

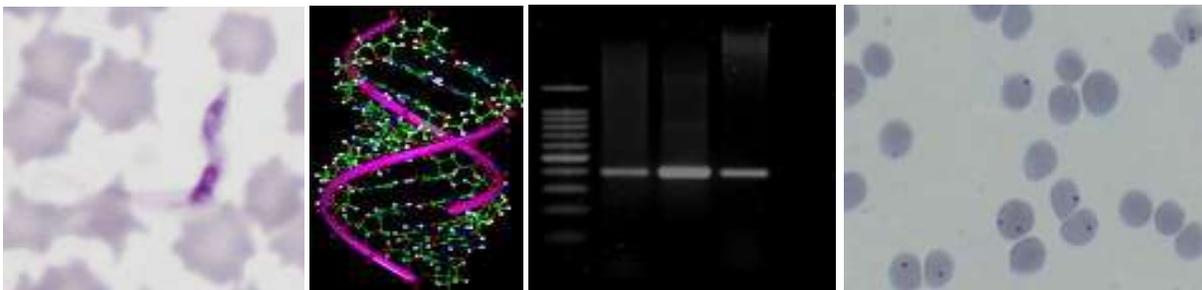


Universidad de los Andes
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología
Investigaciones Parasitológicas
"J.F.Torrealba"
Mérida- Venezuela.



Universidad Experimental Sur del Lago
Dirección de Investigación y Postgrado
Santa Bárbara del Zulia
Venezuela.

Utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de tripanosomiasis y anaplasmosis en muestras de sangre de animales domésticos



Santa Bárbara – Zulia
2007

TALLER TEORICO-PRACTICO

UTILIZACION DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA EL DIAGNOSTICO DE TRIPANOSOMIASIS Y ANAPLASMOSIS EN MUESTRAS DE SANGRE DE ANIMALES DOMESTICOS

26 -29 de junio 2007

PROGRAMA

Martes 26. Llegada, instalación de equipos y arreglo de material en el laboratorio de biotecnología.

Miércoles 27. AM: Bienvenida a los participantes del primer curso en laboratorio de biotecnología de UNESUR. Prof. Víctor Márquez.

Conferencia Introductoria: “**Necesidad de un diagnóstico preciso en la detección de hemoparásitos**”. Prof. Néstor Añez, ULA.

**Colecta de muestras sanguíneas en animales sospechosos
(Finca UNESUR)**

PM: Conferencia: “**Uso de la PCR como herramienta molecular para el diagnóstico de hemoparásitos. Fundamentos Teóricos**”. Lic. Gladys Crisante, ULA.

Inicio procesamiento de las muestras colectadas.

Jueves 28. AM: Conferencia: “**Aplicación de la técnica de PCR en el diagnóstico de *Trypanosoma vivax* y *Anaplasma marginale* en muestras sanguíneas de bovinos y bufalinos**”. Lic. Ana María Bolívar, ULA.

PM: Procesamiento de las muestras y obtención de resultados.
Lic. Ana María Bolívar, Lic. Gladys Crisante, Lic. Néstor Añez-Rojas

Viernes 29. AM: Finalización de procesamiento de muestras, obtención de resultados.
Discusión de resultados
Lic. Ana María Bolívar, Lic. Gladys Crisante, Lic. Néstor Añez-Rojas,
Prof. Néstor Añez

PM: Entrega de Certificados

CONTENIDO

Programa	2
Lista de autores	4
Editado por	5
Agradecimientos	6
A Manera de Presentación	7
Título: Utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de tripanosomiasis y anaplasmosis en muestras de sangre de animales domésticos	
I.- INTRODUCCIÓN	9
II.- PRINCIPIO DEL METODO	12
1. Reacción en cadena de la polimerasa	12
2. Preparación de la muestra para la ejecución de la técnica de PCR: extracción de ADN	14
3. Corrida electroforética en gel de agarosa y visualización de la reacción	14
III.- MEDIDAS DE SEGURIDAD PARA LA EJECUCION DE LA TECNICA DE PCR	15
IV.- ALCANCE DE LA TECNICA DE PCR DURANTE EL CURSO	16
V.- INFRAESTRUCTURA NECESARIA PARA LA EJECUCION DE LA TECNICA DE PCR	16
VI.- REACTIVOS	17
VII.- PREPARACION DE SOLUCIONES	19
VIII.- PROCEDIMIENTO DE ANALISIS	21
IX.- REFERENCIAS	27

LISTA DE AUTORES

NESTOR AÑEZ, M.V., M.Sc., D.I.C., Ph.D., FRES.

Investigaciones Parasitológicas “J.F.Torrealba”, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

GLADYS CRISANTE, BIOL. PARASITOL.

Investigaciones Parasitológicas “J.F.Torrealba”, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

ANA MARIA BOLIVAR, BIOANAL., M.Sc.

Investigaciones Parasitológicas “J.F.Torrealba”, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

NESTOR AÑEZ-ROJAS, BIOL., M.Sc.

Laboratorio de Biotecnología, Universidad Experimental del Sur del Lago (UNESUR), Santa Bárbara del Zulia, Venezuela.

EDITADO POR:

NESTOR AÑEZ, M.V., M.Sc., D.I.C., Ph.D., FRES.

COORDINADOR

GLADYS CRISANTE, BIOL., PARASITOL.

ASISTENTE

Investigaciones Parasitológicas “J.F.Torrealba”

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias,

Universidad de Los Andes

Mérida, 5101, Venezuela

VICTOR E. MARQUEZ, Ing., M.Sc.

DIRECTOR INVESTIGACION Y POSTGRADO

Universidad Nacional Experimental del Sur del Lago

(UNESUR)

Santa Bárbara del Zulia, Zulia, Venezuela

2007

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su reconocimiento por el apoyo recibido de la Dirección de Investigación y Postgrado de la UNESUR en la persona del Prof. Víctor E. Márquez Pérez. Asimismo, agradecemos la colaboración del Lic. Néstor Añez-Rojas por la coordinación del curso en el laboratorio de Biotecnología de la UNESUR. Al Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, por autorizar a los miembros de Investigaciones Parasitológicas “J.F.Torrealba” para llevar a cabo el presente intercambio científico. Se agradece el apoyo de los proyectos CDCHT-ULA-C-1210-03-03-EM y UNESUR-0402000004201.

A MANERA DE PRESENTACION

El presente curso-taller titulado **“Utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de tripanosomiasis y anaplasmosis en muestras de sangre de animales domésticos”**, presentado en la modalidad teórico-práctico, es el primero de una serie que se intenta programar en los espacios del recientemente creado laboratorio de Biotecnología de la Universidad Experimental del Sur del Lago (UNESUR), aprovechando la asociación o pre-convenio entre el Laboratorio de Investigaciones Parasitológicas “J.F.Torrealba”, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida y la Dirección de Investigación y Postgrado de la UNESUR en Santa Bárbara del Zulia.

Este taller ha sido diseñado con la deliberada intención de transferir tecnologías estandarizadas y suficientemente aplicadas desde un laboratorio, con una cierta experiencia acumulada durante los últimos 35 años, hasta una naciente unidad de investigación, donde justamente esta actividad todavía no se ha convertido en una tradición. Sin embargo, nuestro más caro deseo es que además de captarse los principios y fundamentos de las metodologías que se explicarán durante este intercambio científico, logremos motivar a los jóvenes participantes para que se adentren en el quehacer científico sin rubor y, para que con la conjunción del talento y la irreverencia propia de la juventud, puedan pronto llegar a hacer buena ciencia espontáneamente. Asimismo, nos satisfaría enormemente la posibilidad de llegar a sensibilizar a este grupo de talentosos participantes sobre las problemáticas presentes en el área de influencia de la UNESUR, a las que pudiera dársele soluciones por la vía de la investigación científica. Por esta razón hemos considerado pertinente en el presente curso trabajar sobre una problemática real que se vive a diario en las explotaciones ganaderas de la zona donde está enclavado el nuevo laboratorio, donde la tripanosomiasis y la anaplasmosis constituyen factores que pudieran estar interfiriendo sobre el desarrollo ganadero, transformándose en potenciales pérdidas o cantidades apreciables que se dejan de percibir en la actividad. De la misma manera, se pretende con la introducción de técnicas producto

de la nueva biotecnología dotar a los participantes de herramientas científicas lo suficientemente sólidas como para responder a tales retos. En este caso particular ofrecer la posibilidad de un diagnóstico certero, específico, altamente sensible y en corto tiempo, ensayando la técnica, quizás más utilizada en el presente, dada su alto grado de especificidad y sensibilidad. Una herramienta como esta podría permitir un diagnóstico en la población de animales explotados en el área, ofreciendo un conocimiento pleno sobre la prevalencia real de las infecciones mencionadas en grandes rebaños, sin interferencia diagnóstica como suele suceder cuando se aplican otros métodos parasitológicos y/o serológicos. De la misma manera, podría ser de gran utilidad a la hora de hacer un despistaje clínico de infecciones en animales de alta valía, ayudando a los médicos veterinarios a obtener un buen diagnóstico diferencial. Por otra parte, la amplitud de la aplicación de las técnicas ensayadas permite su aplicación en otros campos diferentes a los meramente médicos, incluyendo identificación en vegetales, aspectos de fitopatología u otras aplicaciones en el campo agronómico, dada la similitud de los principios de las mismas. Las pretensiones anteriormente esbozadas, nos permite ser optimistas al pensar que una unidad como la que hoy se estrena en la UNESUR, pueda lograr la plena integración entre la institución y su entorno, deseo genuino de todo el que transita el camino de la ciencia a través de la investigación, quien suele expresarse con júbilo cuando sus resultados llegan hasta el sitio donde el problema existe, dándole solución.

Finalmente, debo expresar mi reconocimiento a las autoridades de la UNESUR, quienes a través de la Dirección de Investigación y Postgrado hicieron posible la realización de este primer curso. Asimismo, agradezco el tesón de los colaboradores que me acompañan en esta oportunidad, quienes no han escatimado esfuerzos para que el curso sea recordado con afecto...

Néstor Añez

Coordinador

Junio, 2007.

Utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de tripanosomiasis y anaplasmosis en muestras de sangre de animales domésticos

I.- INTRODUCCION

Las infecciones por hemoparásitos en explotaciones animales de las regiones tropicales del mundo, en general, y de Venezuela, en particular, son causas de pérdidas inestimables en el sector pecuario por el impacto que sobre la salud y reproductividad de los animales domésticos explotados ejercen estas parasitosis. No obstante esta realidad, la detección de tales infecciones se basa fundamentalmente en criterios clínicos y métodos diagnósticos clásicos de baja sensibilidad y especificidad, lo cual dificulta tener idea cierta de la prevalencia e incidencia reales de las dolencias ocasionadas en los rebaños. Entre las hemoparasitosis más comunes en rebaños ganaderos se encuentran la tripanosomiasis causada por *Trypanosoma vivax* y la anaplasmosis producida por *Anaplasma marginale*, las cuales se reconocen entre las entidades nosológicas de mayor importancia económica en nuestro medio rural. Lo anterior pareciera justificar la necesidad de llevar a cabo estudios científicos de relevancia que permitan el desarrollo de investigaciones cuyo producto coadyuve al control de las infecciones referidas. Uno de los aspectos indispensables para cumplir con este objetivo es obtener un diagnóstico certero y efectivo que supere la baja sensibilidad y especificidad de los métodos convencionales empleados hasta el presente (García y Mendoza-León, 2000; Tamasaukas y col., 2000).

Trypanosoma (Duttonella) *vivax* Ziemann (1905), es el agente causal de una de las más importantes hemoparasitosis detectadas en animales ungulados silvestres y domésticos entre los que destacan bovinos, búfalos, cabras, ovejas, camellos y ciervos de países tropicales y subtropicales de Asia, África y América (Sandoval y col., 1996; Tamasaukas y Roa, 1996). A pesar de la amplia gama de hospedadores, es en el bovino donde el curso de la infección ha sido mayoritariamente estudiado

fundamentado quizás en las implicaciones económicas que ocasiona, entre las que se mencionan infertilidad en el ganado y pérdidas basadas en el número de animales afectados por finca, duración del brote, mortalidad, abortos, gastos por tratamiento, asistencia veterinaria, diagnóstico de laboratorio, retardo en el crecimiento y pérdidas en la producción (Guillen y col., 2001). Las manifestaciones clínicas producidas por *T. vivax* son muy variables, observándose desde accesos febriles, emaciación y anemia que pueden ocasionar la muerte hasta infecciones totalmente asintomáticas o subclínicas (Silva y col., 1996). En la transmisión vectorial de *T. vivax*, se incriminan principalmente dípteros hematófagos de los géneros *Glossina*, *Tabanus* y *Stomoxys* (Otte y Abuabara, 1991), aunque la transmisión puede ser llevada a cabo por especies de los géneros *Boophilus*, *Culicoides* y *Psilopelmia* (Rodríguez-Vivas y col., 2003), habiéndose documentado además, transmisión transplacentaria (Meléndez y col., 1993; González y Espinoza, 1994). Los medios más comunes para detectar infecciones por *T. vivax* incluyen los métodos parasitológicos y serológicos. Los primeros, confrontan como inconveniente principal la baja sensibilidad en la medida que la infección tiende a la cronicidad o la parasitemia se mantiene en bajos niveles (De Almeida y col., 1997). Por su parte, los métodos serológicos presentan como principales deficiencias no poder discriminar entre infecciones recientes y pasadas y no diferenciar entre reacciones cruzadas con otros patógenos con los que *T. vivax* comparte similitud antigénica como *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma theileri* (Desquesnes, 1997; Morlais y col., 2001). Recientemente, las técnicas de biología molecular, particularmente la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), ha permitido revelar infecciones en animales sintomáticos o asintomáticos sin parasitemia detectable (Dirie y col., 1993). Diferentes secuencias de ADN y ARN han sido diseñadas a partir de aislados africanos y americanos a fin de obtener mayor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico (Ventura y col., 2001). En relación con la prevalencia de la tripanosomiasis bovina por *T. vivax* en Venezuela, durante la última década se han venido detectando valores de 20,8% al 57,8% por exámenes serológicos e infecciones activas de 1% a 3,9% por exámenes

parasitológicos directos (Toro, 1990; Perrone y col., 1991; Tamasaukas y col., 1996). A pesar de estos hallazgos, el interés por la investigación sobre *T. vivax* es escaso, circunstancia que ha traído como consecuencia que en muchas zonas ganaderas la comprensión de su verdadera epizootiología y el verdadero papel que juega como limitante de la producción bovina sean restringidos (Rivera, 1996). Esto, por supuesto, incluye la región del sur del Lago de Maracaibo, área de influencia de la UNESUR, donde se conoce de la presencia de la dolencia en rebaños de ganado, pero se ignora la prevalencia e incidencia reales en los mismos.

Anaplasma marginale Theiler (1910) es un microorganismo rickettsial causante de la condición patológica denominada anaplasmosis que afecta principalmente a bovinos, bufalinos, camélidos, bisontes, antílopes y venados de las regiones tropicales y sub-tropicales del mundo (Díaz y col.; 2003). *A. marginale* puede ser transmitido biológicamente por garrapatas o mecánicamente en las piezas bucales de insectos hematófagos o por inoculación directa de eritrocitos infectados a animales susceptibles a través de agujas hipodérmicas contaminadas e instrumentos quirúrgicos y, en algunos casos, por vía transplacentaria (Coronado, 1997). Las pérdidas económicas causadas por la anaplasmosis son cuantiosas en la mayoría de los países afectados, atribuibles tanto a factores de morbilidad como de mortalidad (Toro, 1997). En Venezuela, su presencia ha sido señalada en diferentes regiones, representando junto con babesiosis y tripanosomiasis, la triada hemotrópica de mayor importancia que obstaculiza el desarrollo de la industria ganadera (Monsalve, 1997). Los síntomas clínicos son variables, y pueden incluir fiebre, pérdida de peso, descenso en la producción láctea, aborto, letargo, ictericia y palidez de las mucosas; en los casos más graves se observan síntomas nerviosos por anoxia cerebral y tendencia al decúbito que pueden llevar a la muerte (Melman, 2004). En nuestro país, la anaplasmosis es considerada como una enfermedad parasitaria enzootica de amplia distribución, existiendo las condiciones edafoclimáticas para el desarrollo y evolución de sus vectores naturales en casi todas las regiones geográficas. En este

sentido, el “status” epizootiológico de los rebaños puede variar desde una condición de inestabilidad enzootica (bajo porcentaje de animales infectados con alta susceptibilidad a la infección clínica) hasta una condición de estabilidad enzootica (alto porcentaje de animales infectados y baja susceptibilidad del rebaño a enfermar clínicamente) (Toro, 1997). La detección de *A. marginale* empleando métodos parasitológicos directos y serológicos se dificulta por la baja sensibilidad y especificidad que algunas de estas técnicas presentan, situación demostrada con el desarrollo de la PCR y las sondas de ácidos nucleicos (Melman, 2004).

El objetivo fundamental del presente curso es entrenar a los participantes para la detección de ADN circulante de *Trypanosoma vivax* y *Anaplasma marginale* en sangre venosa de bovinos y/o bufalinos obtenida bajo condiciones de campo. El método consiste en utilizar la técnica molecular de PCR con oligonucleótidos especie-específicos para ambos microorganismos, con la esperanza de lograr un diagnóstico de alta sensibilidad y especificidad.

II.- PRINCIPIO DEL METODO

1. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), implica una síntesis continua de ADN *in vitro* combinando en un tubo de ensayo una muestra de ADN problema, oligonucleótidos específicos (o *primers*), desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), una polimerasa (enzima Taq polimerasa) en un tampón apropiado (buffer y MgCl₂) para la elongación de los oligonucleótidos por la polimerasa. Este proceso consta de 3 pasos, con temperaturas y tiempos diferentes repetidos sucesivamente que le permiten a la polimerasa actuar en una sucesión de ciclos sin inactivarse, los cuales se describen a continuación y se pueden apreciar en la Figura 1.

1. *Desnaturalización*: En este paso el templado es sometido a altas temperaturas permitiendo la exposición de la secuencia de ADN blanco de amplificación.

2. *Alineamiento*: Durante esta etapa, la temperatura es disminuida con el fin de que los oligonucleótidos iniciadores (*primers*) reconozcan y se apareen con sus secuencias complementarias presentes en el blanco de la reacción, proporcionando un extremo hidroxilo 3' libre como sustrato para la enzima sintetizadora de ADN (ADN polimerasa).

3. *Extensión, síntesis o elongación*: En esta fase se formará una molécula de ADN por cada oligonucleótido apareado, cuya secuencia es idéntica a la del ADN blanco de amplificación (Fig.1).

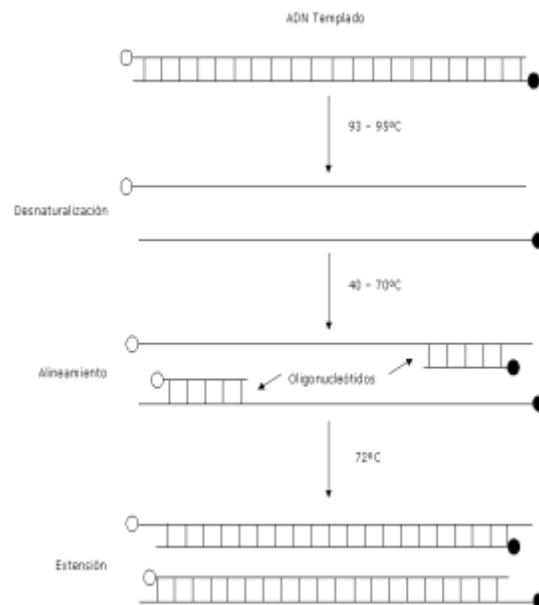


Figura 1. Esquema diagramático de la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR como técnica molecular, posee características especiales que la hace útil en la identificación y diagnóstico debido a su especificidad, sensibilidad, versatilidad, rapidez y accesibilidad. Es eficiente en la detección de un patógeno a nivel de género; caracterización de la especie, complejo o serotipo del organismo presente en una muestra determinada y en la identificación individual de un organismo.

2. PREPARACION DE LA MUESTRA PARA LA EJECUCION DE LA TECNICA DE PCR: EXTRACCION DE ADN

Una vez seleccionada la fuente de ADN, la muestra debe ser sometida a un proceso de extracción de ácidos nucleicos con el fin de preservarlos y evitar la acción degradativa de enzimas u otros compuestos presentes en la misma, además de eliminar sustancias que interfieran o inhiban de alguna manera la reacción de amplificación. En general, los métodos de preparación de muestras buscan separar proteínas y extraer ADN.

Las extracciones de ADN de todos los organismos guardan cierta similitud y consisten en romper las células para liberar su contenido y separar el ADN liberado del resto de los componentes celulares.

3. CORRIDA ELECTROFORETICA EN GEL DE AGAROSA Y VISUALIZACION DE LA REACCION

Una vez terminada la PCR, se realiza una técnica conocida como electroforesis horizontal en gel de agarosa para visualizar los millones de fragmentos de ADN de interés. Esta técnica consiste en armar un gel de agarosa, polisacárido ramificado de unidades D-galactosa y 3,6-anhidro-1-galactosa altamente hidrofóbico, con pequeños huecos en un extremo donde se deposita el contenido del tubo de PCR. El gel es sometido a corriente eléctrica de modo que el ADN, una molécula cargada negativamente, se desplaza por el gel hacia el polo positivo. La matriz formada por la agarosa ofrece una resistencia al movimiento. De esta manera, las moléculas de mayor tamaño tendrán dificultad para pasar por los poros de la matriz, quedándose en la región superior del gel, mientras que los fragmentos de menor tamaño se movilizarán con facilidad, alcanzando su parte inferior (Figura 2). Dependiendo de la concentración de agarosa, la matriz formada permitirá la separación efectiva de diferentes tamaños de ADN. Una vez concluida la electroforesis, se agrega al gel bromuro de etidio, colorante que se intercala entre las bases del ADN y permite

visualizarlo al ser iluminado con luz ultravioleta (UV). Las bandas luminosas corresponden a los fragmentos de ADN amplificados.

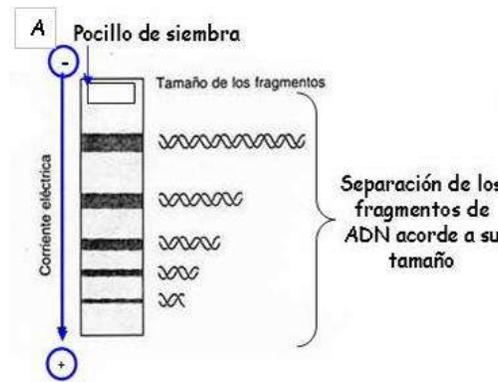


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa para separar y visualizar el fragmento de ADN de interés

III.- MEDIDAS DE SEGURIDAD PARA LA EJECUCION DE LA TECNICA DE PCR

Las diferentes actividades a ejecutar durante el desarrollo de la técnica de PCR, deben ser realizadas en áreas específicas preferiblemente separadas físicamente, con el fin de minimizar el riesgo de contaminación de una reacción previa a la amplificación con ADN o ARN de una muestra o con el producto de amplificación de otra. Estas precauciones son absolutamente necesarias para evitar resultados que pudieran interpretarse como falsos positivos.

En la mayoría de los laboratorios que desarrollan pruebas de amplificación de ADN por la técnica de PCR, se designan tres áreas de trabajo:

1. Área de preparación de muestra
2. Área de preparación de reactivos
3. Área de corrida de electroforesis

Es de suma importancia respetar la ubicación de reactivos, muestras y pipetas en cada una de estas áreas. El éxito de las pruebas y la pulcritud de los resultados dependerá del cuidado que se tenga en evitar la contaminación de las muestras.

Una vez preparadas las muestras como lo indican los protocolos, según sea el caso en el área de preparación de muestra, se procederá a montar la reacción de amplificación utilizando los reactivos y las concentraciones descritas para cada ensayo. El montaje de la reacción se hará en el área de preparación de reactivos. Dependiendo del perfil del laboratorio, el manejo de la muestra con pipetas escogidas para tal fin deberá efectuarse en una campana de flujo laminar estéril. En su defecto en campanas de extracción con las debidas precauciones.

IV.- ALCANCE DE LA TECNICA DE PCR DURANTE EL CURSO

Se pretende la detección de ADN específico de *Trypanosoma vivax* y *Anaplasma marginale* en sangre venosa de rumiantes empleando los oligonucleótidos TviSL1/TviSL2 y BAP-2/AL34S respectivamente, en un intento por establecer un medio diagnóstico altamente confiable dada su especificidad y sensibilidad.

V.- INFRAESTRUCTURA NECESARIA PARA LA EJECUCION DE LA TECNICA DE PCR

ESPACIO FISICO: Como se indica arriba con red eléctrica de 110v.

EQUIPOS:

- Micropipetas 2µl - 200µl
- Centrifuga
- Microcentrifuga
- Balanza
- pH-metro
- Vortex
- Congelador -20°C
- Estufas 65°C
- Nevera 4°C
- Horno microondas

- Termociclador
- Fuente de poder
- Cámara para electroforesis (pequeña, para peine de 10 pozos)
- Transiluminador

MATERIALES:

- Jeringas de 20ml
- Aguja 19Gx1½
- Tubos plásticos de centrifuga 15ml
- Tubos plásticos estériles 1,5ml
- Tubos plásticos para mezcla de reacción PCR (200µl)
- Puntas para micropipetas 10µl y 200µl
- Fiolas
- Vasos de precipitado
- Cilindros graduados

MATERIAL BIOLÓGICO:

- Sangre venosa de rumiantes recolectada bajo condiciones de campo
- Aislados de *T. vivax* y *A. marginale*

VI.- REACTIVOS

Anticoagulante:

- Citrato de sodio al 3,8%

Extracción ADN:

Kit de Purificación ADN

- Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)
- Isopropanol 100%
- Etanol 70%

Protocolo Buffer de lisis-Proteinasa K

- Buffer de lisis
 - Tris base 10mM
 - NaCl 150 mM
 - pH 7,5
- Proteinasa K
- Fenol
- Cloroformo
- Alcohol isoamílico
- Etanol 100%
- Etanol 70%
- Mezcla de reacción PCR:
- Agua destilada megapura estéril (H₂O_d)
- Buffer 5X
- MgCl₂ 25mM
- dNTPs 10mM
- Oligonucleótido TviSL1 61,0 nmoles [5´-GCT CTC CAA TCT TAA CCC TA - 3´]
- Oligonucleótido TviSL2 42,4nmoles [5´-GTT CCA GGC GTG CAA ACG TC - 3´]
- Oligonucleótido BAP-2 37,4 nmoles [5´-GTA TGG CAC GTA GTC TTG GGA TCA-3´]
- Oligonucleótido AL34S 40,3 nmoles [5´-CAG CAG CAG CAA GAC CTT CA- 3´]
- Taq polimerasa 5U/μl

Corrida electroforética:

- Agarosa
- Tampón tris-borato EDTA (TBE) 10X

Tris base

Acido bórico

EDTA 0,5M pH 8,0

Acido acético glacial

- Marcador de peso molecular 100pb
- Bromuro de etidio (BrEt)

VII.- PREPARACION DE SOLUCIONES

1. Buffer de lisis

REACTIVO	CANTIDAD	CONCENTRACIÓN FINAL
Tris base	5ml	10 mM
NaCl	4.35g	150 mM
H ₂ Od	500ml	-

Una vez medidos y pesados los reactivos, disolver los componentes en H₂Od y ajustar el pH a 7,5.

2. Tampón tris-borato EDTA (TBE) 10X

REACTIVO	CANTIDAD	CONCENTRACIÓN FINAL
Tris base	108g	0.045M
Acido bórico	55g	-
EDTA 0,5M pH 8,0	40ml	0.001M
H ₂ Od	1000ml	-

Una vez medidos y pesados los reactivos, disolver los componentes en H₂Od y ajustar el pH a 7,4 con ácido acético glacial. Esta solución será empleada como

stock. Para preparar los geles de agarosa y realizar la corrida electroforética, se empleará TBE 1X preparado con 50 ml TBE 10X y 450 ml H₂O.

3. Agarosa

3.1. Agarosa al 2%

REACTIVO	CANTIDAD	CONCENTRACION FINAL
Agarosa	1.0g	2%
Tampón tris-borato EDTA (TBE) 1X	50ml	-

3.2. Agarosa al 1.5%

REACTIVO	CANTIDAD	CONCENTRACION FINAL
Agarosa	0.75g	1.5%
Tampón tris-borato EDTA (TBE) 1X	50ml	-

Pesar los gramos de agarosa señalados y agregar en fiola. Añadir el volumen de buffer de corrida TBE 1X especificado para cada caso, mezclar y llevar a horno microondas potencia 4 durante 3 minutos evitando la evaporación tapando el envase con un tapón de algodón. Agitar levemente a fin de homogeneizar la solución. Dejar enfriar la solución hasta alcanzar aproximadamente 55°C. Preparar el molde de la cámara electroforética con su respectivo peine y servir la agarosa en el molde. Dejar gelificar sobre superficie lisa a temperatura ambiente (aproximadamente 15 minutos). Llevar a nevara 4°C y mantener almacenada hasta el momento de realizar la corrida electroforética.

4. Bromuro de etidio (BrEt)

REACTIVO	CANTIDAD	CONCENTRACIÓN FINAL
Bromuro de etidio	50mg	0,5g/ml
H ₂ Od	100ml	-

Almacenar a 4°C, protegido de la luz. El reactivo de trabajo para la coloración de los geles debe tener una concentración de 0,5µg/ml, por lo que al momento de su uso debe realizarse una dilución 1:1000 en H₂Od. El BrEt es mutagénico y debe ser manipulado cuidadosamente.

VIII.- PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

1. Toma y conservación de la muestra problema

La muestra de ADN problema para el ensayo de PCR será tomada a partir de la sangre venosa de un rumiante bajo condiciones de campo, para ello, previa inmovilización del animal, se procede a realizar asepsia de la región yugular con alcohol 70%. Seguidamente, se realiza la punción venosa utilizando aguja 19Gx1½ e inyectora de 20ml para luego recoger la sangre en tubo plástico de centrifuga de 15ml, en dilución 1:9 con el anticoagulante. La muestra debidamente rotulada es transportada en frío con la mayor prontitud al laboratorio para el análisis respectivo*.

*: Otras formas de toma de muestra incluyendo papel de filtro, láminas portaobjetos y tubos capilares, serán analizadas durante el curso.

2. Control positivo y negativo

ADN de muestras de animales que han resultado positivos o negativos a cada hemoparásito de interés mediante el empleo de técnicas parasitológicas directas y moleculares son empleados como controles para la reacción de PCR.

3. Preparación de muestras biológicas para ensayos de amplificación

3.1. Extracción del ADN de muestras

3.1.1. Extracción de ADN para el diagnóstico de *Trypanosoma vivax*

Cada muestra problema anticoagulada mantenida en frío es sometida a un proceso de centrifugación a 800g durante 10min para lograr la separación de las capas celulares del plasma sanguíneo. Seguidamente se procede a tomar 400µl de la interfase sanguínea y depositarlos en un tubo de centrifuga de 1,5ml para proceder a la extracción del ADN de cada muestra empleando el kit de purificación siguiendo las especificaciones descritas a continuación:

3.1.1.1. Añadir 900µl de solución de lisis celular al tubo conteniendo la muestra y mezclar por inversión 5-6 veces.

3.1.1.2. Incubar 10 min a temperatura ambiente, invirtiendo 2-3 veces los tubos durante la incubación.

3.1.1.3. Centrifugar a 1400g durante 2 min a temperatura ambiente.

3.1.1.4. Separar el sobrenadante sin interferencias del sedimento (aprox. 10-20µl de líquido).

3.1.1.5. Vortex vigoroso del tubo hasta resuspender (10-15 seg)

3.1.1.6. Añadir 300µl de solución nucleótido al tubo conteniendo las células resuspendidas y pipetear la solución 5-6 veces hasta lograr la lisis de las células blancas. La solución puede ser muy viscosa. Si cúmulos de células son muy visibles deshacerlos incubando a 37°C hasta que desaparezcan.

3.1.1.7. Añadir 100µl de solución de precipitación de proteínas y vortex durante 10-20 seg. Después de esto, pueden ser visibles pequeños cúmulos de proteínas.

3.1.1.8. Centrifugar 1400g durante 3 min. Un pellet marrón puede ser visible.

3.1.1.9. Transferir el sobrenadante a otro tubo conteniendo 300µl de isopropanol 100%.

3.1.1.10. Mezclar por inversión hasta que sea visible la masa de ADN.

3.1.11. Centrifugar a 1400g durante 1 min. El ADN es visible.

3.1.12. Descartar el isopropanol y añadir 1 volumen de etanol 70%. Invertir el tubo suavemente hasta lavar el ADN.

3.1.13. Centrifugar como en 3.11.

3.1.14. Aspirar el etanol con pipeta con mucho cuidado para no aspirar el ADN.

3.1.15. Invertir el tubo en papel absorbente y dejar secar a temperatura ambiente 10-15 min.

3.1.16. Añadir 100µl de solución de rehidratación de ADN y almacenar toda la noche en nevera a 4°C.

3.1.2. Extracción de ADN para el diagnóstico de *Anaplasma marginale*

De la muestra problema centrifugada en el paso 3.1.1, tomar 500µl del concentrado celular rojo y depositarlos en un tubo de centrifuga de 1,5ml para proceder a la extracción del ADN de la muestra empleando el proceso de purificación descrito a continuación:

3.1.2.1. Añadir 500µl de buffer de lisis y 5µl de proteinasa K al tubo de centrifuga. Mezclar por inversión e incubar durante 2 horas en estufa a 65°C.

3.1.2.2. Transcurrido el tiempo, inactivar la proteinasa K, calentando la muestra a 100°C.

3.1.2.3. Centrifugar a 1500g durante 15 min y trasvasar el sobrenadante a otro tubo de centrifuga de 1,5ml.

3.1.2.4. Añadir 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Mezclar por inversión, reposar durante 2 min y centrifugar a 1500g durante 3 min.

3.1.2.5. Tomar con pipeta automática el sobrenadante y pasarlo a otro tubo de centrifuga de 1,5ml. Repetir el paso 3.2.4 en caso de ser necesario.

3.1.2.6. Añadir 2,5 volúmenes de etanol 100%, mezclar por inversión e incubar durante 12 horas a temperatura de -20°C.

3.1.2.7. Centrifugar a 1500g durante 10 min. Luego de este tiempo es observado el pellet de ADN. Descartar cuidadosamente el sobrenadante y dejar secar el tubo en posición invertida durante 10 min.

3.1.2.8. Añadir 2,5 volúmenes de etanol 70%, centrifugar durante 5 min a 1500g. Transcurrido este tiempo, descartar cuidadosamente el sobrenadante y dejar secar como en 3.2.7.

3.1.2.9. Añadir 80µl de H₂O_d, disolver y dejar en nevera 4°C durante 12 horas antes de montar la reacción.

4. Mezcla de reacción y condiciones de ciclaje

4.1. MEZCLA DE REACCION PARA *T. vivax* (Ventura y col; 2001)

REACTIVO	CONCENTRACION INICIAL	VOLUMEN POR REACCION (µl)
H ₂ O _d	-	18,25
Buffer	5X	2,5
MgCl ₂	1,5mM	1,5
dNTPs	200µM	0,5
Oligo TviSL1	20µM	1,0
Oligo TviSL2	20µM	1,0
Taq polimerasa	2,5U/µl	0,25
Templado	-	5,0
Total		25,0

4.2. MEZCLA DE REACCION PARA *A. marginale* (Stich y col; 1993)

REACTIVO	CONCENTRACION INICIAL	VOLUMEN POR REACCION (µl)
H ₂ O d	-	12,25
Buffer	1X	5,0
MgCl ₂	3,5mM	3,5
dNTPs	0,8µM	2,0
Oligo BAP-2	1,8µM	1,0
Oligo AL34S	1,8µM	1,0
Taq polimerasa	2,5U/µl	0,25
Templado	-	5,0
Total		25,0

Realizar cálculos matemáticos de volumen por reacción de PCR para un total de 4 reacciones para cada microorganismo, incluyendo muestra problema, control positivo, control negativo y control de reacción (blanco sin ADN).

CONDICIONES DE CICLAJE

CONDICIONES DE CICLAJE PARA *T. vivax*

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO
desnaturalización inicial	94	1min
DESNATURALIZACION	94	1min
ALINEAMIENTO	65	2min
EXTENSION	72	3min
extensión final	72	10min
TOTAL		35 ciclos

CONDICIONES DE CICLAJE PARA *A. marginale*

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO
desnaturalización inicial	94	3min
DESNATURALIZACION	94	1min
ALINEAMIENTO	60	1min
EXTENSION	72	0,5min
extensión final	72	3min
TOTAL		32 ciclos

5. Corrida electroforética y visualización de la reacción

Para visualizar los productos de PCR después de la amplificación, se emplea la electroforesis en gel de agarosa al 2% y 1,5% para los productos de TviSL1/TviSL2 y BAP-2/AL34S respectivamente y luz ultravioleta, que permiten corroborar que el producto amplificado corresponde al peso molecular esperado.

5.1. Para ello, el gel de agarosa es sacado de refrigeración y colocado en la cámara electroforética conteniendo buffer TBE 1X. Retirar cuidadosamente el peine.

5.2. Tomar 10µl de cada amplificado y depositarlo en los pozos del gel en el siguiente orden: peso molecular, control positivo, ADN muestra problema, ADN control negativo y control de reacción.

5.3. Conectar a fuente de poder y correr a un voltaje constante de 100 voltios por 35 min aproximadamente, tiempo en el que el primer frente alcanza las $\frac{3}{4}$ partes del gel.

5.4. Colorear con BrEt por 5 min seguido de una decoloración en H₂O_d por 20 min.

5.5. Colocar el gel sobre el transiluminador que permite visualizarlo bajo UV.

El fragmento amplificado debe corresponder a una banda aproximada de 210 pb, para el control positivo de *T. vivax* y 409 pb para *A. marginale*, empleando como referencia, la banda de 500 pb del marcador de peso molecular.

IX. REFERENCIAS

1. Bolívar A.M; García-Lugo P.; Crisante G.; Rojas A.; Teixeira M.M.G.; Añez, N. 2006. Detección de infecciones subclínicas por *Trypanosoma vivax* en bovinos de fincas ganaderas de Mérida, Venezuela. Boletín de Malariología y Salud Ambiental XLVI(1):87-90.
2. Bolívar, A.M.; Reyna-Bello A.; García, F.; García-Lugo, P.; Crisante, G.; Rojas, A.; Añez, N. 2007. Uso de proteínas como alternativa diagnóstica para discriminar infecciones entre *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi*. Boletín de Malariología y Salud Ambiental XLVII(1):21-26.
3. Coronado, A. 1997. Transmisión de *Anaplasma Marginale*, Theiler, 1910. Memorias. ASODEGAA. El Vigía-Venezuela.
4. Crisante, G. 2000. Pruebas confirmatorias para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. En: La Enfermedad de Chagas. Innovaciones diagnósticas para el nuevo milenio. Ed. Añez, N. & Crisante, G. Universidad de Los Andes, Mérida. Venezuela.
5. De Almeida, P.; Ndao, M.; Van Meirvenne, N.; Geets, S. 1997. Diagnostic evaluation of PCR in goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. Acta Tropica, 66:45-50.
6. Desquesnes, M. 1997. Evaluation of a simple PCR technique for the diagnosis of *Trypanosoma vivax* infection in the serum of cattle in comparison to parasitological techniques and antigen-enzyme-linked immuno sorbent assay. Acta Tropica, 65:139-148.
7. Díaz, D.; Valera, Z.; de Andrade E.; Parra O.; Escalona, F.; Ramirez, R. 2003. Prevalencia de *Anaplasma marginale* en bovinos del sector La Piñata, Municipio La Cañada de Urdaneta, Estado Zulia, Venezuela. Rev. Cientif. FCV-LUZ. XIII(3):193-198.
8. Dirie, M.; Otte, M.; Thatthi, R.; Gardiner, P. 1993. Comparative studies of *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* isolates from Colombia. Parasitol. 106:21-29.
9. García, H.; Mendoza-León, A. 2000. Diagnóstico molecular en protozoarios Kinetoplastida. Principios y aplicaciones. Rev. Fac. Cs. Vets. UCV. 41:109-130.
10. González, N.; Espinoza, E. 1994. Transmisión transplacentaria del *Trypanosoma vivax* y su efecto sobre la descendencia de hembras gestantes infectadas experimentalmente. Vet. Trop. 19:41-53.

11. Guevara, P. 2002. Diagnóstico molecular de Leishmania, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*. 2002. En: Programa especial XX Aniversario Centro "J.W.T". Trujillo. Venezuela.
12. Guillén, A.; León, E.; Aragot, W.; Silva, M. 2001. Diagnóstico de hemoparásitos en el Instituto de Investigaciones Veterinarias Periodo 1986-2000. *Vet. Trop.* 26(1):47-62.
13. Identificación y diagnóstico molecular de microorganismos. Manual de laboratorio. 2004. Proyecto Iniciativa Científica del Milenio. Red de Innovación Tecnológica IDMM.
14. Meléndez, R.; Forlano, M.; Figueroa, W. 1993. Perinatal infection with *Trypanosma vivax* in a calf in Venezuela. *J. Parasitol.* 79:293-294.
15. Melman S.; Hartt, Y.; Giardina, S. 2004. El uso de la biología molecular en el diagnóstico de *Anaplasma marginale*. Laboratorio de Bioquímica e Inmunología de Hemoparásitos. Departamento de Biología Celular, Universidad Simón Bolívar. Caracas-Venezuela.
16. Monsalve, F. 1997. Conductas a seguir frente a un brote de hemoparásitos y aportes farmacológicos para el tratamiento de la babesiosis, anaplasmosis y tripanosomiasis en Venezuela. Memorias. ASODEGAA. El Vigía-Venezuela.
17. Morlais, I.; Ravel, S.; Grébaud, P.; Dumas, V.; Cuny, G. 2001. New molecular marker for *Trypanosoma (Duttonella) vivax* identification. *Acta Tropica*, 80:207-213.
18. Otte, M.; Abuabara, J. 1991. Transmission of South America *Trypanosoma vivax* by the neotropical horsefly *Tabanus nebulosus*. *Acta Tropica*. 49:73-76.
19. Perrone, T.; Lesseur, C.; Reveron, I.; Espinoza, E.; Aso, P. 1991. Análisis seroepidemiológico de la tripanosomiasis bovina en la zona de Santa María de Ipire. *Acta Cient. Venezol.* 42(Supl.1):208.
20. Rivera, M. 1996. Hemoparasitosis bovinas: tripanosomiasis. UCV-Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. 15-84 pag.
21. Rodríguez-Vivas, R.; Quiñónez-Avila, F.; Ramírez-Cruz, G; Ruiz-Piña, H. 2003. Presencia del género *Trypanosoma* en la garrapata *Boophilus microplus* en el trópico mexicano. *Rev. Biomed.* 14:29-33.

22. Sandoval, E.; Espinoza, E.; Valle, A. 1996. Leucopenia y trombocitopenia en ovejas infectadas experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. Vet. Trop. 21:13-33.
23. Silva, R.; Da Silva, J.; Schneider, R.; Freitas, J.; Mesquita, D.; Mesquita, T.; Ramirez, L.; Rivera, A.; Barbosa, M. 1996. Outbreak of Trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in Bovines of the Pantanal, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 91:561-562.
24. Stich R.; Bantle J.; Kocan K.; Fekete A. 1993. Detection of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Hemolymph of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) with the Polymerase Chain Reaction. Journal of Medical Entomology. 30(4):781-788.
25. Tamasaukas, R.; Aguirre A., Ron J., Roa N.; Cobo M. 2000. Tetralogía hemoparasitaria en algunas fincas bovinas del Municipio Santa Rita, Estado Guárico, Venezuela. Rev. Fac. Cs. Vets. UCV. 41:101-108.
26. Tamasaukas, R.; Roa, N. 1996. Trypanosomiasis bovina (*T. vivax*): una revisión. Maracay. Venezuela. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. 64 pag.
27. Tamasaukas, R.; Ruiz, H.; Baldizan, A.; Gonzalez, A.; Aguirre, A. 1996. Seroprevalencia relativa general debida al *Trypanosoma vivax* en fincas de la región central de Venezuela. Acta Cient. Venezol. 48(Supl.1):71.
28. Toro, M. 1990. Seroepidemiología de las hemoparasitosis en Venezuela. Curso sobre técnicas de inmunodiagnóstico de enfermedades causadas por hemoparásitos. USB-FCV-UCV. Mimeo. 12 pag.
29. Toro, M. 1997. Epizootiología y métodos de control de la anaplasmosis. En: Taller sobre agentes hemotrópicos tripanosomiasis-babesiosis-anaplasmosis. Memorias. ASODEGAA. El Vigía-Venezuela.
30. Ventura, R.M; Paiva F.; Silva R.A.M.; Takeda G.; Buck G.; Teixeira M.M.G. 2001. *Trypanosoma vivax*: Characterization of the spliced-leader gene¹ of a brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of a intergenic spacer sequence. Exper. Parasitol., 99:37-48.