

Estandarización de la prueba de Anaplasma para Búfalos y Bovinos Mediante la técnica de PCR en el laboratorio de Biología Molecular de la Corporación Universitaria del Huila.

Daniela Hernández Romero

Cód. 5014114638

Madelym Rocío Peña Ramírez

Cód.5014114792

Corporación Universitaria del Huila – CORHUILA

Facultad de Medicina Veterinaria y Ciencias Afines

Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Neiva – Huila

2020

Estandarización de la prueba de Anaplasma para Búfalos y Bovinos mediante la técnica de PCR en el laboratorio de Biología Molecular de la Corporación Universitaria del Huila

Daniela Hernández Romero

Cód. 5014114638

Madelym Rocío Peña Ramírez

Cód.5014114792

Director

Wilmer Andrés Ramos Embus

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de Médico Veterinario
Zootecnista**

Corporación Universitaria del Huila – CORHUILA

Facultad de Medicina Veterinaria y Ciencias Afines

Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Neiva – Huila

2020

NOTA DE ACEPTACIÓN

Firma de jurado

Firma de jurado

DEDICATORIA

A Dios principalmente le dedico este trabajo realizado, ya que sin su Divina Voluntad yo no lo hubiera podido realizar, fue Él mi inspiración y quien me sostuvo en momentos difíciles de mi carrera. Gracias a Él por poner en mi vida de estudio personas que me ayudaron a ser lo que soy hoy. A mi preciosa Madre María Santísima por ser siempre mi intercesora, sin su auxilio no estaría yo viviendo este momento especial en mi vida.

También se lo dedico a mis padres Jesús Miguel y Yaneth, ellos fueron mi motivación y apoyo siempre, a pesar de momentos difíciles vividos durante mi proceso de formación como profesional, ellos estuvieron para mí sin juzgarme, y fue principalmente por ellos que me propuse a culminar mi carrera para hacerlos sentir felices y orgullosos de su hija.

A mi esposo Leonardo por acompañarme y motivarme en este proceso, y por ser mi voz de aliento en todo momento, puedo reconfirmar todos los días de mi vida que tomé la mejor decisión al convertirme en tu esposa.

A mi hijo Gabriel, quien llegó a mi vida en una etapa casi final de mi carrera y por supuesto se convirtió en el mayor motivo de mi logro. Eres mi regalo de Dios.

A mi Suegra Aura Doris, quien se convirtió en mi gran ayuda cuando nació mi hijo, ella me apoyó cuidando de él mientras yo culminaba mi carrera profesional. Cuanto le agradezco todo el amor y buena voluntad que siempre tuvo en cuidarlo para que yo pudiera estudiar.

Daniela Hernández Romero

Agradezco primeramente a DIOS por permitirme llegar hasta este punto de mi vida culminando parte de mis ciclos por emprender, seguidamente agradecer a mi Madre Alba Roció Ramírez Reyes por todos sus esfuerzos y luchas, por permitir cumplir hoy un sueño más que a la vez logramos las dos por lo cual quiero dedicártelo a ti con todo mi amor, por nunca dejar de ayudarme y apoyarme en cada paso que daba dándome la mano siempre que la necesite madre mía.

A mi padre Walther Peña Triana agradezco por estar siempre dispuesto ayudarme cuando más lo necesité dándome siempre los mejores consejos las palabras de aliento y el hacerme sentir la hija que siempre quise ser para ellos dos de la cual se pudieran sentir orgullosos.

A mi gran amor Jorge Andrés Montenegro Zamora agradecer de todo corazón por ser la persona tan maravillosa que ha sido en mi vida por apoyarme y ayudarme en cada paso que doy por darme esas palabras de aliento que necesite en cada momento y por ser el hombre que siempre espere. Siempre tuyo, siempre mío, siempre nuestro.

Finalmente, a las personas que conocí en el trascurso de mi carrera les agradezco no solo por estar presentes aportando buenas cosas a mi vida TAMP, sino por la gran felicidad y diversas emociones que me han brindado y que se quedaran guardadas en mi corazón. A.P.G.P.

MADELYM ROCÍO PEÑA RAMÍREZ

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios y a nuestros familiares por acompañarnos largo caminar. A nuestros maestros que siempre estuvieron con la mejor disposición de ayudarnos. Al profesor Wilmer Ramos Embus quien ha sido nuestro tutor y nos ha brindado todo su apoyo para lograr culminar este proyecto. A la profesora Paula Cárdenas por su buena disposición en guiarnos cuando se lo pedimos. También, a la Dra. Paola Barato, por su ayuda y asesoría. A Nataly Bacca que nos ayudó siempre de la manera más amable, y a CORPAVET por ser el laboratorio guía en la realización de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE ILUSTRACIONES	8
RESUMEN.....	10
1. INTRODUCCIÓN	12
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. OBJETIVOS.....	16
4.1 Objetivo General.....	16
4.2 Objetivo Específico.	16
5. Antecedentes:.....	17
5.0 FUNDAMENTO TEÓRICO.....	19
5.1. Anaplasmosis	19
5.1.2. Proceso de infestación de la bacteria en el torrente sanguíneo.....	20
5.1.3. Patología y Diagnóstico.....	21
5.2.2 Métodos indirectos	27
5.4 Tratamiento.	28
6. METODOLOGÍA	31
6.1. Ubicación del área de estudio.....	31
6.4 Población y muestra:	31
6.5 Equipos y materiales:	32
6.5.1 Equipos:	32
6.5.2 Materiales:.....	33
• Puntas de micropipeta de 1-10, 20-200 y 100-1000µl.	33
Para realizar la prueba de PCR se tuvieron en cuenta los siguientes pasos:	34
6.6.1. Extracción de DNA:.....	34
6.6.2. Amplificación de DNA:.....	34
6.6.3. Electroforesis	40
7. RESULTADOS	43
9. CONCLUSIÓN	49

LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Identificación del Anaplasma en los eritrocitos a través del microscopio.....	22
Ilustración 2. Muestra de orina con presencia de hematuria. Fuente: Ramos 2019.....	22
Ilustración 3. Cámara de electroforesis (fotos autor).....	25
Ilustración 4. Visualización interna y externa del visualizador o fotodocumentador. Fuente: autor	26
Ilustración 5. Toma de sangre periférica en la oreja y toma de sangre en la vena coccígea	32
Ilustración 6. Reactivos. (Fotos autor)	33
Ilustración 7. Extracción de ADN. (Fotos autor)	34
Ilustración 8. Termociclador convencional. Fuente autor.....	40
Ilustración 9. Visualización muestra para control positivo.	43
Ilustración 10. Se repite la prueba con la concentración de primer 0,5 μ M.	43
Ilustración 11. Visualización muestra para control positivo.	45
Ilustración 12. Visualización muestra para control positivo.	45
Ilustración 13. Visualización muestra para control positivo. FUENTE AUTOR.....	47

LISTA DE TABLAS

Pag

Tabla 1. Primers utilizados para la estandarización de PCR para <i>Anaplasma marginale</i>	35
Tabla 2. Preparación del master mix (por reacción: volumen final 25 µl contando 1ul del ADN de la muestra que se adiciona al final en cada tubo de reacción).....	36
Tabla 3. Control negativo y positivo de la muestra.	38
Tabla 4. Protocolo de amplificación	39
Tabla 5. ANALISIS BIOLOGIA MOLECULAR – Detección del genoma de <i>Anaplasma</i> spp en búfalo	44
Tabla 6. ANÁLISIS BIOLOGÍA MOLECULAR-Detección del genoma <i>Anaplasma</i> spp en bovinos.	46

RESUMEN

El PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), es una técnica molecular para ampliar uno o pocos segmentos de ADN, en cientos o millones de copias de una secuencia específica de ADN. Tiene alta sensibilidad y especificidad, que favorece la obtención de información confiable (**Barato, sf**). Esta técnica es usada para confirmar algún tipo de enfermedad, en este caso la Anaplasmosis causada por la bacteria *Anaplasma Marginale*, siendo una de las principales enfermedades bacterianas que afecta a bovinos, ovinos, caprinos, búfalos y algunos rumiantes salvajes, se caracteriza por hipertermia, ictericia y anemia.

Con un diagnóstico temprano y preciso de las diversas patologías se puede llegar a reducir las infecciones bacterianas o las causadas por virus, logrando también un control y una prevención adecuada para evitar el rápido desarrollo de signos clínicos críticos. Los métodos de diagnóstico que se hace empíricamente incluyen la observación de signos clínicos, pero para tener un diagnóstico acertado es ideal hacer una evaluación a los problemas sanitarios del sistema de producción, el análisis de sangre periférica (tomada de los capilares en la oreja), vena coccígea y central (tomada de la vena yugular), aislamiento microbiológicos, identificación bioquímica de las bacterias, análisis molecular, entre otros requeridos para poder tener una visión general sobre la causa de la enfermedad. El presente trabajo buscó la Estandarización de la prueba de *Anaplasma Bovina* mediante la técnica de PCR en muestra de Sangre.

Palabras clave:

Anaplasmosis, gen, sangre periférica, PCR

ABSTRACT

The PCR (Polymerase Chain Reaction), is a molecular technique to expand one or few segments of DNA, in hundreds or millions of copies of a specific DNA sequence. It has high sensitivity and specificity, which favors obtaining reliable information. **(Barato, sf)**. This technique is used to confirm some type of disease, in this case Anaplasmosis caused by the *Anaplasma Marginale* bacteria, being one of the main bacterial diseases that affects cattle, sheep, goats, buffaloes and some wild ruminants, it is characterized by hyperthermia, jaundice and anemia.

With an early and accurate diagnosis of the various pathologies, bacterial infections or those caused by viruses can be reduced, also achieving adequate control and prevention to avoid the rapid development of critical clinical signs. The diagnostic methods that are empirically made include the observation of clinical signs, but to have an accurate diagnosis it is ideal to make an evaluation of the health problems of the production system, the analysis of peripheral blood (taken from the capillaries in the ear), coccygeal and central vein (taken from the jugular vein), microbiological isolation, biochemical identification of bacteria, molecular analysis, among others required to have an overview of the cause of the disease. The present work sought the Standardization of the Bovine *Anaplasma* test using the Blood sample PCR technique.

Keywords:

Anaplasmosis, gene, peripheral blood, PCR.

1. INTRODUCCIÓN

Según el ICA, la población bovina en el país en 2017 es de 23.5 millones de cabezas, distribuidas en 514 mil 794 predios. Los departamentos con mayor hato bovino son: Antioquia (11,75 %), Córdoba (8,74 %), Casanare (7,93 %), Meta (7,38 %), Caquetá (6,33 %), Santander (6,14 %) Cesar (5,56 %), Magdalena (5,13 %) y Cundinamarca (4,88 %). Estos 8 departamentos agrupan el 63,84 % de la población total nacional (Ganadero, 2017).

Según Fedegan (2018) seccional Huila, en el Departamento del Huila, existen 433.816 cabezas de ganado bovino. Estos animales son susceptibles a diversas enfermedades, por diversos parásitos externos, como lo son las garrapatas, que se reproducen en clima tropical y húmedo, éstas son vectores responsables de la transmisión de diferentes hemoparásitos, como *Anaplasma*, *Babesia* y *Tripanosoma*.

Para el diagnóstico, la prueba más utilizada es la visualización al microscopio de frotis de sangre con tinción de giemsa, este método diagnostica animales enfermos, sin embargo no es efectiva si el animal está en la fase crónica o si el animal está en estado de parasitemia bajo el cual no es detectado con facilidad en dicha muestra (**Visser E A. R., 1987**).

Este microorganismo se localiza dentro de los glóbulos rojos, tiene forma esférica, cuyo tamaño oscila de 0,2 a 1 micra .Esta enfermedad se transmite principalmente por garrapatas *Ixodes*, *Boophilus microplus* y *Amblyomma*, la transmisión también puede llegar a ser mecánica , que se da a partir de la inoculación directa de eritrocitos infectados a través de dípteros hematófagos ; tales como algunos géneros de moscas *Stomoxys calcitrans*, mosquitos *Siphona spp* y tábanos *Tabanus spp*. A diferencia de la transmisión biológica que se produce a través de diferentes especies de garrapatas de la familia *Ixodidae* ,especialmente por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *Dermacentor spp*. Este medio de transmisión se da

cuando la garrapata infectada se alimenta del huésped bovino y lo contagia por medio de la saliva Scheiler et al 2017 citados por **(Herrera, sf)**. Los animales jóvenes no son tan propensos, debido a la inmunidad adquirida que se da de forma natural. Los animales adultos son los más susceptibles a dicha enfermedad.

La bacteria llega a infectar 70% de los eritrocitos. La anemia es un signo clínico visible al cuarto día después del máximo de parasitemia. **(Ecured, sf)**.

Uno de los métodos de diagnóstico para esta enfermedad es el PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), es una técnica molecular para ampliar uno o pocos segmentos de ADN, en cientos o millones de copias de una secuencia específica de ADN. Tiene alta sensibilidad y especificidad, que favorece la obtención de información confiable. (Barato, sf).

Es por consiguiente que en el presente trabajo se pretende estandarizar la técnica de PCR en el laboratorio de Biología Molecular de la Corporación Universitaria del Huila para la detección de *Anaplasma Marginale* en muestra de sangre.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La prueba para diagnóstico de *Anaplasma Marginale* en animales usada con más frecuencia es el realizado en frotis de sangre, donde se puede observar la bacteria dentro del eritrocito, pero no es efectivo en animales asintomáticos, puesto que no es necesario hacer el extendido en placa ya que el animal no presenta ningún signo, y en caso de realizar el extendido, en el microscopio se observarán pocos eritrocitos con la bacteria. Por ende la Anaplasmosis se convierte en un problema para el ganadero para su diagnóstico en fases asintomáticas o cuando la enfermedad es crónica, lo que genera, una disminución en la producción conllevando a pérdidas económicas por disminución en la producción de leche y ganancias de peso en la etapa de levante y engorde. La morbilidad es alta y la mortalidad depende de la receptividad y susceptibilidad del ganado, y puede ser de hasta el 30% (Bernal & Olguín, sf). Lo anterior que se requiere implementar la técnica que garantice un diagnostico efectivo siendo PCR la prueba que determina la presencia del agente mediante la presencia de su material genético.

3. JUSTIFICACIÓN

Al realizar la estandarización de la técnica de PCR para *Anaplasma* en búfalos y bovinos en el departamento del Huila se tiene un recurso adicional para confirmar el diagnóstico de la enfermedad lo que repercute en el tratamiento de la misma y un mejor desempeño en el hato. Se minimizaran los costos en los tratamientos favoreciendo la economía de los ganaderos y lograr un control efectivo de la enfermedad para disminuir las pérdidas productivas y económicas que esto conlleva en el hato.

Los métodos diagnóstico utilizados en la actualidad son : visualización al microscopio de frotis de sangre teñidos con Giemsa, hibridación de ácidos nucleicos, ensayos serológicos, fijación del complemento, pruebas de aglutinación, inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos (IFI) ELISA, sin embargo cada una de ellas tienen una pequeña falencia para dar un diagnóstico 100% efectivo, por otro lado la prueba de PCR si logra tener un alto porcentaje de sensibilidad y especificidad de un 99%. **(Corona, y otros, 2014).**

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Estandarizar la técnica de PCR en el laboratorio de Biología Molecular de la Corporación Universitaria del Huila para la detección de *Anaplasma Marginale* en muestra de sangre.

4.2 Objetivo Específico.

- ✚ Comparar la identificación del ADN, mediante muestras tomadas de sangre periférica, y de venas centrales (yugular y coccígea).
- ✚ Diseñar e implementar el Procedimiento Operativo Estándar (POE) para el diagnóstico de *Anaplasma Marginale*.

5. Antecedentes:

Según **(Kocan, de la Fuente, Blouin, Coetzee, & Ewing, 2010)** “plantean que se han desarrollado métodos de diagnóstico basados en el ADN para identificar la infección por *Anaplasma*, pero en la actualidad los ensayos serológicos basados en las MSPs se mantienen como los más prácticos, determinando la infección en un gran número animales.

Por otra parte, **(Reinbold, Coetzee, Sirigireddy, & Ganta, 2010)** plantean que el ensayo de PCR en tiempo real mejora los estudios epidemiológicos de la anaplasmosis en los hatos ganaderos donde no hay conocimiento de la infección.

Según **(Corona, y otros, 2014)** aplicó el método de PCR en tiempo real para el diagnóstico de *Anaplasma marginale*, encontrando animales infectados no sintomáticos, lo que garantiza la sensibilidad de la prueba.

Estudios realizados por **(Torioni, Knowles, McGuire, Palmer, Suarez, & McElwain., 1998)** logró diagnosticar *Anaplasma* mediante la técnica de PCR, aplicando El gen msp5. El mismo proceso aplicó **(Palmer & McElwain., 1995)** Palmer y McElwain.(1995) evaluando la expresión del gen msp5.

La sensibilidad y especificidad del PCR resultan de gran valor para la identificación de patógenos. desarrollaron un PCR múltiple para la detección de *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* a partir de sangre de bovinos. Corona y Martínez 2011 citado por **(González, y otros, 2014)**, realizaron la detección de *Anaplasma marginale* en bovinos sin síntomas clínicos de la enfermedad utilizando la amplificación por PCR del gen msp5 de este hemoparásito. Por otra

parte, según Reinbold et al 2010 citado por **(González, y otros, 2014)** plantean que el ensayo de PCR en tiempo real puede mejorar los estudios epidemiológicos de la anaplasmosis en las poblaciones ganaderas donde se desconoce del estado de la infección.

5.0 FUNDAMENTO TEÓRICO

5.1. Anaplasmosis

La Anaplasmosis se clasifica dentro del Orden Rickettsiales, Familia Anaplasmataceae, Género *Anaplasma*. Es una enfermedad infecto-contagiosa que afecta a bovinos, ovinos, caprinos, búfalos y algunos rumiantes salvajes, causada por *Anaplasma Marginale*. Esta enfermedad se caracteriza por mostrar signos clínicos particulares como hipertermia, anemia, Inapetencia, trémores, debilidad, produce importantes pérdidas económicas, abortos y muertes. Es común encontrar esta enfermedad en climas tropicales y subtropicales. La transmisión también puede llegar a ser mecánica, ya sea por intermedio de moscas, tábanos e incluso por el mismo hombre. Los animales jóvenes no son tan propensos, debido a la inmunidad adquirida que se da de forma natural. Los animales adultos son los más susceptibles a dicha enfermedad .(Ecured, sf).

La *Anaplasma Marginale* es una bacteria, que se reproduce mediante divisiones binarias. Llega al torrente sanguíneo, penetrando el glóbulo rojo por endocitosis; allí ocurre una invaginación de la membrana celular del eritrocito y posteriormente la formación de una vacuola alrededor del anaplasma. El microbio puede entrar o salir de la célula hospedera sin destruirla, donde comienza su multiplicación y a partir de la tercera a quinta semana se puede evidenciar en el extendido sanguíneo siendo este el periodo prepatente de la enfermedad. Luego viene un período patente, donde el parásito se multiplica masivamente, infectando el 70% de los eritrocitos. El *Anaplasma* abandona los eritrocitos por exositos sin destruirlos, afectando luego a otros glóbulos rojos, lo que genera que el animal desarrolle

suficientes anticuerpos circulantes. El sistema inmunológico del bovino, identifica como extraños a los eritrocitos infectados removiéndolos en grandes cantidades, generando luego una anemia hemolítica. El oxígeno disminuye en todo el organismo, ocurriendo a su vez la liberación de pigmentos presentes en los eritrocitos (bilirrubina), lo que genera debilidad e ictericia. El bazo es uno de los principales órganos que participan en el control de la infección, por ende su tamaño aumenta (esplenomegalia). (Bernal & Olguín, sf)

5.1.2. Proceso de infestación de la bacteria en el torrente sanguíneo

La *A. marginale* es transmitida por garrapatas *Ixódidas*. La bacteria *A. marginale* invade y coloniza el epitelio del intestino medio de la garrapata mediante un proceso mediado por receptores en el que participa la proteína MSP1a, o por un proceso de fagocitosis más generalizada. Dentro de las células epiteliales del intestino medio de la garrapata, la bacteria se replica dentro de vacuolas intracelulares formando colonias, luego, entra en la hemolinfa y posteriormente invade las células epiteliales de la glándula salival. Para que la infectividad sea exitosa, se requiere de una replicación final de hasta 10 organismos por glándula salival. Cuando la garrapata inicia la alimentación, ocurre la inoculación de *A. marginale* con la saliva en el huésped susceptible. (Brayton & A, 2012).

Estos hemoparásitos (*Anaplasma*) infectan los glóbulos rojos, tiene forma esférica y su tamaño es de 0,2 a 1 micras. Los resultados clínicos de la enfermedad ocurren por la destrucción progresiva de las células rojas de la sangre y el desarrollo de la anemia grave, presentando inapetencia siendo sus membranas mucosas muy pálidas y, a veces de color amarillo. Las vacas preñadas pueden abortar. Los brotes más graves de la enfermedad se producen cuando bovinos

adultos no infectados se introducen en una región con la anaplasmosis y se infectan. El período de incubación suele ser de 2 a 4 semanas, pero puede ser más largo. (Bernal & Olguín, sf)

La anaplasmosis es casi siempre una enfermedad del ganado bovino adulto. Los Animales menores de dos años de edad pueden ser infectados, pero suelen ser resistentes a desarrollar signos clínicos de la enfermedad. El ganado *Bos indicus* parece ser más resistente a la enfermedad. La mayoría de los animales que están infectados con *Anaplasma* y sobreviven, se convierten en portadores crónicamente infectados convirtiéndose en un reservorio sin signos clínicos donde se mantiene la bacteria. Las garrapatas que se alimentan de estos animales reservorios, pueden transmitir las bacterias a otros animales sanos, también el uso de una sola aguja para inyectar varios animales, puede distribuir la enfermedad. (Sano, sf)

5.1.3. Patología y Diagnóstico

Para el respectivo diagnóstico se debe tener en cuenta los signos clínicos que presenta el animal, ya sea anemia, anorexia, fiebre entre otros. Con la sospecha de la posible enfermedad en el animal, se procede a realizar exámenes para confirmar la enfermedad.

La prueba diagnóstica más común es el hemograma, donde se podrá observar valores bajos de hematocrito, recuento bajo de glóbulos rojos y posteriormente se podrá observar a través del microscopio la bacteria en forma de punto dentro de los eritrocitos, como se ve en la Ilustración 1.

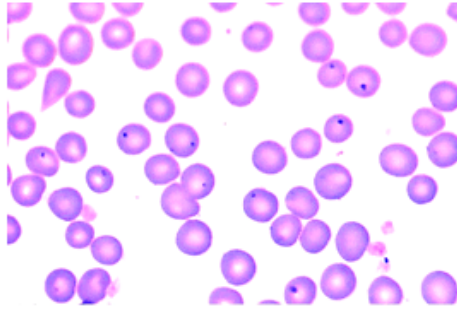


Ilustración 1. Identificación del Anaplasma en los eritrocitos a través del microscopio.

Fuente: Muñoz 2017.

Dentro de los signos clínicos detectados en un animal infectado por anaplasma, está la hemoglobinuria , el cual consiste en la presencia de orina roja que al momento de dejarla en reposo se decantan los eritrocitos como lo muestra la Ilustración 2.



Ilustración 2. Muestra de orina con presencia de hematuria.

Fuente: Ramos 2019.

Dentro de las herramientas más usadas para el diagnóstico de la enfermedad se encuentran:

5.1.3.1 Frotis de sangre

Es una Técnica diagnóstica muy usada para la identificación del *A. marginale* en animales infectados. (OIE), 2008). Hay que resaltar que cuando el animal está en la fase crónica o en el estadio de portador no expresa un elevado nivel de parasitemia como para ser detectado por la tinción (Cruz, 2019) .Para realizar esta técnica Se toma una gota de sangre del animal posiblemente infectado, esta sangre puede ser de la oreja o de la vena coccígea , y se hace el extendido en el porta objeto, luego se tiñe con giemsa por 5 minutos, se lava y se deja secar, una vez seco se procede a observar en el microscopio comenzando por el de menor objetivo 4x hasta llegar al de mayor objetivo de 100x, logrando visualizar el *A. marginale* dentro del eritrocito . Protocolo usado en el laboratorio Ladivet.

5.1.3.3 Hibridación de ácidos nucleicos

La hibridación de ácidos nucleicos, es una prueba sensible y específica para el diagnóstico. Esta prueba no permite la detección de portadores sanos con bajos niveles de parasitemia,

La sensibilidad de este ensayo resultó útil para la detección de garrapatas y ganado infectado, además de determinar la prevalencia e incidencia de garrapatas infectadas en áreas enzoóticas .

Esta prueba no confirma la enfermedad. (González, y otros, 2014).

5.1.3.4. Extracción de DNA

Se le llama extracción al método por el cual se obtiene el ADN a partir de material biológico.

La extracción consiste en la separación y purificación del ADN con el fin de poder analizarlo para posteriormente diagnosticar o confirmar la enfermedad (Rojas, 2016)

5.1.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa

Reactivos para la PCR

Solución de Stock Consiste en reconsistir los primers para tener una “solución madre” a lo que se diluye convenientemente con el fin de obtener luego una solución de trabajo para luego entregar al Master Mix la cantidad adecuada de primer. (misiones)

Master Mix: es una solución que contiene todos los elementos que requiere la Polimerasa para sintetizar el DNA, los elementos son: $MgCl_2$ (es un cofactor de la enzima), primers ,dNTP's en exceso y la enzima Taq polimerasa. Luego de tener list este “Master Mix” (MEZCLA MAESTRA) se reparten en los tubos correspondientes el DNA matríz y se le adiciona la Master Mix, para luego llevarlos al termociclador. (misiones).

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática in vitro que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos, siendo la secuencia blanco fielmente copiado. (Tamay, Ibarra, & Velasquillo, 2013). Cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, anillamiento y extensión.

1. **Desnaturalización.** En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado.

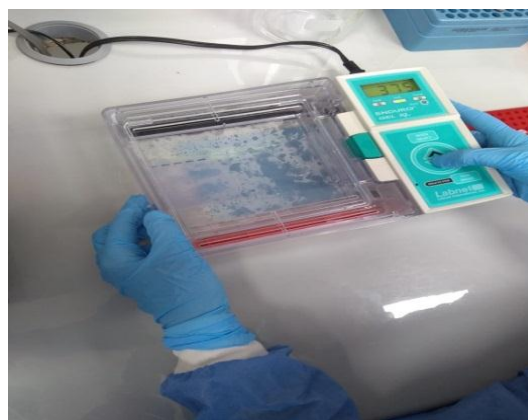
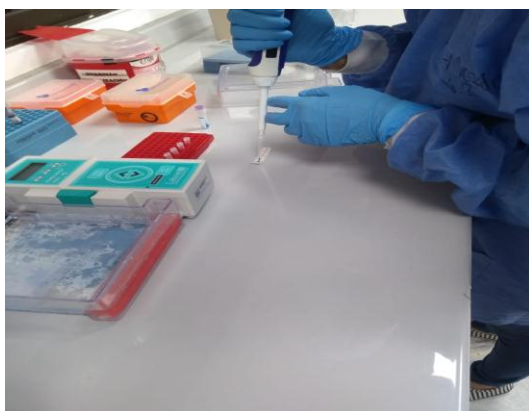
Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso.

2. **Anillamiento.** En esta etapa, los primers se alinean al extremo 5' 3' del templado previamente separado y se anillan con su secuencia complementaria. Para que suceda el templado-primers, es importante que la temperatura sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C.
3. **Extensión .** En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers ,agregando dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C . Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones.

Electroforesis

Para llevar a cabo la electroforesis se debe preparar un gel agarosa que requiere de 4 reactivos:

1. Agarosa, grado molecular.
2. Buffer TBE 10 X (comercialmente disponible por AM LTDA., Ref.: 002947).
3. EZ-Vision® Three, DNA Dye como buffer de carga 6 X (comercialmente disponible por Gentech Biosciences, Ref.: N313-Kit).
4. Marcador de peso molecular de 1Kb.



3. Cámara de electroforesis (fotos autor)

- **Visualización o fotodocumentador**

Para lograr observar los resultados en el carril de imagen, se debe colocar el gel de agarosa en la parte central del vidrio que está ubicado en la base del fotodocumentador como se observa en la siguiente ilustración. (Bacca, 2010)

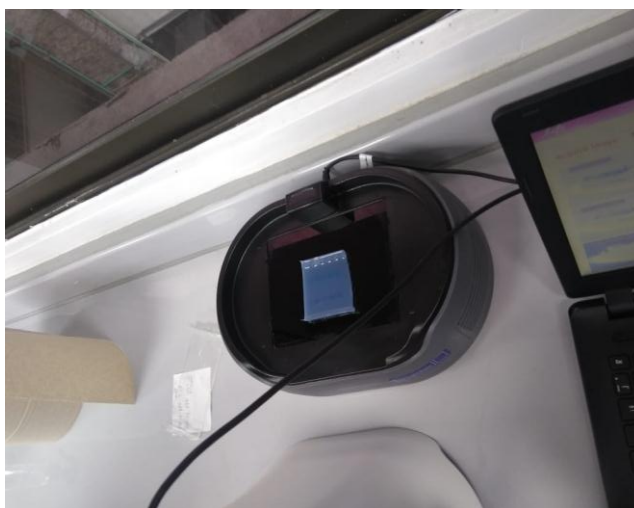
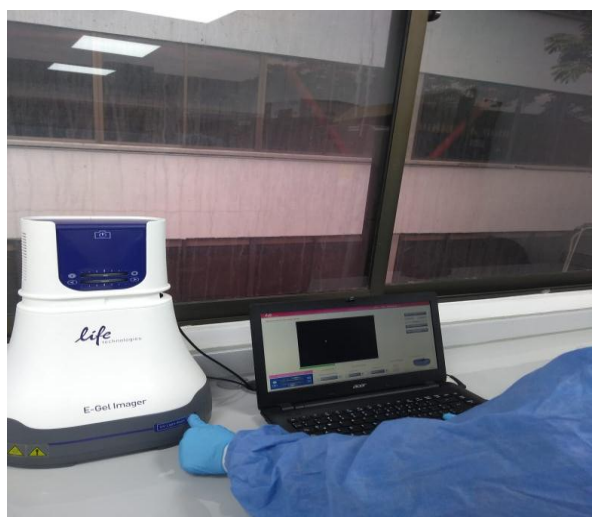


Ilustración 4. Visualización interna y externa del visualizador o fotodocumentador.
Fuente: autor

5.2.2 Métodos indirectos

Son aquellos que se realizan no con el diagnóstico del aislamiento del organismo patógeno, sino por la presentación específica de las alteraciones que genera este en su hospedador como la presencia de títulos de anticuerpos. (navarra, 2019).

5.2.2.2 Fijación del complemento

Esta prueba tiene sensibilidad baja y tiene errores por su limitada habilidad para detectar bajos niveles de anticuerpos, es utilizada como una prueba de monitoreo, en algunos casos es diagnosticado como negativo, porque no detecta anticuerpos contra *A. marginale* en animales portadores. (González, y otros, 2014).

5.2.2.3 Pruebas de aglutinación

Esta prueba la hay en tubos capilares y es rápida en placa es de bajo costo, sencilla y con rápidos resultados, esta técnica puede ser desarrollada en el laboratorio o en el campo, dando el resultado en muy pocos minutos. Si los títulos de anticuerpo son bajos no se observan aglutinaciones (González, y otros, 2014)

5.2.2.4 Inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos (IFI)

Esta prueba se ha utilizado para el diagnóstico de anaplasmosis y se ha considerado una prueba sensible; pero por el largo periodo de incubación de la enfermedad ocurre a veces reacciones falsas positivas por lo que se considera no útil. (Corona, y otros, 2014).

5.2.2.5 ELISA:

Se han desarrollado pruebas ELISA para identificar anticuerpos contra *A. marginale* en suero bovino . ELISA es una prueba sensible, específica que brinda la posibilidad de una mejor interpretación de los resultados. El uso de la proteína MSP5 como antígeno ha mostrado buenos resultados en la detección de diferentes especies del género *Anaplasma* . se han desarrollado técnicas de diagnóstico utilizando anticuerpos monoclonales y antígenos recombinantes para mejorar los parámetros de sensibilidad y especificidad de estos ensayos (**González, y otros, 2014**).

5.4 Tratamiento.

Los animales con signos clínicos deben ser manejados con cuidado para impedir su muerte. Si el resultado del hematocrito es inferior al 15% se recomienda una transfusión de sangre. Para el tratamiento de anaplasmosis se recomienda utilizar Oxitetraciclina (Dosis de 6-10 mg/kg hasta 3 días) o Tetraciclina de larga acción (Dosis de 20 mg/kg por vía intramuscular). También se puede administrar Imidocarb a la dosis de 3mg/kg. Para prevenir la enfermedad, se recomienda la administración de 20mg/kg de Tetraciclina de larga acción cuya protección es de 28 días. Puede ser necesario repetir la dosis a los 28 días para mantener a los animales protegidos. Si los animales están siendo racionados o suplementados con sales minerales se puede agregar Tetraciclina (Dosis: 1,1 mg/kg) diariamente en el alimento (Miraballes & Amaral, 2017).

ESTANDARIZACIÓN DE PCR

Es la realización de unos para llevar a cabo un procedimiento, para la estandarización de PCR del presente trabajo se realizaron los siguientes pasos:

En la recolección de muestra de bovinos y búfalos se tomaron de la sangre periférica y coccígea, en tubo tapa lila con EDTA, posteriormente se refrigeraron hasta llegar al laboratorio para ser procesadas.

En el laboratorio, se realizó la extracción del ADN y posteriormente se hizo la amplificación que consta de 3 pasos:

Desnaturalización. En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso.

Anillamiento. En esta etapa, los primers se alinean al extremo 5' 3' del templado previamente separado y se anillan con su secuencia complementaria. Para que suceda el templado-primers, es importante que la temperatura sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C.

Extensión . En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers ,agregando dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C . Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones.

ELECTROFORESIS

Para llevar a cabo la electroforesis se debe preparar un gel agarosa que requiere de 4 reactivos:

1. Agarosa, grado molecular.
2. Buffer TBE 10 X (comercialmente disponible por AM LTDA., Ref.: 002947).
3. EZ-Vision® Three, DNA Dye como buffer de carga 6 X (comercialmente disponible por Gentech Biosciences, Ref.: N313-Kit).
4. Marcador de peso molecular de 1Kb.

VISUALIZACIÓN O FOTODOCUMENTADOR

Para lograr observar los resultados en el carril de imagen, se debe colocar el gel de agarosa en la parte central del vidrio que está ubicado en la base del fotodocumentador como se observa en la siguiente ilustración

6. METODOLOGÍA

6.1. Ubicación del área de estudio

El presente trabajo, es un estudio de tipo aplicado, de tipo no experimental, cualitativo y cuantitativo. Se desarrolló en el laboratorio de Biología Molecular de CORHUILA sede quirinal Neiva. Localizado a 442 msnm con temperatura de 38 c° con una precipitación de 17%.

Las muestras de búfalos fueron tomadas en Montería Córdoba Localizado a 18 msnm con una temperatura 31c° y una precipitación de 2%

Las muestras de bovinos fueron tomadas en Rivera Huila localizado a 700 msnm con una temperatura de 30c° y una precipitación de 17% . (company, 2020)

6.4 Población y muestra:

Se analizaron 27 muestras de sangre (7) bovinos y (20) de búfalos, las primeras fueron tomadas al azar de un grupo de bovinos pertenecientes a la granja experimental CORHUILA en el municipio de Rivera-Huila. Las segundas se tomaron de un pull de 50 muestras de sangre bufalina, pertenecientes al trabajo realizado en conjunto con la Universidad de Córdoba, para el diagnóstico de hemoparásitos mediante la técnica de PCR .A continuación las ilustraciones de toma de muestra.

Para la estandarización de la prueba de PCR de *A. marginale* en búfalos y bovinos primero se corroboró el diagnóstico de animales positivos mediante la técnica de extendido en placa para luego llevar a cabo el PCR. La sangre periférica fue tomada como se observa en la ilustración 5, se depositó directamente sobre el porta objeto para su extendido y tinción. En un tubo de tapa lila

con anticoagulante EDTA, se tomaron las muestras de la vena coccígea, se marcaron y se depositaron en una nevera con refrigerantes. Se realizaron 5 pruebas de ensayo y error, y luego se hicieron las pruebas definitivas con 20 muestras de búfalos y 7 de bovinos.



Ilustración 5. Toma de sangre periférica en la oreja y toma de sangre en la vena coccígea

Fuente: autor, 2019

6.5 Equipos y materiales:

6.5.1 Equipos:

- ✚ Mezclador de tubos o agitador vortex.
- ✚ Microcentrífuga
- ✚ Termociclador convencional
- ✚ Cámara de electroforesis y accesorios.
- ✚ Fuente de poder.

- ✚ Refrigerador de 4°C
- ✚ Congelador a - 20°C
- ✚ Micropipetas de volúmenes 1-20, 20-200 y 200-1000µl

6.5.2 Materiales:

- ✚ **Puntas de micropipeta de 1-10, 20-200 y 100-1000µl.**
- ✚ Puntas de micropipeta con filtro resistente a aerosoles de 1-10, 20-200 y 200-1000µl.
- ✚ Tubos de microcentrífuga de 0,2 µl, grado biología molecular.
- ✚ Tubos eppendorf de 1.5 ml, grado biología molecular.
- ✚ Agua grado biología molecular.
- ✚ DreamTaq MM (comercialmente disponible por Bioingentech, Ref.: K1071)
- ✚ *Primers* a concentración de 25 uM (Sln trabajo).



Ilustración 6. Reactivos. (Fotos autor)

Para realizar la prueba de PCR se tuvieron en cuenta los siguientes pasos:

6.6.1. Extracción de DNA:

La extracción de DNA se realizó utilizando un kit comercial de DNA DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (se encuentra en las páginas 55-58) .

Se tomó 100 µl de DNA de sangre de las muestras traídas al laboratorio de especie tanto bovina como búfalos. Las muestras procesadas fueron las siguientes:

- Una muestra de sangre de bovino previamente confirmada por medio de extendido de sangre periférica con presencia de *Anaplasma spp.*
- 20 muestras de sangre de búfalo en EDTA congeladas a -25°C desde el año 2017



Ilustración 7. Extracción de ADN. (Fotos autor)

En todas las muestras se amplificó un fragmento del gen RNA polymerase subunit beta (rpoB) para el género *Anaplasma spp* por PCR convencional con una banda de 525 bp (Dahmani et al., 2017). Se prepararon dos mezclas maestras (Máster Mix) con diferentes

secuencias de primers para la implementación de PCR, en la Tabla 1 se presenta la composición de dicha mezcla.

Tabla 1. Primers utilizados para la estandarización de PCR para *Anaplasma marginale*

PRIMER	GEN BLANCO	SECUENCIA (5'-3')	ORIENTACION
Ana-rpoBF	rpoB	GCTGTTCCAGGCTYTTTACGCGA	Forward
Ana-rpoBR		AATCRAGCCAVGAGCCCCTRTAWGG	Reverse

Fuente: (Mustapha Dahmani, 2017)

La secuencia de los primers en dirección 5' – 3' se describen en la Tabla 1. Las reacciones de amplificación se efectuaron en las siguientes condiciones: una fase inicial de desnaturalización a 95°C durante 15 min, seguida de 40 ciclos que consiste en 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de anillamiento a 55°C y una extensión de 1 min a 72°C; y una extensión final a 72°C por 7 min. Como se observa en la tabla 4.

1. Preparación de la solución stock (100 µM):

Consiste en reconstituir los primers para tener una “solución madre” (concentración de 100 µM y volumen de 300 µL según la casa comercial) a lo que se diluye convenientemente con el fin de obtener luego una solución de trabajo y que al pipetear (0,5 µL) se entregue a la Master Mix la cantidad adecuada de primer. **(misiones)**

Primers Ana-rpoBF y Ana-rpoBR utilizados para la estandarización de PCR

Se centrifugó cada uno por separado de manera breve el tubo con el liofilizado para asegurar que todo su contenido se concentre en el fondo. El primer forward se preparó a una concentración de 30nmoles, por lo que se agregó 300 µL de agua grado biología molecular, para obtener un stock de 100 µM.

Paea la preparación de la solución stock el volumen de agua grado biología molecular se debe tener en cuenta la cantidad de primer que venga en el vial, siendo la síntesis de los oligonucleótidos diferente en cada proceso. Al no tener en cuenta la cantidad de primer en el vial se puede terminar preparando una dilución mayor o menor a la esperada.

2. Preparación de la solución de trabajo [25 µm]:

Este paso se debe realizar tanto para Ana-rpoBF como para Ana-rpoBR (se muestra un ejemplo de cómo hacerla con un stock de 100 µm, que deberá adaptarse si la concentración del stock es diferente): La siguiente fórmula se utiliza para determinar los volúmenes adecuados del stock, pero esta depende de la cantidad de muestras a preparar

$$V1 * C1 = V2 * C2$$

*Dónde: Volumen stock * [stock] = Volumen sln trabajo * [sln trabajo]*

$$V1 * 100 \mu M = 50 \mu L * 25 \mu M$$

$$\underline{V1 = 50 \mu L * 25 \mu M}$$

$$100 \mu M$$

$$V1 = 12,5 \mu L$$

Se alicuota en un tubo respectivamente marcado: 12,5 µL de la solución de stock del primer y 37,5 µL de agua grado biología molecular, hasta completar 50 µL. Como resultado se obtuvo una solución de trabajo [25 µm] que se usó en la preparación de la reacción.

Tabla 2. Preparación del master mix (por reacción: volumen final 25 µl contando 1ul del ADN de la muestra que se adiciona al final en cada tubo de reacción)

Reactivo		[Prueba 1]	Volumen (μl)	[Prueba 2]	Volumen (μl)
Agua grado molecular		-	10,5	-	9,5
DreamTaq DNA Polymerase		1X	12,5	1X	12,5
Iniciadores (primers)	Ana-rpoBF	0,5 μM	0,5	1 μM	0,5
	Ana-rpoBR	0,5 μM	0,5	1 μM	0,5
Muestra		-	1	-	1
Total		-	25	-	25

Para hacer la preparación del Master Mix se debe:

- Agitar en un vórtex el tubo con el master mix, alicuotar el master mix en los tubos de PCR (24ul) en cada uno.

Para las muestras y controles se hace lo siguiente:

- Se descongelaron todas las muestras y controles de ADN; posteriormente se colocaron en hielo, luego se alicuotaron las muestras de ADN y controles en tubos de PCR.

Para muestras de diagnóstico se usó: 1 μL del ADN extraído al tubo respectivo.

Controles positivos y negativos: además de las muestras de diagnóstico, los siguientes controles se agregan al tubo respectivo.

Tabla 3. Control negativo y positivo de la muestra.

TIPO DE CONTROL	PROPÓSITO	CONTENIDO DE LA REACCIÓN
Control negativo de PCR	Excluir como fuente de contaminación los reactivos de la reacción	1 μ L de agua grado biología molecular. El control negativo se sirve en el momento de alicuotar la master mix. Antes de manipular el ADN de las muestras o control positivo para reducir el riesgo de contaminación
Control positivo de PCR	Determinar si la amplificación es específica y funcional.	2 μ L DNA positivo del agente blanco. El control positivo es el último que se adiciona a la master mix, para evitar contaminación cruzada con las muestras.

Pasos para colocar la muestra positiva en el termociclador:

Para el PCR de *Anaplasma Marginale* se seleccionó como control positivo bovinos con diagnóstico positivo a *Anaplasma* mediante la técnica de extendido en placa. Posteriormente se debe: alicuotar las muestras de ADN y controles en tubos de PCR, tapar los tubos de PCR asegurándose de que estén completamente sellados, colocar los tubos de PCR dentro del termociclador y proceder a la amplificación.

Desnaturalización inicial. tiene una duración de 15:00 minutos a una temperatura de 95°C donde ocurre 1 ciclo. Aquí se separa el anticuerpo acoplado que está casi en todas las polimerasas comerciales y de esta manera se puede empezar con los ciclos .

Extensión final. Aquí la polimerasa termina de unir los deoxinucleotidos que quedan sueltos. Esto es posible a una temperatura de 72°C. (Tamay, Ibarra, & Velasquillo, 2013).

Amplificación

Después de la preparación de la mezcla de reacción, se llevó las muestras al termociclador. La amplificación se hizo bajo el siguiente perfil térmico:

Tabla 4. Protocolo de amplificación

FASE	DURACION	TEMPERATURA	CICLOS
Desnaturalización inicial	15:00'	95°C	1
Desnaturalización	1:00'	95°C	40
Anillamiento	1:00'	55°C	
Extensión	1:00'	72°C	
Extensión Final	7:00'	72°C	1

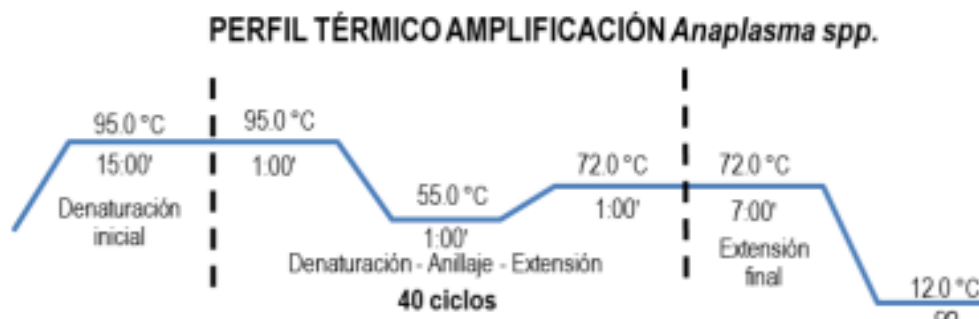


Ilustración 4. Perfil térmico de amplificación

Se realizó la electroforesis a los productos amplificados en un gel de agarosa al 1.5% con TBE buffer 0.5X. Estos se visualizaron en el equipo E-Gel Imager UV-Base (Life Technologies).

Se debe tener en cuenta que los amplicones deben almacenarse entre 4 - 8°C en la nevera (hasta una semana) o se pueden congelar a -20°C hasta el análisis de electroforesis en gel de agarosa.

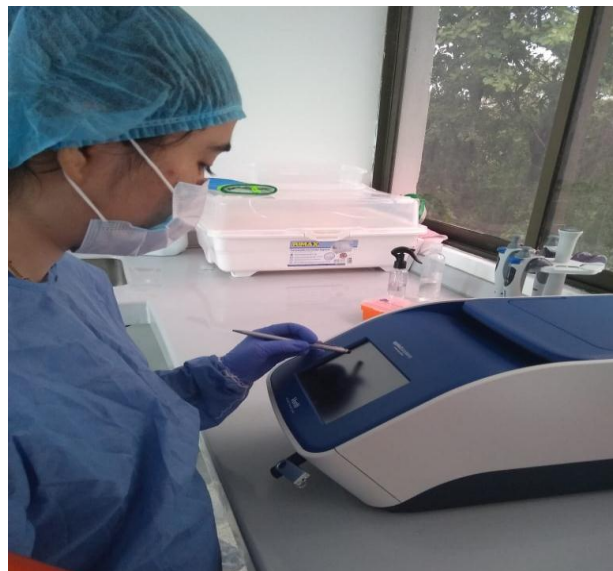


Ilustración 8. Termociclador convencional. Fuente autor

6.6.3. Electroforesis

La concentración de trabajo para el TBE es de 10 X. Para ello, en un recipiente de vidrio se añaden 50 mL de TBE 10X y 950 mL de agua destilada. El TBE puede ser almacenado a temperatura ambiente.

Preparación del gel de agarosa para hacer la electroforesis:

- ✚ Para la preparación de un gel de agarosa al 1.5 %, agregar 1.5 g de agarosa a 100 mL de tampón TBE 0.5 X en un frasco tapa azul o Scott

- ✚ la solución TBE/agarosa se lleva al microondas durante el tiempo suficiente para que toda la agarosa se disuelva hasta lograr una solución traslúcida.
- ✚ Se prepara la bandeja de gel sellando los extremos y colocando la cantidad adecuada de peines en la misma permitiendo tener suficientes pozos para todas las muestras.
- ✚ Se vierte el gel en la bandeja. No se debe formar burbujas, dado el caso se debe eliminarla con cuidado usando una punta de pipeta.
- ✚ Se deja que el gel de agarosa se enfríe a temperatura ambiente hasta que gelifique. Retirar cuidadosamente los peines espaciadores.
- ✚ Se coloca la bandeja de gel dentro de la cámara de electroforesis y se adiciona tampón TBE 0.5 X, hasta el nivel indicado en la pared de la cámara o como mínimo, cubriendo en su totalidad la superficie del gel

Se recomienda reutilizar el buffer hasta cuatro veces únicamente como buffer de corrida. Preferiblemente mantener bajo refrigeración.

Procedimientos para la carga del gel y corrida electroforética:

- ✚ Se agrega 1 μL de EZ-Vision a 5 μL de DNA ladder, y se mezcla.
- ✚ Luego se pipetea la mezcla DNA ladder-EZ Vision en el primer pozo.
- ✚ Se agrega 1 μL de EZ-Vision a 5 μL del amplificado de cada muestra y se mezcla. Se Realiza el mismo procedimiento para los controles.
- ✚ Se pipetea la mezcla DNA/EZ Vision de la muestra de PCR en cada pozo.

- ✚ Se colocar la tapa sobre la bandeja de gel y se enciende la fuente de poder a 120V durante 30 minutos (tiempo de corrida); se verifica que la electricidad esté fluyendo, esta se constata al ver la formación de pequeñas burbujas que salen de los electrodos al contacto con el TBE 0.5X.

Se debe colocar el gel de modo que el polo negativo esté en la parte superior de la Cámara y el polo positivo en la parte inferior. El ADN tiene carga negativa (negro) y se moverá a través del gel hacia el cable positivo (rojo).

Después de completar la electroforesis, los amplicones se podrán visualizar en el fotodocumentador.

Visualización en fotodocumentador:

Para lograr la visualización de los carriles se debe, conectar al PC la USB que contenga el software y abrir la aplicación.

- Se selecciona el equipo correspondiente (UV Light Base with E-Gel).
- Se verifica que el filtro de emisión de color sea compatible con el colorante de Bandas de ADN utilizado.
- Se coloca el gel de agarosa en la parte central del vidrio ubicado en la base del fotodocumentador como se observa en la ilustración 4.
- Se enciende la cámara de la base ubicada en la parte inferior del fotodocumentador y visualizar en el pc los carriles de imagen las bandas como se ve en la ilustración

7. RESULTADOS

Adicionalmente, de las dos pruebas que se hicieron con las dos concentraciones de 0,5 μm y 1 μm , ambas lograron amplificar la banda de 525 bp, siendo más notoria la banda de con la concentración de 0,5 μm . Por lo tanto, esta es la concentración que se siguió utilizando para las demás amplificaciones del proyecto.

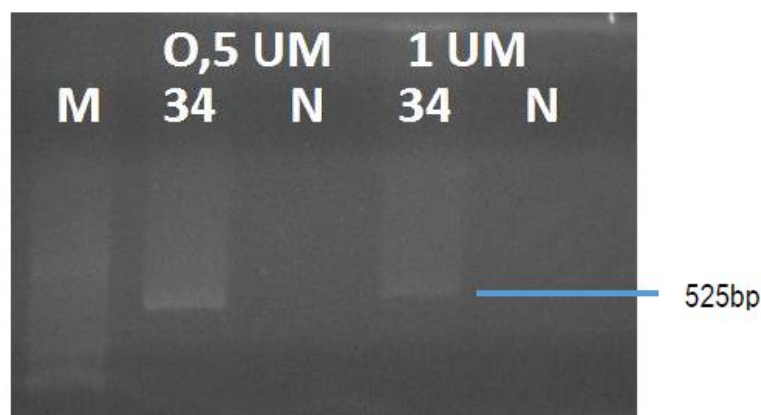


Ilustración 9. Visualización muestra para control positivo.

M: Marcador de peso molecular, 34: Muestra para control positivo, N: Control Negativo.

En la ilustración No.12, se observa al lado izquierdo el marcador, que nos indica el peso molecular para la observación de positivada de PCR en una muestra, seguido a este, se observa la muestra No. 34 su positividad a anaplasma. Luego se encuentra el control negativo que nos garantiza que la muestra no tiene anaplasma.

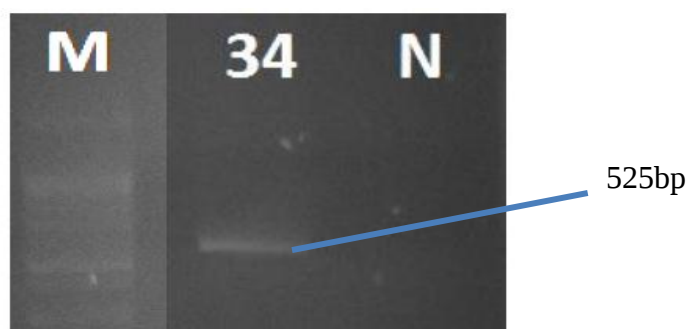


Ilustración 10. Se repite la prueba con la concentración de primer 0,5 μM . En la siguiente, las muestras analizadas, de sangre de búfalo, y el respectivo carril de la electroforesis.

Tabla 5. ANALISIS BIOLOGIA MOLECULAR – Detección del genoma de *Anaplasma* spp en búfalo

IDENTIFICACION	RESULTADO ANALISIS MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DEL DNA DE ANAPLASMA SPP	CARRIL IMAGEN
31	NEGATIVO	21
36	NEGATIVO	22
37	NEGATIVO	23
38	NEGATIVO	24
40	NEGATIVO	25
23	NEGATIVO	26
24	NEGATIVO	27
25	NEGATIVO	28
28	NEGATIVO	29
29	NEGATIVO	30
1	POSITIVO	31
2	POSITIVO	32
3	POSITIVO	33
4	POSITIVO	34
5	NEGATIVO	35
6	POSITIVO	36
7	POSITIVO	37
11	POSITIVO	38

12	POSITIVO	39
15	POSITIVO	40

De las 20 muestras de sangre de búfalo, el 45% (9/21) fueron positivas para la detección del gen rpoB de *Anaplasma* spp., y el 55% (11/20) fueron negativas.

Mediante el uso del equipo del visualizador en la ilustración N.11, se observó que entre la muestra No. 21 y 30 no se encontraron animales positivos a anaplasma. Observamos, la identificación clara del marcador de peso molecular el control positivo y el control negativo.

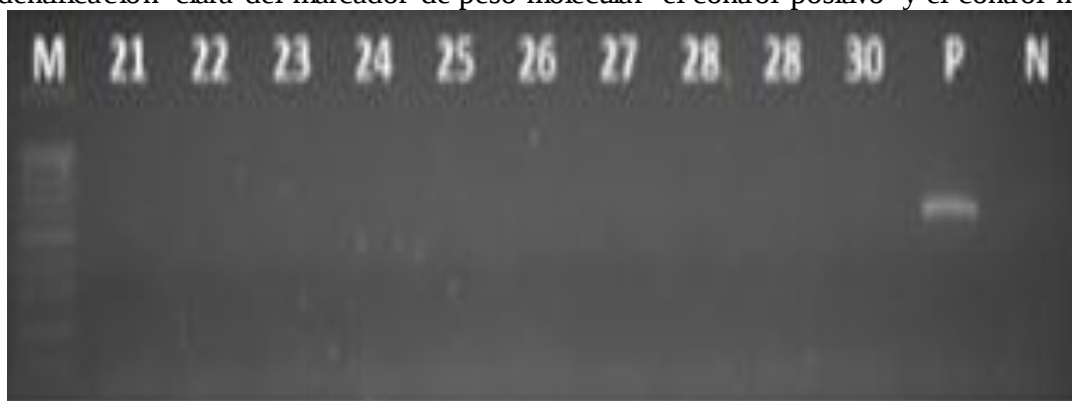


Ilustración 11. Visualización muestra para control positivo.

En la siguiente ilustración No. 12 se observa las muestras consecutivas a partir del 31 al 40 donde se identifica las muestras positivas a anaplasma, donde está la misma línea del control positivo.

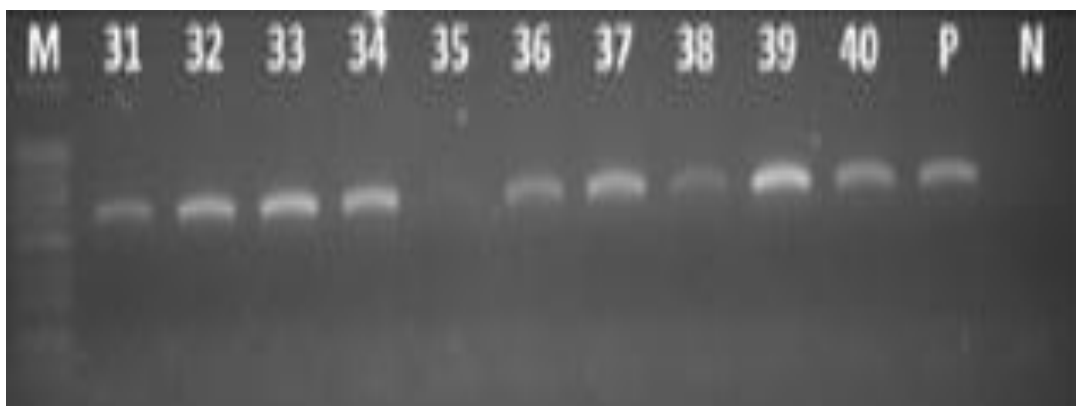


Ilustración 12. Visualización muestra para control positivo.

P: Control positivo N:Control negativo

M: marcador de peso molecular.

Tabla 6. ANÁLISIS BIOLOGÍA MOLECULAR-Detección del genoma Anaplasma spp en bovinos.

IDENTIFICACION	RESULTADO ANÁLISIS MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DEL DNA DE ANAPLASMA SPP	CARRIL IMAGEN
348	POSITIVO	98
348-1	POSITIVO	99
350	POSITIVO	0
354	POSITIVO	1
357	POSITIVO	2
358	POSITIVO	3
362	POSITIVO	4
195	POSITIVO	34

La sangre de bovinos obtenidas de la Granja Experimental CORHUILA fue el 100% (7/7) salieron positivas para Anaplasma spp.

En la siguiente ilustración No. 13 se observa las muestras No. 1 y 2 no se visualiza con claridad, sin embargo se alcanza a identificar su positividad.

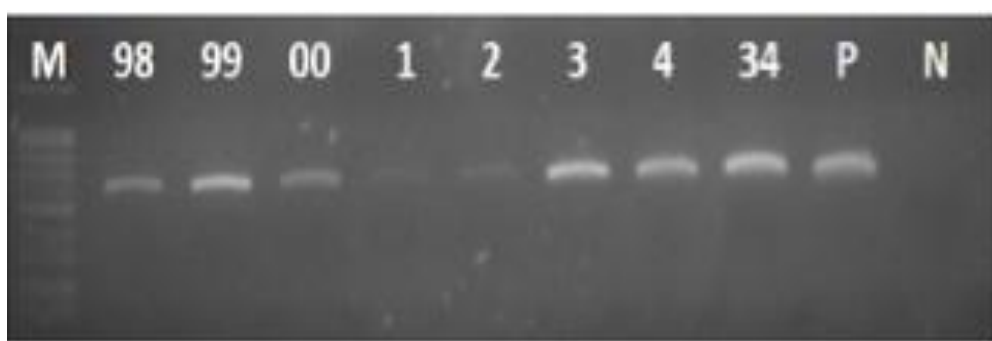


Ilustración 13. Visualización muestra para control positivo. FUENTE AUTOR

M: Marcador de peso molecular P: Control positivo N: Control negativo

Relación de sangre periférica y sangre central

Comparando la sangre periférica con la sangre central, se puede confirmar que ambas salieron positivas a la bacteria en la técnica de PCR, para llevar a cabo la PCR se debió confirmar previamente la patología mediante frotis sanguíneo.

8. DISCUSIÓN

Se confirma que la técnica de PCR es una prueba diagnóstica de alta especificidad y sensibilidad. Sin embargo, es de vital importancia tener los equipos y materiales de trabajo adecuados y calibrados para así lograr un resultado confiable. Se obtuvo una amplificación de 525bp que correspondió al control positivo de la técnica, de igual manera el control negativo se comportó como tal. Esto demuestra que el PCR se desarrolló e implementó de manera adecuada en el laboratorio de la Universidad.

No todas las muestras de sangre de los búfalos salió positivo a *Anaplasma* spp. Una razón pudo haber sido por el tiempo de refrigeración, puesto que no es recomendable que la sangre esté refrigerada a más de 24 horas, y porque esas muestras negativas a la enfermedad no estaban bien tomadas, estos factores pueden llevar a una lisis celular. O simplemente esos animales no tenían dicha enfermedad.

El 100% de los animales muestreados en la granja experimental Corhuila presentaron positividad, sin embargo ninguno de ellos muestra signos clínicos de la enfermedad. No se puede descartar la posibilidad de que este agente influya de una manera no clínica en parámetros productivos de estos animales, Según **(Corona, Obregon, Martinez, Eapinosa, Fonseca, & Roque, 2012)** “se debe tener en cuenta que el frotis sanguíneo no es sensible para la identificación de animales que presente *Anaplasmas marginale* debido a que esta técnica funciona cuando el animal tiene parasitemia evitando así un diagnóstico preciso de la enfermedad. Con estos resultados se verifica que el ensayo de PCR es una herramienta diagnóstica de alta sensibilidad y especificidad para la identificación de animales infectados con *Anaplasma marginale*, coincidiendo con los resultados del artículo”.

9. CONCLUSIÓN

La implementación de la técnica de PCR para el diagnóstico de *Anaplasma marginale* en la Corporación Universitaria del Huila – CORHUILA, permite ofrecer una técnica diagnóstica rápida y eficiente, logrando la validación y amplificando el gen rpoB para búfalos y bovinos, confirmando el diagnóstico inicial, mejorando los problemas sanitarios que se presentan en la producción bufalina y bovina evitando pérdidas para los ganaderos en la región del Huila.

10. RECOMENDACIONES

- Continuar realizando implementaciones de técnicas moleculares para la detección de agentes patógenos que amenazan el bienestar de los bovinos, y de esta manera poder minimizar las pérdidas económicas ocasionadas por estos patógenos en la ganadería.
- Se debe mejorar la recolección de toma de muestras, para poder realizar el correcto proceso en laboratorio y garantizar los resultados.
- Es recomendable que haya una separación adecuada de las áreas del laboratorio como lo son la extracción, amplificación, electroforesis y visualización, para evitar contaminación cruzada.

Bibliografía

- Barato, P. (s.f.). *yumpu*. Recuperado el 2019, de <https://www.yumpu.com/es/document/read/55996689/que-es-pcr-y-como-asegurar-el-exito-del-dx-molecular-molecularvet-corpavet>
- Bernal, & Olguín, A. (sf). *AMMVEB*. Recuperado el 09 de 2019, de <http://www.ammveb.net/clinica/anaplasmosis.pdf>
- Brayton, & A, K. (2012). Transmisión de *Anaplasma marginale* por garrapatas. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 1-10.
- company, t. w. (Enero de 2020). *the weather company*. Obtenido de <https://weather.com/es-CO/tiempo/hoy/l/2.93,-75.28?par=google&temp=c>
- Corona, B., Obregón, D., Alemán, Y., Alfonso, P., Vega, E., Díaz, A., y otros. (2014). Tendencias en el diagnóstico de la anaplasmosis bovina. *revista de salud animal*, 74.
- Corona, b., Obregon, D., Martinez, S., Eapinosa, I., Fonseca, A., & Roque, E. (2012). DETECCIÓN POR PCR DE *Anaplasma marginale* EN BÚFALOS DE LA REGIÓN OCCIDENTAL DE CUBA. *revista de salud animal*, 3-8.
- Cruz. (2019). Anaplasmosis: A Review of Diagnostic Techniques. 8th National Veterinary hemoparasite Disease Conference. *revista de salud animal*, 2.
- Ecured. (sf). *Anaplasmosis*. Recuperado el 08 de 2019, de <https://www.ecured.cu/Anaplasmosis>
- Ganadero, C. (27 de 06 de 2017). *CONtesxtto ganadero*. Recuperado el 08 de 2019, de <https://www.contextoganadero.com/economia/conozca-el-censo-pecuario-nacional-del-ica-2017>
- ganadero, C. (28 de octubre de 2019). *CONtexto ganadero*. Recuperado el octubre de 2019, de <https://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/toma-de-sangre-de-la-vena-coccigea-en-bovinos>
- González, B. C., Obregón, D., Alemán, Y., Alfonso, P., Vega, E., Díaz, A., y otros. (2014). Tendencias en el diagnóstico de la anaplasmosis bovina. *Revista de salud animal*, 74-76.

- Herrera, A. N. (sf). *ANAPLASMOSIS BOVINA HIPERAGUDA: REPORTE DE CASO*. Recuperado el 01 de 2020, de <https://repository.udca.edu.co/bitstream/11158/1328/1/ANAPLASMOSIS%20BOVINA%20HIPERAGUDA%20REPORTE%20DE%20CASO%20Anaplasma%20marginal.pdf>
- KM, K., J, d. I., EF, B., JF, C., & SA, E. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *vet parasitol*, 167:95-107.
- Miraballes, C., & Amaral, F. R. (17 de noviembre de 2017). *engormix*. Recuperado el 22 de septiembre de 2019, de <https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/prevencion-diagnostico-tratamiento-babesiosis-t41349.htm>
- misiones, u. n. (s.f.).
- Mustapha Dahmani, B. D. (2017). Molecular investigation and phylogeny of anaplasmataceae species infecting domestic animals and ticks in corsica, france . *parasites y vectors*, 4.
- navarra, c. u. (2019). *clinica universitaria de navarra*. Obtenido de www.cun/diccionario-medico/terminos/diagnosticos-indirecto
- OIE), O. M. (2008). Bovine anaplasmosis. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 6th ed. *salud animal*, 2.
- Palmer, & McElwain. (1995). Molecular bases for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Vet Parasit*, 57:233-253.
- QIAGEN. (julio de 2006). *bea.ki.se*. Recuperado el diciembre de 2019, de <http://www.bea.ki.se/documents/EN-DNeasy%20handbook.pdf>
- Reinbold, Coetzee, Sirigireddy, & Ganta. (2010). Detection of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum* in bovine peripheral blood samples by duplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol*, 48(7):2424-2432.
- Rojas, A. (2016). *conogasi*. Recuperado el 24 de enero de 2020, de <http://conogasi.org/articulos/extraccion-de-adn/>
- Rueda, N. B., & Otero, J. A. (2018). *Implementación de la técnica de PCR para el diagnóstico de Edwardsiella tarda como estrategia de apoyo a los procesos de certificación de piscifactorías del departamento del Huila*. Neiva.
- Sano, H. (sf). *Hato Sano*. Recuperado el 2019, de <http://www.vivo.colostate.edu/hatosano/diseases/anaplasmosis.html>

- Stiller D, K. K. (2012). Transmisión de *Anaplasma marginale* por garrapatas. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 2.
- Tamay, L., Ibarra, c., & Velasquillo, c. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *tecnologia en salud*, 70-78.
- Torioni, Knowles, McGuire, Palmer, Suarez, & McElwain. (1998). Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in an endemic region using nested PCR and recombinant MSP5-cELISA. *Clin Microbiol*, 36:777-782.
- Uruguay, C. i. (17 de noviembre de 2017). *engormix*. Recuperado el 22 de septiembre de 2019, de <https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/prevencion-diagnostico-tratamiento-babesiosis-t41349.htm>
- Visser E, A. R. (1987). DNA probes for detection of *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale*, Onderstepoort. *revista de salud animal*, 54:623-627.
- Visser E, A. R. (1987). DNA probes for detection of *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale*, Onderstepoort. *J vet Res.*, 54:623-627.

ANEXOS

Anexo 1: Protocolo de purificación de ADN total de sangre animal o células (kit comercial de DNA DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen))

Este protocolo está diseñado para la purificación del ADN total de la sangre animal (con eritrocitos nucleados o no nucleados) o de células animales o humanas cultivadas.

Antes de iniciar la extracción de ADN a partir de sangre es importante tener en cuenta:

- Todos los pasos de centrifugación se llevan a cabo a temperatura ambiente (15-25 ° C).
- El vórtice debe realizarse mediante vórtice de pulso durante 5–10 s.
- Se requiere PBS para su uso en el paso 1. Buffer ATL no es requerido en este protocolo.

Cosas para hacer antes de comenzar:

- El tampón AL puede formar un precipitado tras el almacenamiento. Si es necesario, calentar a 56 ° C hasta que el precipitado se haya disuelto completamente.

- Buffer AW1 y Buffer AW2 se suministran como concentrados. Antes de usar por primera vez, agregue la cantidad adecuada de etanol (96–100%) como se indica en la botella para obtener una solución de trabajo.
- Precaliente un termomezclador, un baño de agua con agitación o una plataforma oscilante a 56 ° C para usar en el paso 2.

PROCEDIMIENTO

1. No nucleado: Pipetee 20 µl de proteinasa K en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml o 2 ml (no incluido). Se agregó 100 µl de sangre anticoagulada. Se ajustó el volumen a 100 µl con PBS. Continuar con el paso 2.

2. Añadir 200 µl de tampón AL (sin etanol añadido). Mezclar bien mediante agitación vorticial e incubar a 56 ° C durante 10 min.

Asegúrese de que no se haya agregado etanol al Buffer AL . Es esencial que la muestra y el tampón AL se mezclen inmediata y completamente mediante vórtice o pipeteo para obtener una solución homogénea.

3. Agregue 200 µl de etanol (96–100%) a la muestra y mezcle bien mediante agitación vorticial. Es importante que la muestra y el etanol se mezclen completamente para obtener una solución homogénea.

4. Pipetee la mezcla del paso 3 en la columna de centrifugación DNeasy Mini colocada en un tubo de recogida de 2 ml (incluido). Centrifugar $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) durante 1 min. Deseche el tubo de flujo y recolección.

5. Coloque la columna de centrifugación DNeasy Mini en un nuevo tubo de recolección de 2 ml (incluido), agregue 500 μ l de tampón AW1 y centrifugue durante 1 minuto a $6000 \times g$ (8000 rpm). Deseche el flujo y el tubo de recolección.

6. Coloque la columna de centrifugación DNeasy Mini en un nuevo tubo de recolección de 2 ml (provisto), agregue 500 μ l de Buffer AW2 y centrifugue durante 3 minutos a $20,000 \times g$ (14,000 rpm) para secar la membrana DNeasy. Deseche el flujo y el tubo de recolección.

Es importante secar la membrana de la columna de centrifugación DNeasy Mini, ya que el etanol residual puede interferir con las reacciones posteriores. Este paso de centrifugación asegura que no se transportará etanol residual durante la siguiente elución. Después del paso de centrifugación, retire la columna de centrifugación DNeasy Mini con cuidado para que la columna no entre en contacto con el flujo continuo, ya que esto provocará el arrastre de etanol. Si se produce una transferencia de etanol, vacíe el tubo de recolección, luego reutilícelo en otra centrifugación durante 1 minuto a $20,000 \times g$ (14,000 rpm)

7. Coloque la columna de centrifugación DNeasy Mini en un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 ml o 2 ml (no suministrado) y pipetee 200 μ l de tampón AE directamente sobre la membrana DNeasy. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto y luego centrifugar durante 1 minuto a 6000 x g (8000 rpm) para eluir.

La elución con 100 μ l (en lugar de 200 μ l) aumenta la concentración final de ADN en el eluato, pero también disminuye el rendimiento total de ADN.

8. Recomendado: para obtener el máximo rendimiento de ADN, repita la elución una vez como se describe en el paso 7.

Este paso conduce a un aumento en el rendimiento general de ADN.

Se puede usar un nuevo tubo de microcentrífuga para el segundo paso de elución para evitar la dilución del primer eluato. Alternativamente, para combinar los eluidos, el tubo de microcentrífuga del paso 7 puede reutilizarse para el segundo paso de elución.

Nota: No eluya más de 200 μ l en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml porque la columna de centrifugación DNeasy Mini entrará en contacto con el eluato. **(QIAGEN, 2006).**