

RESUMEN

Las abejas melíferas cumplen un rol importante alrededor del mundo tanto en el ámbito económico como ecológico. Estos insectos son víctimas de enfermedades de tipo viral, bacterianas, por hongos, protozoos y ácaros. Una de las principales y más preocupantes enfermedades que afectan a las abejas, debido a que provoca colapso de colonias y pérdidas en producción de miel, es la nosemosis, causada por los microsporidios *Nosema apis* y *Nosema ceranae*, este último es un parásito relativamente nuevo descubierto en las abejas de la especie *Apis mellifera*. Debido a que son muy similares en tamaño y forma su identificación por microscopía óptica se dificulta, por ello se utilizan técnicas moleculares, como PCR, por su mayor grado de sensibilidad y especificidad. En Ecuador no se contaba con registros sobre el tipo de microsporidio que infecta a las abejas. Por ello el objetivo de este estudio fue desarrollar un protocolo de PCR múltiple para el diagnóstico y caracterización molecular de estos parásitos. Para el desarrollo de la técnica se utilizó dos pares de cebadores específicos para *N. apis* y *N. ceranae* que amplifican fragmentos de regiones diferentes del gen RPB1. Se varió las condiciones de ciclo y las concentraciones finales de reacción de los cebadores, MgCl₂, enzima *Taq* polimerasa y buffer de PCR, se probó también el uso de un control interno de reacción. El protocolo optimizado se aplicó para el diagnóstico de 181 colmenas ubicadas en 29 apiarios de las provincias de Carchi, Imbabura y Pichincha de Ecuador. Los resultados muestran una prevalencia general para *N. apis* de 16,57% del total de colmenas analizadas (30/181), mientras que la prevalencia de *N. ceranae* fue de 19,89% (36/181). En Imbabura se localizó el mayor porcentaje de infección por *N. apis*, es decir, de las 30 colmenas positivas el 46,67% estaban en Imbabura, mientras que en Pichincha se encontró el mayor porcentaje de infección por *N. ceranae* (63,89%; 23/36). La caracterización molecular y el análisis filogenético confirmó que las secuencias obtenidas en Ecuador corresponde a los microsporidios *N. apis*, el cual no mostró variabilidad genética, y *N. ceranae* en donde se observó variabilidad genética. Este trabajo representa el primer reporte de *N. ceranae* realizado en Ecuador.

Palabras clave:

- **OPTIMIZACIÓN PCR MÚLTIPLE**
- *Nosema apis*
- *Nosema ceranae*

ABSTRACT

Honeybees play an important role around the world both in the economic and ecological fields. These insects are victims of viral, bacterial, fungal, protozoan and mite diseases. One of the main and most worrisome diseases that affect bees is the nosemosis, because it causes collapse of colonies and losses in honey production. This disease is caused by the microsporidia *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, the latter is a relatively new parasite discovered in the species bees *Apis mellifera*. These two kind of microsporidia are very similar in size and shape, so their identification by optical microscopy is not adequate, for that reason molecular techniques such as PCR have been developed due to their greater degree of sensitivity and specificity. In Ecuador there were no records on the type of microsporidium that attacks bees. Therefore, the objective of this study was to develop a multiple PCR protocol for the diagnosis and molecular characterization of these parasites. For the development of the technique two pairs of specific primers were used for *N. apis* and *N. ceranae* that amplify fragments from different regions of the RPB1 gene. Regarding PCR-m optimization, the cycle conditions and the final reaction concentrations of the primers, MgCl₂, Taq polymerase enzyme and PCR buffer were varied, as well as the use of an internal reaction control. Once the optimized protocol was obtained, the same was applied for the diagnosis of 181 beehives located in 29 apiaries of the provinces of Carchi, Imbabura and Pichincha of Ecuador. The results show a general prevalence percentage for *N. apis* of 16.57% of the total number of hives analyzed (30/181), while the prevalence of *N. ceranae* was 19.89% (36/181). In Imbabura, the highest percentage of infection by *N. apis* was found, that is, of the 30 positive hives, 46.67% were in Imbabura, while in Pichincha the highest percentage of infection by *N. ceranae* was found (63.89 %; 23/36). The molecular characterization and the phylogenetic analysis confirmed that the sequences obtained in Ecuador correspond to the microsporidia *N. apis*, which did not show genetic variability, and *N. ceranae* where genetic variability was observed. This work represents the first report of *N. ceranae* carried out in Ecuador.

Keywords:

- **MULTIPLEX PCR OPTIMIZATION**
- *Nosema apis*
- *Nosema ceranae*