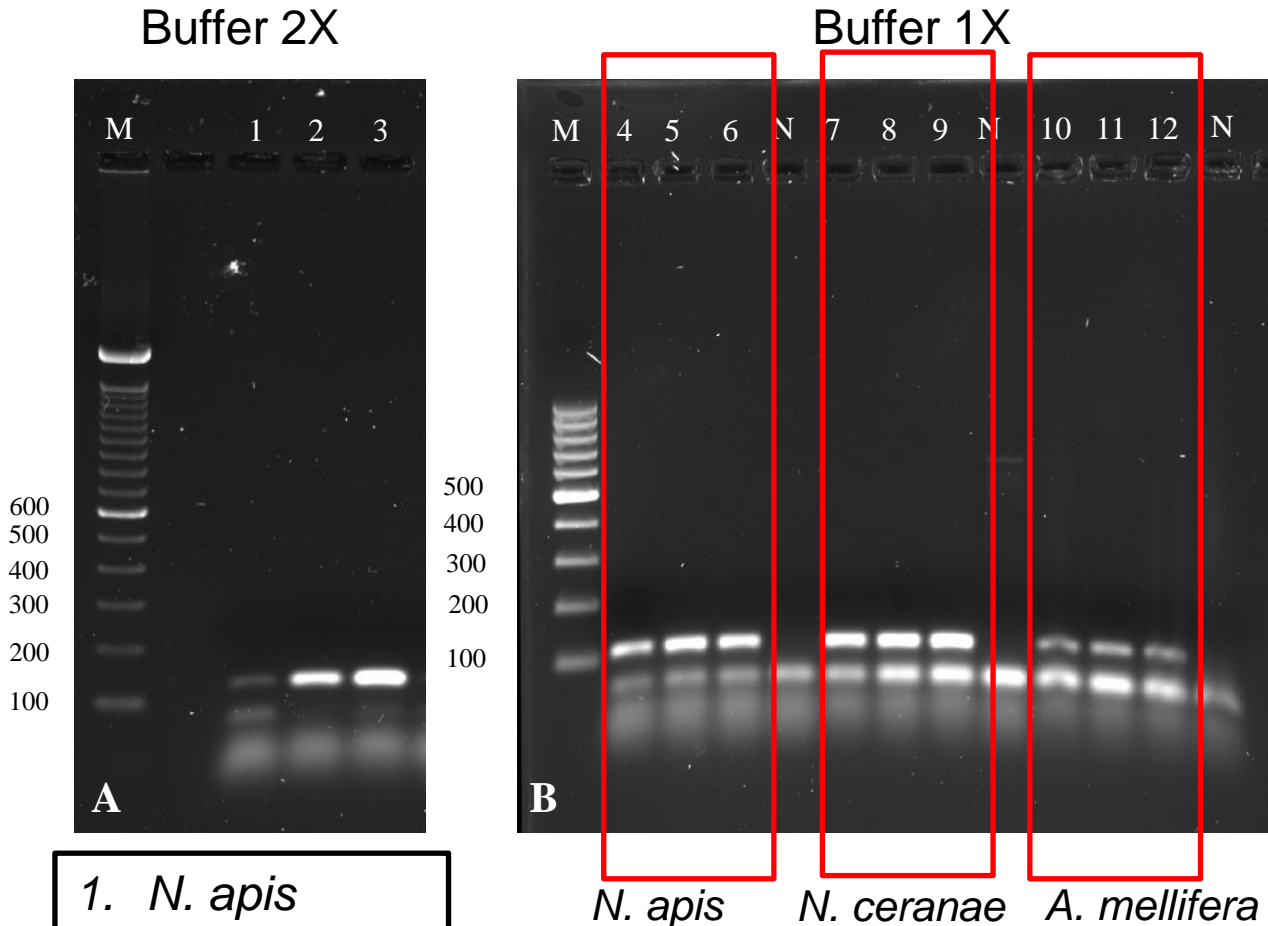


3. Optimización de un protocolo de PCR múltiple

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

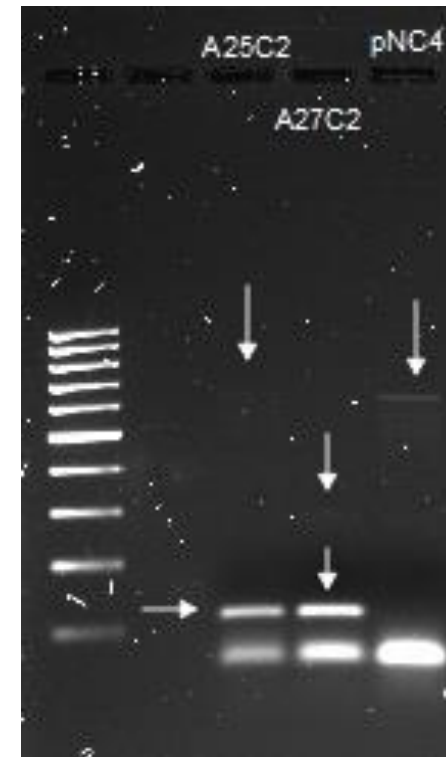
PCR Triple

a) Concentración de Buffer de PCR

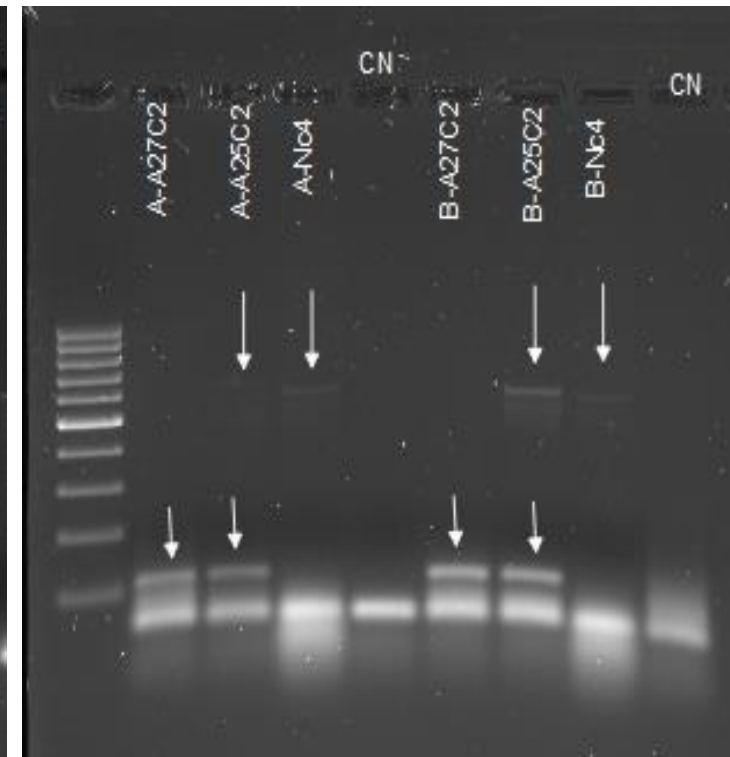


- 1. *N. apis*
- 2. *N. ceranae*
- 3. *A. mellifera*

b) Aumento de concentración de $MgCl_2$ y enzima *Taq*



c) Aumento de cantidad de ADN plantilla (400 ng)



3. Optimización de un protocolo de PCR múltiple

PCR doble

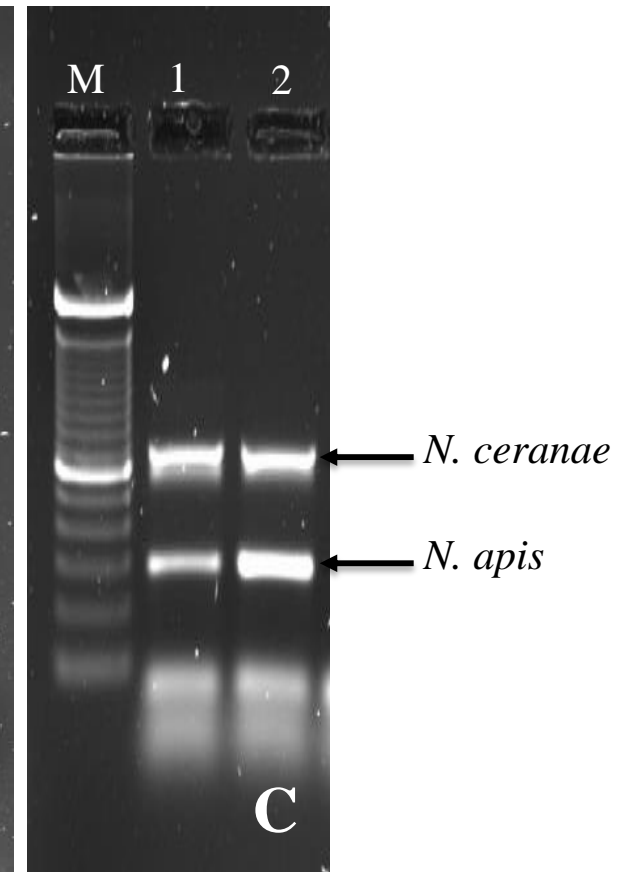
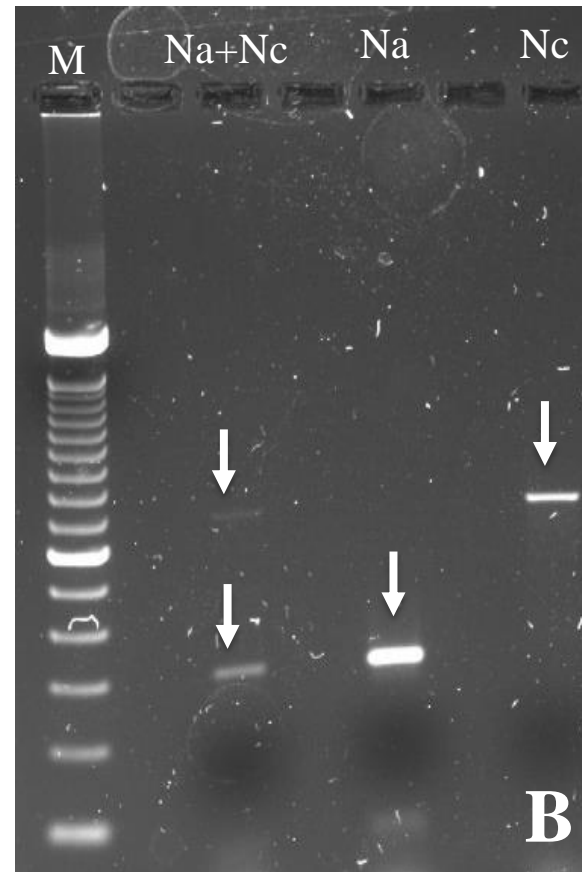
A) Mismas condiciones de reacción que PCR convencional



Controles positivos de ADN

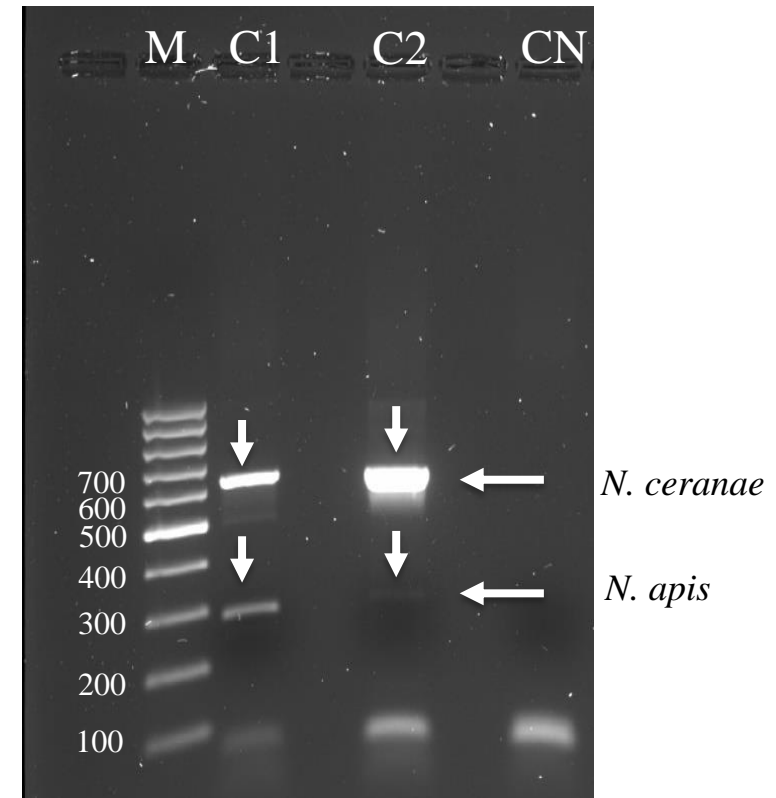
35 ciclos

40 ciclos



Pruebas con muestras de ADN extraído y mezcla artificial para simular coinfección

N° Ensayo	[MgCl ₂] (mM)			[Cebadores] (μM)		[Enzima Taq] (U/μL)			Resultados obtenidos		
	1,5	1,75	2	0,5/0,5	0,5/0,4	0,625	1,25	2,5	presencia de doble banda	intensidad de banda	sin bandas inespecíficas
1	0	0	1	1	0	1	0	0	✓	0	✓
2	0	0	1	1	0	0	1	0	✓	✓	0
3	0	0	1	1	0	0	0	1	✓	✓	0
4	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	✓
5	0	1	0	1	0	0	1	0	✓	0	✓
6	0	1	0	0	1	0	1	0	✓	✓	✓

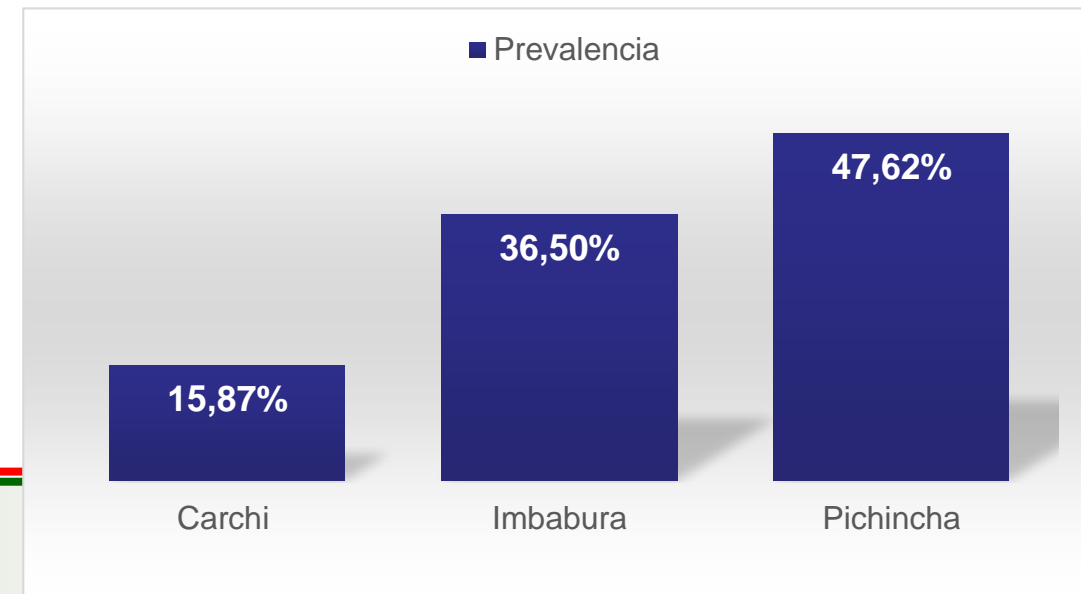


4. Prevalencia de *Nosema* sp.

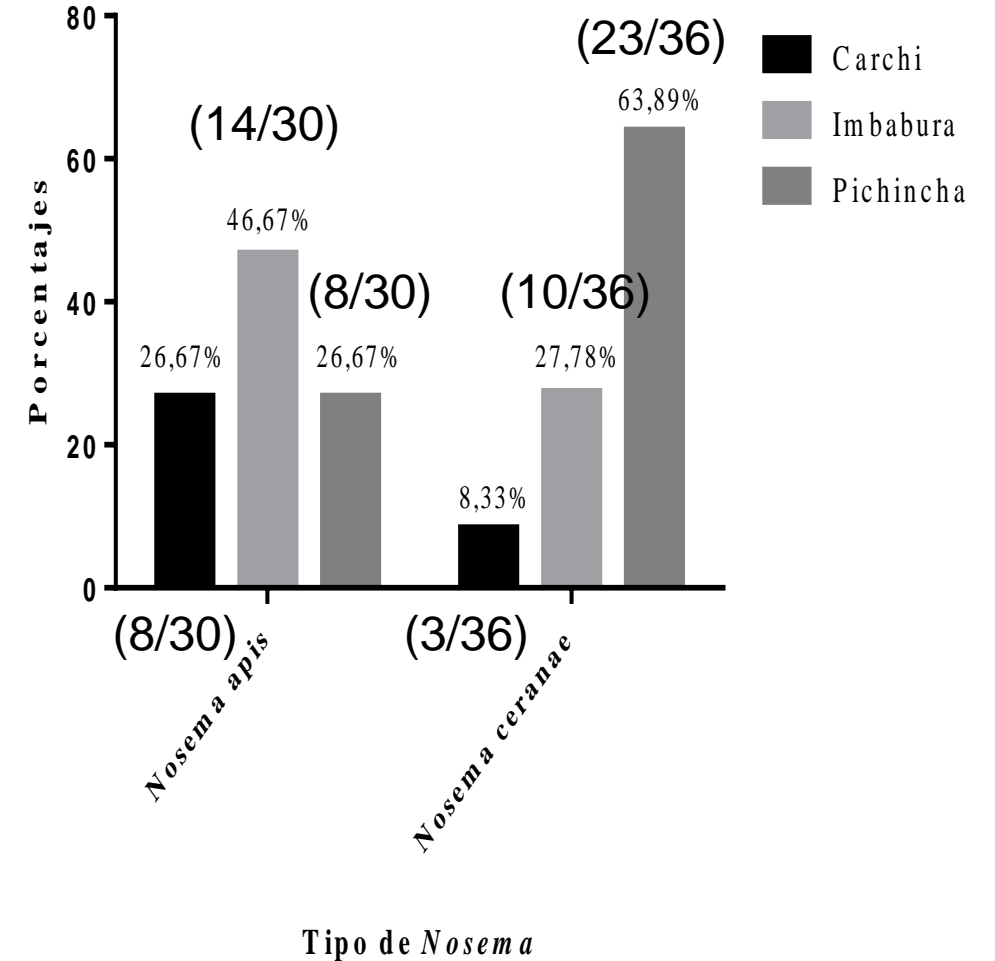
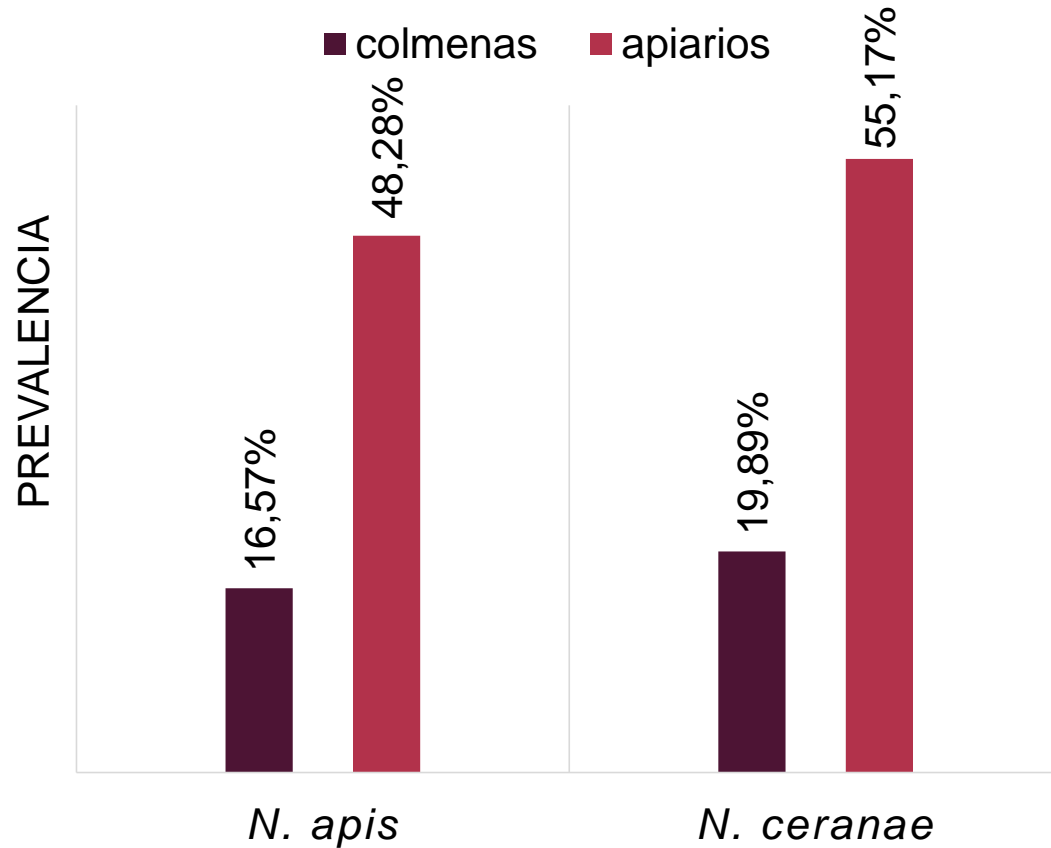
Presencia del agente	Número de colmenas		Porcentaje por colmenas	Número de apiarios		Porcentaje en apiarios
	Total de colmenas	Colmenas positivas		Total de apiarios	Apiarios positivos	
<i>Nosema</i> sp.	181	63	35,36%	29	25	86,21%
Negativos		118	65,19%		4	13,79%



Colmenas



5. Prevalencia de *Nosema apis* y *N. ceranae* por provincias



- Colmenas= (30/181)
- Apiarios= (14/29)

- Colmenas= (36/181)
- Apiarios= (16/29)

5. Prevalencia de *Nosema apis* y *N. ceranae* por provincias

Provincia	Colmenas			Apiarios		
	Total de colmenas	Prevalencia <i>N. apis</i>	Prevalencia <i>N. ceranae</i>	Total de apiarios	Prevalencia <i>N. apis</i>	Prevalencia <i>N. ceranae</i>
Carchi	34	8 (23,53%)	3 (8,82%)	4	3 (75%)	1 (25%)
Imbabura	74	14 (18,92%)	10 (13,51%)	13	7 (53,85%)	7 (53,85%)
Pichincha	73	8 (10,96%)	23 (31,51%)	12	4 (33,33%)	8 (66,67%)
TOTAL	181	30	36	29	14	16

3 colmenas con coinfección

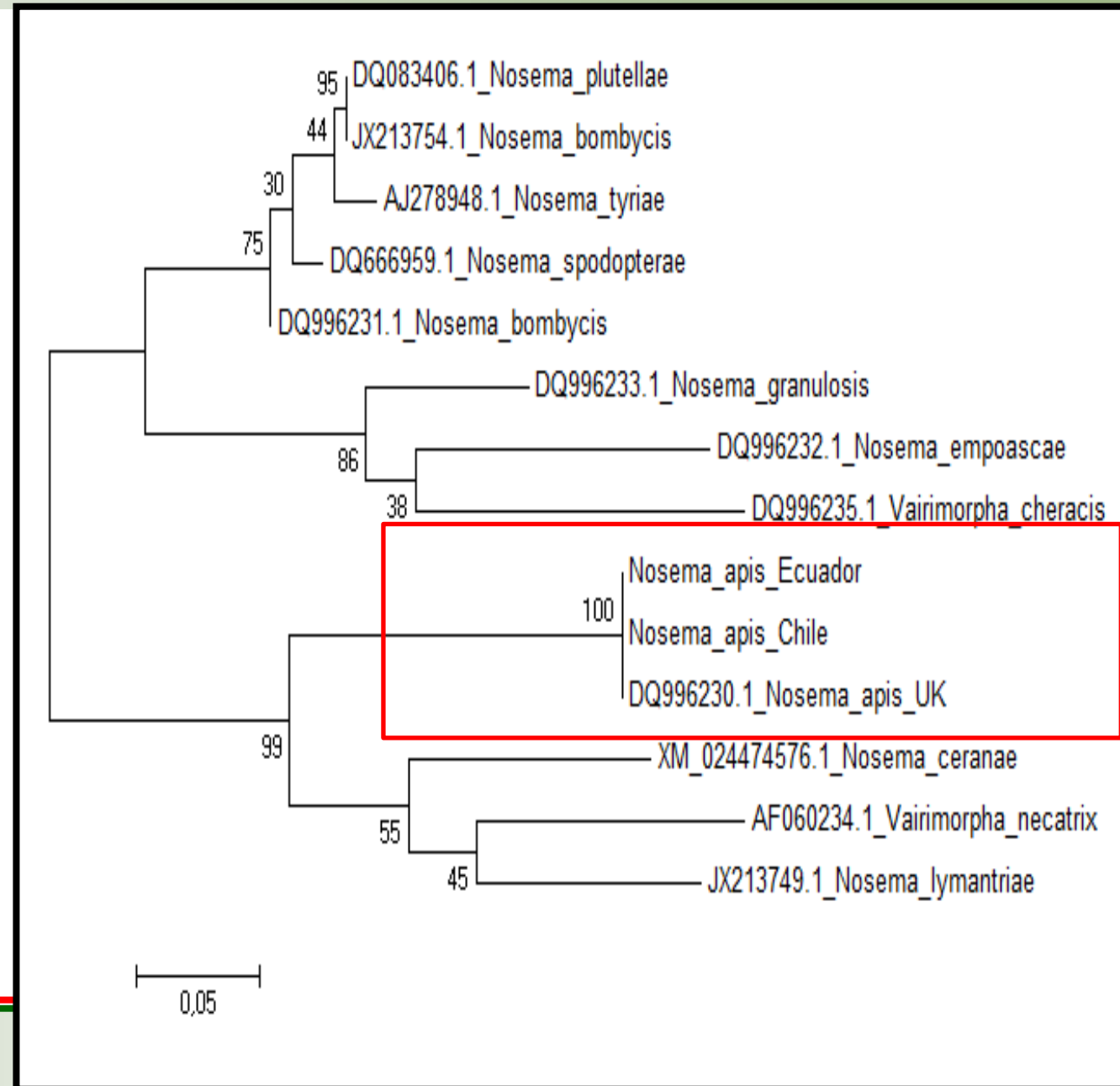
no son significativamente diferentes ($P < 0,05$)



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

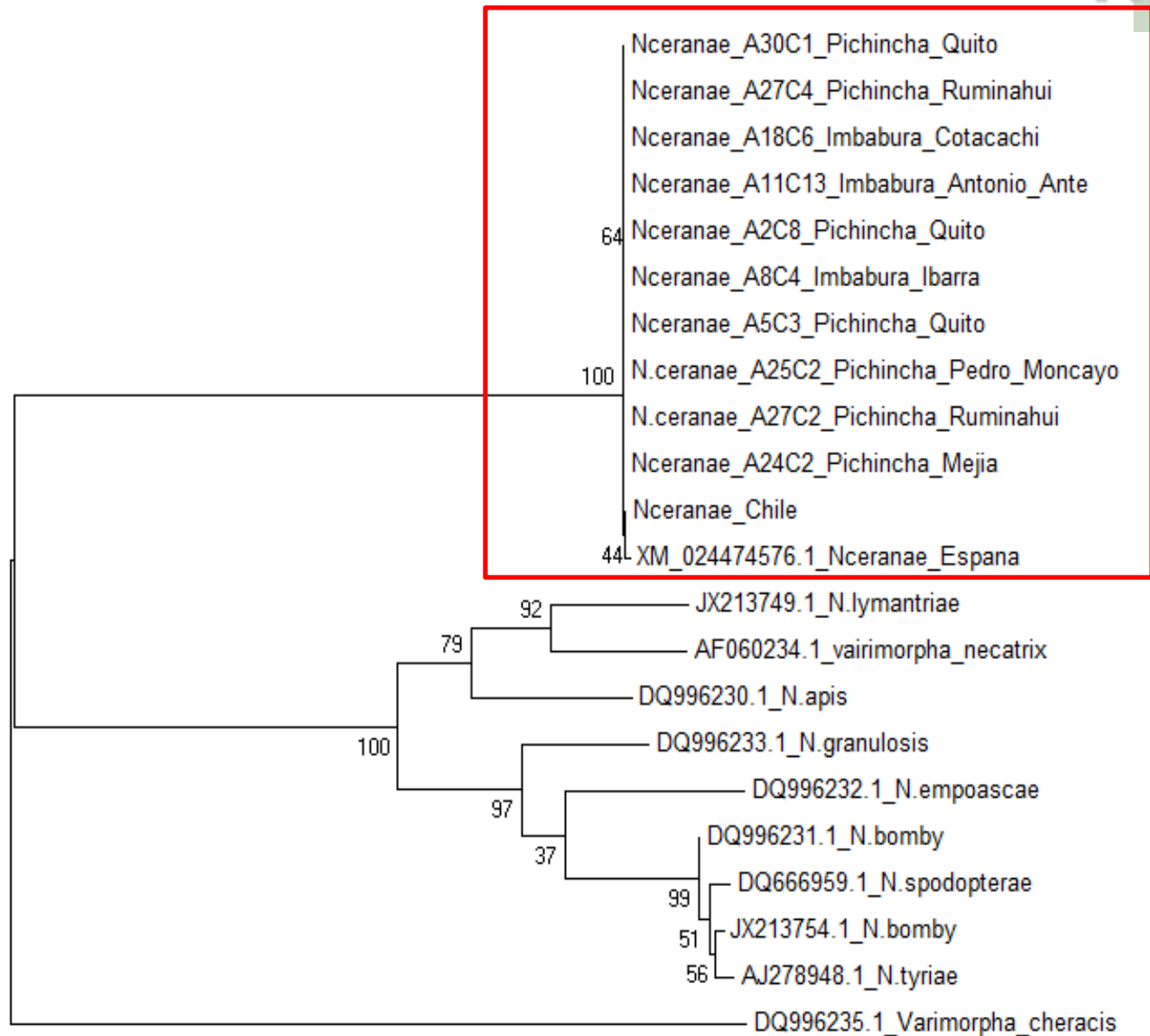
6. Caracterización molecular de *N. apis* y análisis filogenético

100% de identidad



6. Caracterización molecular de *N. ceranae* y análisis filogenético

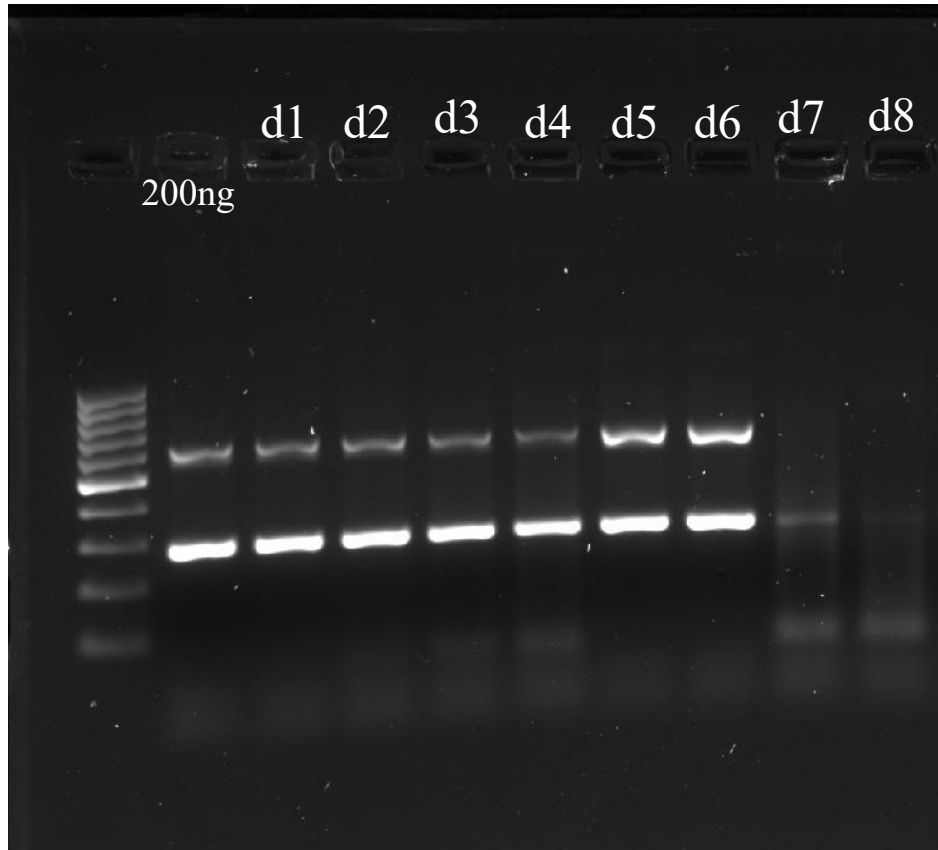
99% de identidad



0,1



7. Sensibilidad analítica



Detectó hasta 0,003 ng
de ADN plasmídico

$d1 = 1:2^2$

$d2 = 1:2^4$

$d3 = 1:2^6$

$d4 = 1:2^8$

$d5 = 1:2^{10}$

$d6 = 1:2^{12}$

$d7 = 1:2^{14}$

$d8 = 1:2^{18}$

8. Sensibilidad diagnóstica

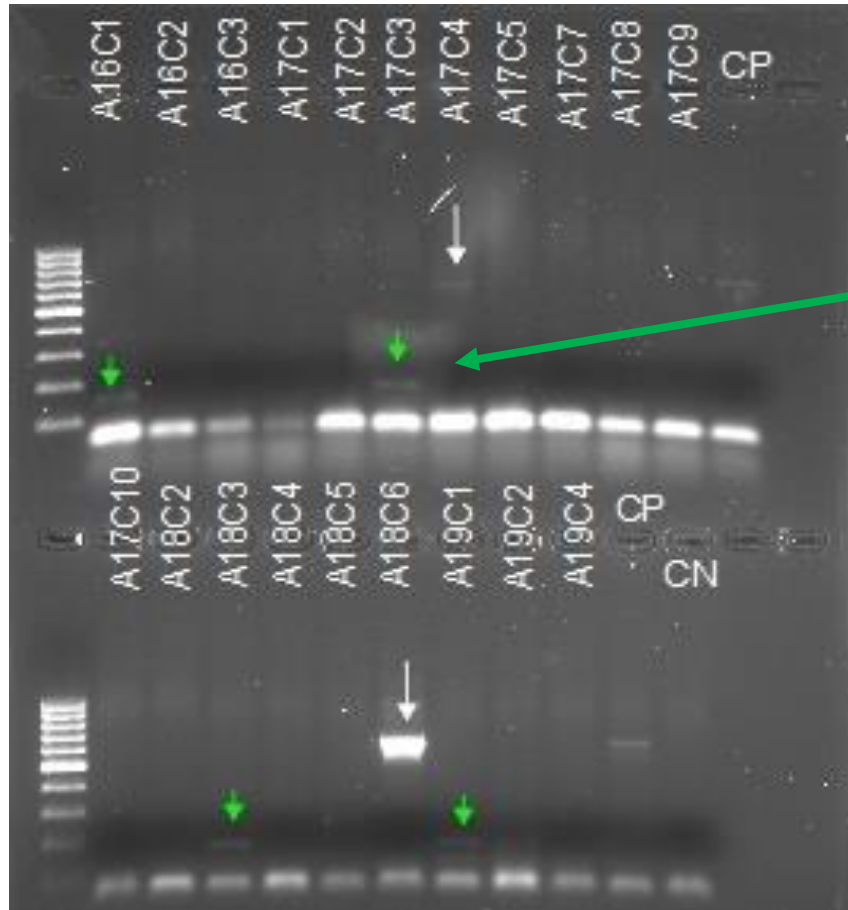
	PCR		Total
	+	-	
MO	+	27	45
	-	36	136
Total	63	118	181

Sensibilidad diagnóstica = 43,5%

Especificidad diagnóstica = 84,7%.



9. Resultados adicionales



amplificación de una banda cercana a 200 pb



secuenciación



resultados



Virus filamentoso
Apis mellifera
(AmFv)

Id del apiario	N° de colmenas que presentaron el virus	Cantón	Provincia
A14	5	Mira	Carchi
A16	1	Cotacachi	Imbabura
A17	1	Cotacachi	Imbabura
A18	1	Cotacachi	Imbabura
A19	1	Cotacachi	Imbabura
A24	1	Mejía	Pichincha
A29	8	Quito	Pichincha
Total	18		



- **No existe diferencia** entre el uso o no de nitrógeno líquido para la extracción de ADN en cuanto a la calidad y cantidad de ADN.
- **No existe diferencia** entre el uso de kit comercial o el método manual para extracción de ADN.
- PCR doble permitió la **detección e identificación** de especies de *Nosema*.
- Se encontró una prevalencia general para *N. apis* de **16,57% (30/181)** y para *N. ceranae* de **19,89% (36/181)** a nivel de colmena, siendo Pichincha la provincia con mayor número de colmenas positivas a *N. ceranae*.
- Se identificaron 3 colmenas y 5 apiarios con infección por ambos parásitos. **Sin diferencia significativa** entre la presencia de *N. ceranae* y *N. apis* en las colmenas analizadas.
- La caracterización molecular mediante secuenciación confirmó que los fragmentos amplificados por PCR corresponden a las especies de *N. apis* y *N. ceranae*.
- Estos resultados se convierten en el **primer reporte de *N. ceranae* en Ecuador** y la confirmación de la presencia de *N. apis* como los parásitos que infectan y generan la enfermedad de nosemosis en colmenas de abejas melíferas del país.



- Se recomienda realizar estudios en las provincias del centro y sur del país
- Realizar investigaciones con respecto a posibles infecciones de *N. apis* y *N. ceranae* en otras especies de abejas del género *Apis* y en abejas nativas de la región
- Los resultados obtenidos acerca del virus AmFV se deben confirmar mediante otro trabajo de investigación
- Socializar estos resultados tanto con los apicultores como con las agencias reguladoras como AGROCALIDAD y demás entidades de control



AGRADECIMIENTOS



Grupo de Investigación en
Sanidad Animal y Humana



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Laboratorio de Inmunología y Virología
Laboratorio de Biotecnología vegetal
Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE

Colaboradores científicos

Dr. Jorge Ron Román, Ph.D.
Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I - ESPE

Lcda. Sarah Martín Solano, Ph.D.
Carrera de Ingeniería en Biotecnología Matriz Sangolquí –
ESPE

Dra. María Augusta Chávez, M.Sc.
Carrera de Ingeniería en Biotecnología Matriz Sangolquí –
ESPE

Ing. Cristina Cholota
Carrera de Ingeniería en Biotecnología Matriz Sangolquí –
ESPE

Armando Reyna, PhD.
Carrera de Ingeniería en Biotecnología Extensión Santo
Domingo – ESPE

Dra. Jessica Martínez de la Universidad del Desarrollo Chile.

**Tesistas y Pasantes del Laboratorio de
Biotecnología Animal - ESPE**

Gracias



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA