

	Programa Nacional de Sanidad Apícola	Rige a partir de: 17/07/2012	Código: PNAPI-PV-003
	PROTOCOLO VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE NOSEMOSIS	Versión 01	Página 1 de 16
Elaborado por: Programa Nacional de Sanidad Apícola	Revisado por: Unidad de Epidemiología	Aprobado por: Director General	

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	3
3. JUSTIFICACIÓN	3
4. EJECUTORES DEL PROTOCOLO	4
4.1. Elaboración del protocolo de vigilancia.....	4
4.2. Recepción de denuncias de casos clínicamente compatible con Nosemosis	5
4.3. Investigación y seguimiento de casos clínicamente compatible con Nosemosis	5
4.4. Toma de Muestras	5
4.5. Diagnóstico de Laboratorio	5
4.6. Aplicación de medidas sanitarias para evitar ingreso de la enfermedad, medidas de mitigación, prevención y control.	5
5. COBERTURA DEL PROTOCOLO	6
6. OBJETIVOS	6
Objetivos generales.....	6
Objetivos específicos.....	6
7. ENFERMEDAD A VIGILAR	7
7.1. Agente etiológico.....	7
7.2. Mecanismos de transmisión	7
8. DEFINICIÓN DE CASO	9
8.1. Caso sospechoso	9
8.2. Caso positivo	9
8.3. Caso negativo	9
9. ESTRATEGIAS PARA LA VIGILANCIA Y SEGUIMIENTO EPIDEMIOLÓGICO	9

	Programa Nacional de Sanidad Apícola	Rige a partir de: 17/07/2012	Código: PNAPI-PV-003
	PROTOCOLO VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE NOSEMOSIS	Versión 01	Página 2 de 16
Elaborado por: Programa Nacional de Sanidad Apícola	Revisado por: Unidad de Epidemiología	Aprobado por: Director General	

9.1.	Bases legales y reglamentarias	9
9.1.1.	Competencia para aplicar medidas sanitarias sobre la actividad comercial:	9
9.1.2.	Aplicación Obligatoria de Medidas Sanitarias:	9
9.1.3.	La declaración obligatoria de la enfermedad:	10
9.2.	Sistema de información y notificación.....	10
9.2.1.	Reporte de sospechas de enfermedad:	10
9.2.2.	Seguimiento de casos clínicamente compatibles con Nosemosis:	10
9.2.3.	Toma y envío de muestras al Laboratorio:	10
9.2.4.	Registro del evento:	10
9.2.5.	Diagnóstico Laboratorial:	11
9.2.6.	Resultado Laboratorial:	11
9.2.7.	Entrega de Resultados:	11
9.2.8.	Elaboración de informes y comunicación según el nivel que corresponda, a saber:	11
9.3.	Diseminación de la información:	11
9.3.1.	Informes de seguimiento de sospechas y casos:	11
9.3.2.	Boletines informativos:	12
10.	VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA	12
10.1.	Tipo de vigilancia.....	12
10.2.1.	Vigilancia Pasiva:	12
10.2.2.	Vigilancia Activa	12
11.	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	12
11.1.	LABORATORIOS DESIGNADOS PARA EL PROCESO DE LAS MUESTRAS.	
	12	
	Laboratorio Nacional	12
	Laboratorio de Referencia.....	12
11.2.	MUESTRAS:	12
11.3.	PRUEBAS LABORATORIALES A UTILIZAR PARA EL DIAGNÓSTICO DE NOSEMOSIS:	12
11.3.1.	Descripción del método diagnóstico	13

	Programa Nacional de Sanidad Apícola	Rige a partir de: 17/07/2012	Código: PNAPI-PV-003
	PROTOCOLO VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE NOSEMOSIS	Versión 01	Página 3 de 16
Elaborado por: Programa Nacional de Sanidad Apícola	Revisado por: Unidad de Epidemiología	Aprobado por: Director General	

12. CAPACITACIÓN AL SECTOR OFICIAL.....	15
13. EVALUACIÓN Y SEGUIMIENTO	15
14. CITAS BIBLIOGRÁFICAS	15

1. Introducción

OIE cita en el capítulo 2.9.4 que : “El microsporidio *Nosema apis* (Zander) es un parásito de la abeja melífera adulta que invade las células epiteliales del ventrículo. Las infecciones se adquieren por la entrada de las esporas durante la alimentación o limpieza”. Siendo esta la razón por la que se ha propagado tan rápido en el país y a afectado la producción de miel de abeja.

Luego de estudiar la conducta de la enfermedad en nuestro medio y de su repentina aparición en los cambio de estación, se ha desarrollado una estrategia de desinfección de materiales, cambio de pisos de colmenas y monitoreó al menos dos veces al año en los apiarios, estrategia que nos ha ayudado a bajar los niveles de infestación de la enfermedad, sin menos preciar la capacitación continua que se da a los productores apícolas año tras año.

2. Antecedentes

La detección de La *Nosema* en Costa Rica se reporta como problema desde 2009, se realizan los análisis por la metodología: Cornejo-Rossi. Y se descubren niveles de infestación muy elevados, por lo que se inicia un monitoreo en todo el país, existiendo niveles de infestación desde 12.000.000 de esporas por abeja.


En el 2006 el 70% de las colmenas muestreadas eran positivas a *Nosema*, para el 2010 como resultado de los análisis de vigilancia pasiva solo en las regiones Central Occidental y Atlántica no se reportaban problemas con la presencia de la enfermedad, siendo ambas regiones de nuestro país las que presentan menor población apícola.

3. Justificación

El desarrollo evolutivo ha hecho que las abejas sean los polinizadores por excelencia de diferentes especies vegetales, sin olvidar que existen otros medios de polinizar cultivos específicos y otras especies polinizadoras.

Esta relación es tan importante que en la actualidad las grandes plantaciones de cultivos como sandía, melón, chayote, fresas y moras, entre otros, requieren como parte de su paquete tecnológico de las abejas para poder alcanzar el éxito en la producción.

En Costa Rica se cuenta con aproximadamente 40.000 colmenas de las cuales un 20% se dedican a la polinización de cultivos y el restante se dedica a la producción de miel y polen productos que tienen una gran aceptación en el mercado nacional. En los últimos

	Programa Nacional de Sanidad Apícola	Rige a partir de: 17/07/2012	Código: PNAPI-PV-003
	PROTOCOLO VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE NOSEMOSIS	Versión 01	Página 4 de 16
Elaborado por: Programa Nacional de Sanidad Apícola	Revisado por: Unidad de Epidemiología	Aprobado por: Director General	

años la apicultura se ha convertido en una excelente alternativa para la producción de las zonas aledañas a las reservas, y se encuentra principalmente distribuida en manos de pequeños agricultores, significando un rubro importante en el ingreso familiar.

4. Ejecutores del protocolo


Será responsable de la ejecución de este protocolo el Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA) del Ministerio de Agricultura y Ganadería. En la tabla N°1 se resume el responsable de ejecución según la actividad involucrada.

Tabla N° 1 Ejecutores del programa según actividad y responsable de la ejecución

ACTIVIDAD	RESPONSABLE DE EJECUCION
Elaboración del protocolo de vigilancia	Programa Nacional de Apicultura (PNAPI) y la Unidad de Epidemiología
Recepción de denuncias de casos clínicamente compatible con LA	Direcciones Regionales y Técnicos del PNAPI.
Investigación y seguimiento de casos clínicamente compatible con LA	Direcciones Regionales y PNAPI
Toma de muestras	<ul style="list-style-type: none"> • Médicos Veterinarios y Técnicos del PNAPI. • Médicos Veterinarios Oficiales ubicados en puestos cuarentenarios.
Diagnóstico de laboratorio	Dirección de Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios (LANASEVE).
Aplicación de prohibiciones a las importaciones	Dirección de Cuarentena Animal en el nivel central y en los puestos cuarentenarios
Controles sobre la producción apícola	PNAPI y Direcciones Regionales

4.1. Elaboración del protocolo de vigilancia

Es responsabilidad del Coordinador(a) del PNAPI, junto con el representante designado por el consejo Epidemiológico del SENASA y con la supervisión del Director Técnico de La Unidad de Epidemiología; analizar y actualizar de ser necesario este protocolo cada año, después de la Asamblea General de la OIE o cuando por cambios en el status sanitario o cambios en la epidemiología de la enfermedad así lo requieran.

	Programa Nacional de Sanidad Apícola	Rige a partir de: 17/07/2012	Código: PNAPI-PV-003
	PROTOCOLO VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE NOSEMOSIS	Versión 01	Página 5 de 16
Elaborado por: Programa Nacional de Sanidad Apícola	Revisado por: Unidad de Epidemiología	Aprobado por: Director General	

4.2. **Recepción de denuncias de casos clínicamente compatible con Nosemosis**

Es responsabilidad de los funcionarios de las Direcciones Regionales, técnicos oficializados y técnicos del Programa Nacional Apícola de Extensión del MAG, recibir las denuncias de los casos con sintomatología compatible con Nosemosis, mediante el Registro de Notificación de Denuncia. Además de enviar al Médico Veterinario oficial encargado del sector y dar aviso al Coordinador(a) del PNAPI, de dicha denuncia, para su análisis.

4.3. **Investigación y seguimiento de casos clínicamente compatible con Nosemosis**

Es responsabilidad de los Médicos Veterinarios oficiales analizar la información de la denuncia y clasificarla según corresponda, si la denuncia clasifica para atención de caso deberá darle seguimiento a la misma.

Es responsabilidad del Técnico Apícola del Extensión y del Técnico Oficializado durante la visita proceder a realizar el examen clínico de las colmenas, que presentan sintomatología compatible con Nosemosis. Durante la visita deberá utilizar los formularios: Hoja de Visita y Registro de Información sobre Episodios de Enfermedades Agudas (EA1).

Es responsabilidad del Técnico Apícola de Extensión y del Técnico Oficializado que realizó la visita, entregar la información al Médico Veterinario encargado de la región que corresponda y al Coordinador(a) del PNAPI, para la incorporación y registro de los eventos y el Coordinador(a) del PNAPI deberá informar al Director Técnico de La Unidad de Epidemiología a través del informe semanal epidemiológico.

4.4. **Toma de Muestras**

La toma y el envío de la muestra de colmenas con sintomatología compatible con Nosemosis son responsabilidad de los Médicos Veterinarios Oficiales o del personal formado específicamente para ello (técnicos).


Para la toma de muestras se deben de colectar abejas adultas de la piquera, se colocan en un frasco que contiene alcohol de 70° o alcohol de fricciones de venta libre, se colectan unas 100 abejas.

4.5. **Diagnóstico de Laboratorio**

Es responsabilidad de la Dirección de LANASEVE, recibir la muestra y asignarle un número de identificación (protocolo), enviarla al Área Apícola del Laboratorio de Seguridad y emitir un diagnóstico.

4.6. **Aplicación de medidas sanitarias para evitar ingreso de la enfermedad, medidas de mitigación, prevención y control.**

Es responsabilidad de la Dirección de Cuarentena Animal a nivel central, establecer los controles necesarios con las importaciones de animales vivos, miel, productos y subproductos de origen apícola, para cumplir con las

	Programa Nacional de Sanidad Apícola	Rige a partir de: 17/07/2012	Código: PNAPI-PV-003
	PROTOCOLO VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE NOSEMOSIS	Versión 01	Página 6 de 16
Elaborado por: Programa Nacional de Sanidad Apícola	Revisado por: Unidad de Epidemiología	Aprobado por: Director General	

recomendaciones que en materia de Nosemosis emita la OIE y con la normativa nacional.

Es responsabilidad de los Médicos Veterinarios Oficiales, a nivel de los PIF, realizar la comprobación de los requisitos sanitarios exigidos a las mercancías de origen animal que sean importadas, para verificar que no sean mercancías con riesgo asociado para LA. De conformidad con el Código de Animales Terrestres del 9.2.5, 9.2.6, 9.2.7, 9.2.8.

5. Cobertura del protocolo

- Espacio: El Protocolo de Vigilancia Epidemiológica de Nosemosis abarcará todo el territorio de la República de Costa Rica
- Población: el Protocolo de Vigilancia de Nosemosis pretende abarcar las 40mil colmenas en todo el territorio nacional con sintomatología compatible con la enfermedad.
- Tiempo: La vigilancia de la enfermedad se realizara anualmente, dando énfasis en las épocas de mayor incidencia de su aparición.


6. Objetivos

Objetivos generales

Establecer las directrices para la Vigilancia Epidemiológica de Nosemosis con el fin de determinar las medidas que se requieren para la detección y prevención de la enfermedad.

Objetivos específicos

- Detectar la Nosemosis en los apiarios del país mediante la vigilancia epidemiológica en sus niveles de infección inicial.
- Establecer la prevalencia de esta enfermedad.
- Definir las medidas de control
- Definir factores de riesgos para reducir la probabilidad de presentación de esta enfermedad a los apiarios nacionales.

	Programa Nacional de Sanidad Apícola	Rige a partir de: 17/07/2012	Código: PNAPI-PV-003
	PROTOCOLO VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE NOSEMOSIS	Versión 01	Página 7 de 16
Elaborado por: Programa Nacional de Sanidad Apícola	Revisado por: Unidad de Epidemiología	Aprobado por: Director General	

7. Enfermedad a vigilar

Nosemosis

7.1. Agente etiológico


Hasta este momento se han descrito dos parásitos microsporidianos de las abejas: *Nosema apis* (Zander) y *Nosema ceranae* (Fries). *Nosema apis* es un parásito de la abeja europea (*Apis mellifera*) y *Nosema ceranae* lo es de la abeja asiática (*Apis cerana*) y de la abeja europea. Esta última se ha detectado recientemente en varias poblaciones de abejas europeas geográficamente separadas en Europa, Sudamérica, Norteamérica y Asia. No se conocen bien las consecuencias patológicas de *Nosema ceanae* en *Apis mellifera*.

Identificación del agente: En las formas agudas de la infección, en especial al inicio del verano, pueden detectarse en el panal y en el frontal de la colmena marcas fecales marrones. En la entrada de la colmena, se pueden observar abejas enfermas y muertas, aunque se deberían eliminar otras posibles causas, tales como el envenenamiento por pesticidas y enfermedades de las abejas adultas (como la acarapisosis) si este es el caso. La detección de estas enfermedades infecciosas requiere un examen microscópico. Durante el invierno, las colonias infectadas por *Nosema* pueden verse muy mermadas de abejas o totalmente extinguidas. La mayoría de las colonias infectadas por *Nosema* aparecerán normales, carentes de signos claros de la enfermedad incluso cuando esta sea suficiente para causar pérdidas significativas en los niveles de producción de miel y de eficiencia de la polinización. Solo se puede realizar un diagnóstico exacto mediante el examen microscópico del abdomen o ventrículo de la abeja adulta. Para diagnosticar una infección causada por *Nosema apis*, se extrae con unas pinzas el par posterior de segmentos abdominales para poner al descubierto el ventrículo completo con los tubos de Malpighi, el intestino delgado y el recto. Normalmente, el ventrículo es marrón pero, después de una infección por *Nosema*, puede volverse blanco y muy frágil. Sin embargo, esta apariencia puede ser debida a otras causas de problemas intestinales, por ejemplo, por alimentarse de depósitos de comida indigestos, tales como jarabe que contenga levaduras en crecimiento activo. Para un diagnóstico fiable, se aconseja examinar varias abejas en cada muestra.

7.2. Mecanismos de transmisión

El microsporidio *Nosema apis* (Zander) es un protozoo parásito exclusivo de las células epiteliales del ventrículo de las abejas adultas, y la enfermedad se presenta en todo el mundo. La infección se produce por la ingestión de esporas con el alimento, por la trofalaxis o quizás después de la limpieza de los pelos del cuerpo.

El tubo polar de la espora es evertido y penetra en la matriz peritrófica del intestino, en particular en la región posterior del ventrículo. El esporoplasma atraviesa el tubo y entra en el citoplasma de las células epiteliales, donde se

	Programa Nacional de Sanidad Apícola	Rige a partir de: 17/07/2012	Código: PNAPI-PV-003
	PROTOCOLO VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE NOSEMOSIS	Versión 01	Página 8 de 16
Elaborado por: Programa Nacional de Sanidad Apícola	Revisado por: Unidad de Epidemiología	Aprobado por: Director General	


reproduce. Pueden producirse autoinfecciones al mismo tiempo que nuevas infecciones. Después de un intervalo corto de tiempo, las esporas se desarrollan en grandes cantidades.

El parásito es ubicuo y se multiplica a una tasa específica a lo largo del año. Los niveles de *Nosema* aumentan cuando las abejas están confinadas, como sucede en invierno, cuando disminuye la cantidad de crías, y posiblemente a principios del verano, cuando se produce un aumento de la progenie. En invierno, rara vez aparecen esporas o solo se encuentran en abejas fuertemente infectadas.

Cualquier defensa natural inherente de una colonia de abejas frente a una infección fuerte por el parásito depende tanto del tamaño de la colonia como de las condiciones climáticas al comienzo del invierno del año previo. Si estas condiciones no son favorables, se reduce la esperanza de vida de la colonia. Esto puede conducir a la muerte prematura de las abejas durante el invierno o el inicio de la verano. En un caso típico de una colonia mermada debido a la infección por *Nosema*, se puede observar a la reina rodeada por unas pocas abejas, atendiendo confusamente a la progenie que ya está operculada.

En los excrementos, las esporas pueden permanecer viables durante más de 1 año. También pueden seguir viables durante más de 4 meses después de la inmersión en miel y durante más de 4,5 años en los cadáveres de las abejas infectadas. Las esporas pueden perder viabilidad después de tan solo 3 días al encontrarse sumergidas en miel a la temperatura de la colmena. Es probable que la contaminación fecal de la cera, en especial en los panales utilizados para la cría, o de otras superficies interiores de la colmena, proporcione suficiente inóculo para que *N. apis* se transmita con éxito a la nueva generación de abejas. La importancia relativa de las heces, la miel y los cadáveres como reservorio de las esporas infectivas no se comprende en su totalidad y parece que la temperatura puede tener un efecto marcado en las tasas a las que las esporas pierden viabilidad, independientemente del medio en que se encuentren.

Las esporas se pueden destruir calentando las herramientas y el equipamiento de la colmena a una temperatura de al menos 60°C durante 15 minutos. Los panales pueden esterilizarse calentándolos a 49°C durante 24 horas. Los vapores procedentes de una solución de ácido acético como mínimo del 60% inactivarán las esporas en unas pocas horas dependiendo de su concentración; concentraciones mayores son incluso más efectivas y destruirán las esporas en unos pocos minutos. Tales procedimientos se encuentran bajo la jurisdicción de las autoridades de control nacional, con protocolos que varían de un país a otro. Se puede llevar a cabo la desinfección, por ejemplo, colocando una solución de ácido acético en recipientes en esponjas empapadas en el líquido. Después de desinfectar un brote, se aconseja ventilar a fondo todos los panales durante al menos 14 días antes de su utilización. También se puede conseguir la supresión de la enfermedad por *Nosema* proporcionando a la colonia un antibiótico, la fumagilina en forma de jarabe de azúcar.

	Programa Nacional de Sanidad Apícola	Rige a partir de: 17/07/2012	Código: PNAPI-PV-003
	PROTOCOLO VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE NOSEMOSIS	Versión 01	Página 9 de 16
Elaborado por: Programa Nacional de Sanidad Apícola	Revisado por: Unidad de Epidemiología	Aprobado por: Director General	

8. Definición de caso

8.1. Caso sospechoso

En algunos casos agudos se observan marcas fecales marrones en el panal y en el frontal de la colmena, con abejas enfermas o muertas en sus proximidades. Sin embargo, la mayoría de las colonias no muestran signos claros de infección, incluso cuando la enfermedad es suficiente para causar pérdidas significativas en la producción de la miel y en la eficiencia de la polinización. En las abejas afectadas, el ventrículo, que es normalmente marrón, puede ser blanco y muy frágil.

En la entrada de la colmena, se pueden observar abejas enfermas y muertas, aunque se deberían eliminar otras posibles causas, tales como el envenenamiento por pesticidas y enfermedades de las abejas adultas (como la acarapisosis) si este es el caso.

8.2. Caso positivo

Colmenas con resultados positivos a pruebas diagnósticas confirmatorias, realizadas en un laboratorio de referencia.

8.3. Caso negativo

Colmenas con resultado negativo a pruebas diagnósticas confirmatorias realizadas en un laboratorio de referencia.

9. Estrategias para la vigilancia y seguimiento epidemiológico


9.1. Bases legales y reglamentarias

9.1.1. Competencia para aplicar medidas sanitarias sobre la actividad comercial:

El Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias (aprobado por Ley No. 7475, publicada en el Diario Oficial La Gaceta No. 245, Alcance No. 40, del 26 de diciembre de 1994), reconoce la potestad del Estado costarricense de adoptar las medidas necesarias para proteger la salud de sus habitantes y la de sus animales, entre otras. En igual sentido, la Ley de Ejecución de los Acuerdos de la Ronda Uruguay de Negociaciones Multilaterales (No. 7473 del 19 de diciembre de 1994), en su artículo 8, establece que corresponderá a los Ministerios de Salud y de Agricultura y Ganadería aplicar lo concerniente a las medidas sanitarias y fitosanitarias que incidan directa e indirectamente en el comercio.

9.1.2. Aplicación Obligatoria de Medidas Sanitarias:

La Ley General del Servicio Nacional de Salud Animal (No. 8495 del 16 de mayo de 2006) regula lo relativo a la aplicación de medidas sanitarias de prevención y control de las

	Programa Nacional de Sanidad Apícola	Rige a partir de: 17/07/2012	Código: PNAPI-PV-003
	PROTOCOLO VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE NOSEMOSIS	Versión 01	Página 10 de 16
Elaborado por: Programa Nacional de Sanidad Apícola	Revisado por: Unidad de Epidemiología	Aprobado por: Director General	

enfermedades. En éste sentido, declara de interés público y de aplicación obligatoria, las medidas sanitarias establecidas en la ley y todas aquellas que promueven el mejoramiento de la producción animal y su directa repercusión en la salud del hombre. Designa al Servicio Nacional De Salud Animal del Ministerio de Agricultura y Ganadería como la responsable de la ejecución de tales medidas.

9.1.3. **La declaración obligatoria de la enfermedad:**

El Reglamento para la Protección de la Industria Apícola No. 15563 MAG-S Artículo 2, da la lista de enfermedades de declaración obligatoria.

9.2. **Sistema de información y notificación**

9.2.1. **Reporte de sospechas de enfermedad:**

Los funcionarios de las Direcciones Regionales, técnicos apícolas de Extensión y técnicos oficializados, reciben las denuncias de los casos con sintomatología compatible con Nosemosis, mediante el Registro de Notificación de Denuncia (anexo 1) y envían al Médico Veterinario oficial encargado del sector dicha denuncia, para su análisis.

9.2.2. **Seguimiento de casos clínicamente compatibles con Nosemosis:**

El Médico Veterinario Oficial analiza la información de la denuncia y la clasifica según corresponda, si la denuncia clasifica para atención de caso procede a darle seguimiento a la misma.


Durante la visita procede a realizar el examen clínico de la colmena o las colmenas que presentan sintomatología compatible con Nosemosis. Durante la visita deberá utilizar los formularios: Hoja de Visita (anexo 2) y Registro de Información sobre Episodios de Enfermedades Agudas (EA1) (anexo 3).

9.2.3. **Toma y envío de muestras al Laboratorio:**

El Médico Veterinario Oficial o el personal formado específicamente para ello (técnicos), si se trata de colmenas vivas o muertas con sintomatología compatible con Nosemosis se procede a la toma y del envío de la muestra, de acuerdo a lo establecido en el Procedimiento para la toma y envío de muestras.

9.2.4. **Registro del evento:**

El Médico Veterinario Oficial y/o el técnico del SENASA, envía copia de la información recopilada al jefe del Departamento de Registro de la Dirección Regional que corresponda, para la incorporación y registro de los eventos en el informe epidemiológico semanal, así como otra copia al Coordinador(a) del PNAPI.

	Programa Nacional de Sanidad Apícola	Rige a partir de: 17/07/2012	Código: PNAPI-PV-003
	PROTOCOLO VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE NOSEMOSIS	Versión 01	Página 11 de 16
Elaborado por: Programa Nacional de Sanidad Apícola	Revisado por: Unidad de Epidemiología	Aprobado por: Director General	

9.2.5. Diagnóstico Laboratorial:

Es responsabilidad de la Dirección de LANASEVE, recibir la muestra y asignarle un número de identificación (protocolo), enviarla al Área Apícola del Laboratorio de Seguridad y emitir un diagnóstico.

9.2.6. Resultado Laboratorial:

El encargado del Área Apícola del Laboratorio de Seguridad, emite un resultado, el cual envía a la Unidad de Servicios Generales del LANASEVE.

9.2.7. Entrega de Resultados:

De reportarse el resultado sin la presencia del agente etiológico, la Unidad de Servicios Generales del LANASEVE, entrega o envía el resultado a la Dirección Regional donde corresponda y además entrega una copia al Coordinador(a) del PNAPI, para su archivo.

De reportarse el resultado con la presencia del agente etiológico, la Unidad de Servicios Generales del LANASEVE, comunica al Director General del SENASA, al Coordinador(a) del PNAPI, al Director Técnico de la Unidad de Epidemiología y a la Dirección Regional donde corresponda

9.2.8. Elaboración de informes y comunicación según el nivel que corresponda, a saber:

Reporte semanal de los funcionarios de las Direcciones Regionales y de los Técnicos al Director de cada región del país siguiendo los procedimientos e instrumentos definidos para este efecto.


El Coordinador(a) del PNAPI deberá informar al Director Técnico de La Unidad de Epidemiología a través del informe semanal epidemiológico.

9.3. Diseminación de la información:

9.3.1. Informes de seguimiento de sospechas y casos:

Una vez reportado el caso o la sospecha de la enfermedad es responsabilidad de la Dirección Regional solicitar el Coordinador del Programa Nacional Apícola como se debe proceder con el manejo del apiario o colmenas afectadas, ya sea con una cuarentena. Dichas medidas se aplicaran utilizando los formularios de cuarentena (DO-PG-003-XXX) y destrucción (DO-PG-003-XXX).

En vista que la nosemosis no es una enfermedad de declaración obligatoria (Decreto ejecutivo No.34669) no se procederá a realizar informe oficial de su diagnostico.

	Programa Nacional de Sanidad Apícola	Rige a partir de: 17/07/2012	Código: PNAPI-PV-003
	PROTOCOLO VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE NOSEMOSIS	Versión 01	Página 12 de 16
Elaborado por: Programa Nacional de Sanidad Apícola	Revisado por: Unidad de Epidemiología	Aprobado por: Director General	

9.3.2. Boletines informativos:

Cada vez que se de un reporte importante del diagnostico de nosemosis se procederá a realizar un reporte en la página oficial del SENASA.

10. Vigilancia epidemiológica

10.1. Tipo de vigilancia

10.2.1 Vigilancia Pasiva: La vigilancia pasiva de la enfermedad consiste, básicamente, en la detección de animales positivos debido a la comunicación por parte de veterinarios, técnicos o apicultores/responsables de las colmenas; de la aparición de colmenas con sintomatología clínica compatible con Nosemosis.

10.2.2 Vigilancia Activa: El programa de seguimiento activo, va encaminado a la búsqueda efectiva de la enfermedad, mediante el control periódico de las colmenas, cada cinco años.

11. Diagnóstico laboratorial

11.1. Laboratorios designados para el proceso de las muestras.

Laboratorio Nacional: El Servicio Nacional de Salud Animal ha designado al LANASEVE del SENASA.

Laboratorio de Referencia: En caso de ser necesario se enviará al Laboratorio de Loque Americana de la Unidad de Bacteriología del Centro de Investigaciones en Fitopatología (CIDEFI) calle 60 y 119 s/n c.c. 31, 1900 La Plata ARGENTINA.
Tel: (+54-221) 423.67.58 ext. 423 Fax: (+54-221) 425.23.46


11.2. Muestras:

Se deben coleccionar 100 abejas de la piquera en recipiente con alcohol.

11.3. Pruebas laboratoriales a utilizar para el diagnóstico de Nosemosis:

En la actualidad se utilizan las siguientes técnicas:


- Microscopio
- Gota pendiente modificada

	Programa Nacional de Sanidad Apícola	Rige a partir de: 17/07/2012	Código: PNAPI-PV-003
	PROTOCOLO VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE NOSEMOSIS	Versión 01	Página 13 de 16
Elaborado por: Programa Nacional de Sanidad Apícola	Revisado por: Unidad de Epidemiología	Aprobado por: Director General	

11.3.1. Descripción del método diagnóstico


11.3.1.1. Microscopio:

Es necesario tratar de distinguir entre una infección debida a *Nosema apis* y la causada por *Malpighamoeba mellificae* (19). Con bastante frecuencia existe un indicio de disentería en una infección por *Nosema apis*. En una infección por *M. mellificae*, puede haber diarrea, frecuentemente de un color amarillo sulfuroso y de un olor peculiar. Las características de los quistes de *M. mellificae* se describen más tarde. Pueden aparecer infecciones mixtas secundarias (17). Un método no cuantitativo y simple que permite detectar la infección debida a *Nosema apis* es como sigue: se debería obtener la muestra de abejas de la entrada de la colmena para evitar individuos de muestra de menos de 8 días, lo que conduciría a negativos falsos porque no se detectarían esporas a partir de los protozoos en cuestión. Se aconseja recoger al menos 60 abejas con el fin de detectar el 5% de las abejas enfermas con un 95% de confianza (10). Antes de enviarlas al laboratorio, estas abejas se deberían fijar en formol al 4%, en alcohol al 70% o congelarlas en un congelador estándar, para evitar que se descompongan y mejorar su recepción y organización en el laboratorio. Se separan los abdómenes de las abejas que van a ser examinadas y se mantienen en 2–3 ml de agua. Se colocan tres gotas de la suspensión en un porta bajo un cubre y se examinan a 400 aumentos en un microscopio de campo claro o de contraste de fases. Esta es una pequeña simplificación del método original de Cantwell (7). Las esporas miden aproximadamente 5–7 μm de largo y 3–4 μm de ancho. (*Nosema ceranae* es ligeramente más pequeña que *Nosema apis*). Son completamente ovaladas y poseen un contorno oscuro. No se pueden observar sus contenidos, que constan de núcleo, esporoplasma y tubo polar. Habitualmente no son necesarios los colorantes. Se deben diferenciar las esporas de *Nosema* de las levaduras, las esporas fúngicas, los cuerpos grasos y calcíferos y de los quistes de *M. mellificae*, que son esféricos y de un diámetro aproximado de 6–7 μm . Después de secar al aire, los frotis del tejido infectado fijados con etanol, se tiñen con la tinción de Giemsa (al 10% en tampón fosfato 0,02 M) durante 45 minutos. Las esporas de *Nosema apis* tendrán una apariencia característica, con paredes gruesas no teñidas y un interior azul sin rasgos distintivos y sin núcleo visible. Las células de los insectos, las esporas fúngicas y otros protozoos teñidos de esta forma generalmente aparecerán con paredes más delgadas, citoplasma azul/púrpura y núcleo de color magenta. Se debe utilizar un procedimiento estandarizado con el fin de obtener una cuantificación exacta, fiable y significativa de los niveles de infección por *Nosema* en las abejas melíferas. Un protocolo adecuado es el que se indica a continuación: Se toma una muestra de abejas obreras adultas y se maceran los abdómenes de 10 individuos en 5 ml de agua con un mortero. Cuando las piezas de tejido son suficientemente pequeñas, se filtra la suspensión a través de dos capas de gasa (fina tela de tejido flojo de algodón) colocadas en un embudo vertiéndolo en un tubo graduado de centrifuga. Se utilizan otros 5 ml de agua para lavar la mano de mortero, recoger el contenido del interior del mortero y verter la submuestra a través del embudo. Los niveles de agua se igualan en los tubos y las suspensiones se centrifugan durante 6 minutos a 800 g. Se decantan los sobrenadantes y los tubos se rellenan hasta alcanzar 10 ml. Utilizando pipetas desechables y un tetina de goma, se resuspenden los precipitados sedimentos mediante absorción y expulsión forzada a través de las puntas de las pipetas. Cuando parece que la solución se encuentra homogénea, se toma una muestra para llenar el volumen calibrado situado bajo un cubre de un hemocitómetro (cámara cuentaglobulos). Después de unos minutos, las esporas se instalan en el fondo

	Programa Nacional de Sanidad Apícola	Rige a partir de: 17/07/2012	Código: PNAPI-PV-003
	PROTOCOLO VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE NOSEMOSIS	Versión 01	Página 14 de 16
Elaborado por: Programa Nacional de Sanidad Apícola	Revisado por: Unidad de Epidemiología	Aprobado por: Director General	

de la cámara. Las esporas de *Nosema* aparecen transparentes pero con un contorno oscuro peculiar y son de un tamaño de 5–7 μm de largo y 3–4 μm de ancho. Se observan muy bien a 400 aumentos en un microscopio de campo claro o de contraste de fases. Se cuentan las esporas de cada cuadrícula. Si una espora se sitúa sobre el borde de una cuadrícula, solo se cuentan las que se sitúan en los bordes izquierdo y superior de la cuadrícula y no los que se encuentran en los bordes derecho e inferior. Una espora de *Nosema apis*, observada en el cuadro central completo (de 1 mm de área) de la rejilla del hemocitómetro (25 x 16 = 400 cuadros pequeños) equivale a una media de 10.000 esporas por abeja. Si no se observan esporas, el resultado debería considerarse como “no detectado”, pero, esto no significa que las abejas no estén infectadas. Los organismos reguladores correspondientes decidirán sobre el nivel de infección útil para sus propósitos. Existe un método de laboratorio para la detección simultánea de esporas de *Nosema* y quistes de *M. mellificae* consistente en el examen individual de las colonias utilizando 30–60 abejas por colonia. Se prepara una suspensión de los abdómenes de las abejas muertas macerándolos con 5–10 ml de agua; el volumen de agua depende del número y condición de las abejas. Se debe filtrar la suspensión para eliminar los residuos que interferirían en el examen, primero a través de un filtro de 100 μm y después a través de otro de 40 μm . Ciertas partes de los tubos de Malpighi pasan a través del filtro de 100 μm , pero se recogen en el de 40 μm . Se colocan en un porta o en una cámara de recuento de bacterias y se examinan a 400 aumentos. Después de una infección por *M. mellificae*, solo unos pocos tubos están llenos de quistes. En este caso no es visible la estructura normal de los tubos de Malpighi. Únicamente los quistes que se sitúan en el interior de estos tubos pueden considerarse como un resultado positivo, porque con frecuencia los quistes de *M. mellificae* se confunden con las esporas fúngicas y con las levaduras.

- 11.3.1.2. **Cultivo:** No existen métodos de cultivo para el crecimiento de estos microorganismos.
- 11.3.1.3. **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)** Se han desarrollado diferentes métodos para distinguir *N. apis* de *N. ceranae*. A continuación se describe una PCR múltiple por medio de la cual se pueden identificar claramente los dos patógenos al mismo tiempo.
- 11.3.1.4. **Preparación de la muestra para la PCR** Cada muestra de los abdómenes de 10–20 abejas adultas se macera en 10 ml de agua destilada (nivel de PCR), luego se filtra la suspensión y se centrifuga a 800 **g** durante 6 minutos. Para la extracción del ADN se induce la germinación de la espora con 200 μl de tampón de germinación recién preparado (0,5 M de cloruro sódico, 0,5 M de carbonato de hidrógeno sódico, pH a 6,0 con ácido ortofosfórico), y se incuba la mezcla a 37°C durante 15 minutos. La extracción del ADN puede realizarse fácilmente utilizando procedimientos rutinarios o kits comerciales, tales como el High Pure PCR Template Preparation Kit (No. 1796828 Roche Diagnostic).
- 11.3.1.5. **PCR Múltiple** Con esta técnica ambos microsporidiosis (*N. apis* y *N. ceranae*) pueden distinguirse en una única PCR debido al uso de cebadores específicos sin interferencia. Las reacciones de la PCR se realizan en volúmenes de 50- μl que contienen 5 μl de ADN molde, 25 μl de High Fidelity PCR Master Mixture (catalogo no. 12140314001; Roche Diagnostic), 0,4 μM de cada cebador, 0,4 mM de cada desoxinucleótido

	Programa Nacional de Sanidad Apícola	Rige a partir de: 17/07/2012	Código: PNAPI-PV-003
	PROTOCOLO VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE NOSEMOSIS	Versión 01	Página 15 de 16
Elaborado por: Programa Nacional de Sanidad Apícola	Revisado por: Unidad de Epidemiología	Aprobado por: Director General	

trifosfato, 3 mM de Cl₂Mg, 0,2 mg/ml de albúmina de suero bovino, 0,1% de Triton X-100 y 5 µl de ADN molde de *N. apis* o *N. ceranae*. Los parámetros para la amplificación son: un paso inicial de activación de la PCR de 2 minutos a 94°C seguido de 10 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 61,8° y 45 segundos a 72°C, y 20 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 61,8°C y 50 segundos a 72°C más un ciclo de alargamiento de 5 segundos para cada ciclo sucesivo y un paso de extensión final a 72° C durante 7 minutos. Los controles negativos (de la extracción del ADN) se incluyen en todos los experimentos de la PCR. Los pesos moleculares de los productos de la PCR se determinan por electroforesis en gel de agar TAE (Tris-acetato/ácido etilendiamino tetraacético) al 2% en tampón TAE estándar, teñido con bromuro de etidio y visualizado por iluminación UV.

11.3.1.6. **Pruebas serológicas** No se dispone de pruebas serológicas.

12. Capacitación al sector oficial

Todos los años se programa una serie de capacitaciones en manejo sanitario del apiario enfocado a todos los apicultores del país, también cada dos años se realiza un Congreso Nacional de Apicultura al que asisten los técnicos del sector oficial, siendo uno de los temas prioritarios la Patología Apícola dándose mucho énfasis a las características de las enfermedades en campo.

Además cada vez que el sector privado y el oficial promueven pasantías se realizan capacitaciones en todo el país y el tema de mayor relevancia son enfermedades por lo que traen expertos que visitan todo el país.


Existe una gran interacción entre el sector privado y el sector público por lo que las actividades de capacitación se realizan en conjunto.

13. Evaluación y seguimiento

Los apicultores realizan el monitoreo de la Nosemosis al menos dos veces al año y los resultados llegan de forma automática al encargado del Programa Apícola, para llevar el control de la vigilancia pasiva.

14. Citas Bibliográficas

1. OIE. 2004. Manual OIE sobre animales terrestres
http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.9.04
2. OIE. 2010. Lista de datos por enfermedad.
http://www.oie.int/esp/es_index.htm
3. Blanco. 1989. Informe de estudio epizootiológico sobre la incidencia de las enfermedades y plagas de las abejas melíferas efectuado en Costa Rica de marzo a agosto de 1989. Laboratorio de Salud Animal, MAG.
4. Cubero. 2009. Situación de la apicultura en Costa Rica y su importancia. SENASA.

	Programa Nacional de Sanidad Apícola	Rige a partir de: 17/07/2012	Código: PNAPI-PV-003
	PROTOCOLO VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE NOSEMOSIS	Versión 01	Página 16 de 16
Elaborado por: Programa Nacional de Sanidad Apícola	Revisado por: Unidad de Epidemiología	Aprobado por: Director General	