

COMUNICACIÓN CORTA

Detección de agentes hemotrópicos en una explotación ganadera utilizando PCR y DGGE

Ana María Bolívar^{I,II}, Agustina Rojas^{I,III}, Datty Rosales^I, Yzoleth Torres^I, Pablo García-Lugo^I

^ILaboratorio de Biotecnología «Sixto David Rojo». Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela.

Correo electrónico: ambolivar@hotmail.com. ^{II}Investigaciones Parasitológicas «Jesús Moreno Rangel»

Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela. ^{III}Investigaciones Parasitológicas «J. F. Torrealba» Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela.

RESUMEN: La siguiente investigación presenta los resultados de las evaluaciones diagnósticas, realizadas por PCR, para agentes hemotrópicos, en ganado bufalino y bovino (n=77), coexistentes en una misma explotación agropecuaria. Se obtuvo una positividad de 74,03% de infección hemoparásita para el total de la población estudiada, con predominio de *Anaplasma marginale* sobre *Trypanosoma theileri*, *Trypanosoma vivax* y *Babesia bigemina*, respectivamente. Adicionalmente, algunos de los ADN problema fueron ensayados por DGGE, revelando la presencia de *A. marginale* y *Mycoplasma wenyonii*. Los resultados obtenidos corroboran la clínica presuntiva y el valor del método molecular.

Palabras clave: ganado vacuno, ganado bufalino, hemotrópicos, PCR, DGGE.

Detection of hemotropic agents in a livestock farm using PCR and DGGE

ABSTRACT: This paper reports the results of a diagnostic evaluations by PCR for hemotropic agents in buffalo and cattle (n=77), existing in the same farm. There was a positivity of 74.03% of hemoparasite infection for the total population studied, prevailing *Anaplasma marginale* on *Trypanosoma theileri*, *Trypanosoma vivax* and *Babesia bigemina*, respectively. Additionally, some DNA problems were tested by DGGE, revealing the presence of *A. marginale* and *Mycoplasma wenyonii*. The results obtained confirm a presumptive clinical situation and the validity of the molecular method.

Key words: cattle, buffalo, hemotropic agents, PCR, DGGE.

En la geografía venezolana el desarrollo ganadero ha debido su auge principalmente a la explotación del vacuno (*Bos* spp); sin embargo, numerosas explotaciones han cedido espacio para la producción del búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) (1,2). La aparente resistencia bufalina pudiera estar actuando negativamente en ecosistemas de explotación donde ambos comparten hábitat, al actuar como reservorio de numerosos patógenos (3), entre ellos los pertenecientes a los denominados agentes hemotrópicos (4), planteando un panorama de riesgo entre poblaciones altamente susceptibles (5,6,7). Técnicas diagnósticas moleculares pueden proveer información directa y precisa sobre estos agentes, pudiendo llegar a ser considerados los métodos más rentables para la detección, en comparación con los métodos tradicionales (5,8,9).

Teniendo en cuenta lo antes señalado, nos propusimos exponer los hallazgos obtenidos al emplear las técnicas PCR y DGGE a partir de ADN extraído de sangre de vacunos y bufalinos provenientes de una misma explotación ganadera.

Fueron muestreados 66 búfalas y 11 vacunos (n=77), provenientes de una explotación semi-intensiva lechera localizada en el Municipio Obispo Ramos de Lora, Parroquia El Guamo, Mérida-Venezuela (al sur de la capital del estado), por presentar pérdida de la condición corporal según valoración médica veterinaria especializada. La muestra incluyó sangre venosa sin anticoagulante, ya que los animales precisaban valoración serológica para *Brucella abortus*. Las muestras se obtuvieron por punción yugular, utilizando sistema vacutainer y siguiendo los procedimientos recomenda-

TABLA 1. Protocolos de PCR para la detección de hemotrópicos./ *PCR protocols for the detection of hemotropic agents.*

Especie	Primers	Producto esperado (pb)	Referencia
<i>Trypanosoma vivax</i>	ILO-1264 / ILO-1265	400	Masake <i>et al.</i> (8)
<i>Trypanosoma theileri</i>	Tth625a / Tth625b	500	Rodrigues <i>et al.</i> (11)
<i>Anaplasma marginale</i>	BAP-2 / AL34S	409	Stich <i>et al.</i> (12)
<i>Babesia bigemina</i> / <i>Babesia bovis</i>	BiIA-BiIB / BoF-BoR	278 / 350	Figuroa <i>et al.</i> (13)

dos de asepsia y manipulación/mantenimiento hasta su llegada al laboratorio. Los protocolos técnicos empleados para la amplificación por PCR se listan en la Tabla 1.

De cada coágulo sanguíneo, se tomó un volumen equivalente a 300 µl, siendo añadidos 300 µl de buffer de lisis y 5 µl de proteinasa K en solución, incubando a 56°C (3 horas). La extracción de ADN se realizó por el clásico procedimiento con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (10). Las amplificaciones fueron ejecutadas en un termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf en un volumen final de reacción de 25 µl, conteniendo buffer Flexi GoTaq 5X, 25mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTPs, 2,5 U/µl Taq ADN polimerasa, *primers* en concentración detallada en cada protocolo y 3 µl de ADN. Como controles positivos se emplearon ADN genómicos para cada agente a evaluar, mientras que como control negativo se incluyó blanco de reacción.

Tres de los ADN extraídos fueron evaluados mediante DGGE (set de *primers* universales para bacterias) (14). La corrida se realizó durante 12 horas a 100 voltios y temperatura constante de 60°C en un equipo Bio-Rad utilizando geles de acrilamida al 8% (acrilamida:bis-acrilamida 37:5:1 (v/v)), con un gradiente de desnaturalización de 40 a 80% (obtenido de una mezcla de urea: 42,16% y formamida: 40% en 100% desnaturalizante). Concluida la electroforesis, bandas de ADN fueron cortadas y mantenidas durante 48 horas a 4°C en tubos cónicos de 1,5ml conteniendo 50µl de agua destilada. Bajo estas condiciones el ADN eludió y se amplificó nuevamente (volumen final de reacción 50µl). Evidenciada la presencia de producto, el restante fue enviado a secuenciar (MacroGen-USA). La secuencia nucleotídica obtenida se analizó mediante el programa Blast, determinando la identidad de los microorganismos por comparación con la data existente en NCBI.

El diagnóstico por PCR evidenció 57 bovinos (74,03%) positivos a hemotrópicos. La Tabla 2 muestra los animales que resultaron positivos y la distribución por agente. *A. marginale* (54,54%) resultó la especie predominante en ambos ganados, en búfalas

seguida en orden decreciente por *T. theileri* (22,07%), *T. vivax* (19,48%) y *B. bigemina* (10,38%). Un solo animal (búfala identificada como 124) presentó positividad para 4 de los 5 microorganismos investigados por PCR (*T. vivax* + *T. theileri* + *A. marginale* + *B. bigemina*). En cuanto a asociaciones, resalta en búfalas los binomios *T. vivax* + *A. marginale* y *T. theileri* + *B. bigemina*. En ningún animal hubo amplificación de ADN para *B. bovis*.

El resultado de la secuenciación de los productos aislados por DGGE, evidenció la presencia de *Mycoplasma wenyonii* en dos muestras. Para el tercer ADN analizado por la misma técnica, se halló similitud a *A. marginale* (cepa KNP/120/b previamente identificada por este método). Para una banda obtenida cercana a los 200pb no hubo identidad con ninguna de las secuencias existentes en la base de datos. La Figura muestra los resultado DGGE para dos de los ADN ensayados.

En la ganadería bovina tradicionalmente la terminología hemotrópico ha sido atribuida a las infecciones ocasionadas por *T. vivax*, *A. marginale*, *B. bigemina* y/o *B. bovis*. Sin embargo, la utilización de herramientas diagnósticas con alto grado de sensibilidad y especificidad como las aquí expuestas, pudieran servir para aumentar el número de posibilidades a nuevos agentes, permitiendo la inclusión de microorganismos como *T. theileri* y *M. wenyonii* u otro según la realidad epidemiológica de cada zona estudiada. De tal modo que adicional al poder discriminatorio, estos métodos pudieran inducir potenciales panoramas de riesgo en poblaciones susceptibles.

La patogenicidad de *T. theileri*, tradicionalmente, ha sido cuestionada (su presencia tiende a no ser justificada), desconocimiento posiblemente debido a un supuesto bajo impacto epidemiológico. Si bien los búfalos pueden ser reservorios para este parásito, numerosos reportes sugieren que para el vacuno y otras especies de ungulados bajo compromiso inmunológico pudiera ser considerado patógeno. Su presencia ha sido descrita en animales con reducción en la producción lechera, anemia, inapetencia y pérdida de peso (11, 15, 16). Según los datos reportados, es neces-

TABLA 2. Distribución de positividad a hemotrópicos a partir de los protocolos de PCR aplicados en el estudio./ *Positivity distribution to hemotropic agents with the PCR protocols used in the study.*

VACUNOS				
	<i>T. vivax</i>	<i>T. theileri</i>	<i>A. marginale</i>	<i>B. bigemina</i>
254			+	
148			+	
99				
02			+	
92		+		
30	+			
BÚFALAS				
	<i>T. vivax</i>	<i>T. theileri</i>	<i>A. marginale</i>	<i>B. bigemina</i>
50			+	
07155			+	
276	+	+		
111	+		+	
166	+		+	
77			+	
0312			+	
1067			+	
36	+		+	
441		+		+
211		+	+	
0			+	
138		+	+	+
18			+	
27			+	
1008		+		+
101		+		+
61			+	
53	+		+	
090	+		+	
29		+		
128	+	+		
110			+	
080		+	+	
086		+	+	
193			+	
132	+		+	
151			+	
241	+	+		
91		+		+
104			+	
30			+	
26			+	
1704		+		
3			+	
171	+		+	
267	+			
28			+	
218			+	
124	+	+	+	+
121		+		
59		+		+
134				+
745			+	
2			+	
279	+		+	
2131	+		+	
141			+	
87			+	
149			+	
17			+	
015			+	

rio reevaluar su patogenicidad en ganaderías mixtas, ya que el búfalo pudiera ser responsable de facilitar infecciones oportunistas por *T. theileri* en áreas donde coexiste con el vacuno.

Sugerimos continuar estudios moleculares por DGGE, a fin de diagnosticar nuevas infecciones que como la reportada para *M. wenyonii*, pudieran dar respuesta a un continuo historial de enfermedad hemotrópica.

AGRADECIMIENTOS

Estudio financiado parcialmente por el proyecto FA-532-13-01-B (CDCHTA-ULA). Se agradece la colaboración del Sr. A.D al facilitarnos el estudio en su unidad productora y de la Ing. M.V. Bolívar en la revisión del manuscrito.

REFERENCIAS

1. Rajput Z, Hu S, Arijo A, Habib M, Klalid M. Comparative study of *Anaplasma* parasites in tick carrying buffaloes and cattle. J Zhejiang Univ Sci B. 2005;6(11):1057-1062.
2. Prada G, Crespo J. Determinación taxonómica de hemoparásitos y su prevalencia en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) en el Magdalena Medio, Colombia. Revista de Investigación. 2006;6(1):67-73.
3. Carrero, J. Búfalo asiático: un recurso inexplorado para producir proteína animal. DIANCO. 2000. Táchira, Venezuela.
4. García H, Pérez H, Luis L, Mendoza-León A. Detección diferencial de *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma vivax* mediante un ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa. Res Fac Cs Vets UCV. 2003; 44 (2):117-130.
5. García H, Rangel-Rivas A, Contreras I, García M, García F, Perrone T. Caracterización molecular de *Trypanosoma vivax* en ovinos naturalmente infectados en dos hatos de los municipios San Fernando y Biruaca, Estado Apure, Venezuela. Rev Cient FCV-LUZ. 2009; 29(3):230-237.
6. Cortes J, Betancourt J, Echeverri J, Argüelles J, Pulido L. Distribución de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos y fincas del Altiplano cundiboyacense (Colombia). Corpoica Cienc Tecnol Agropecu. 2010; 11(1):73-84.

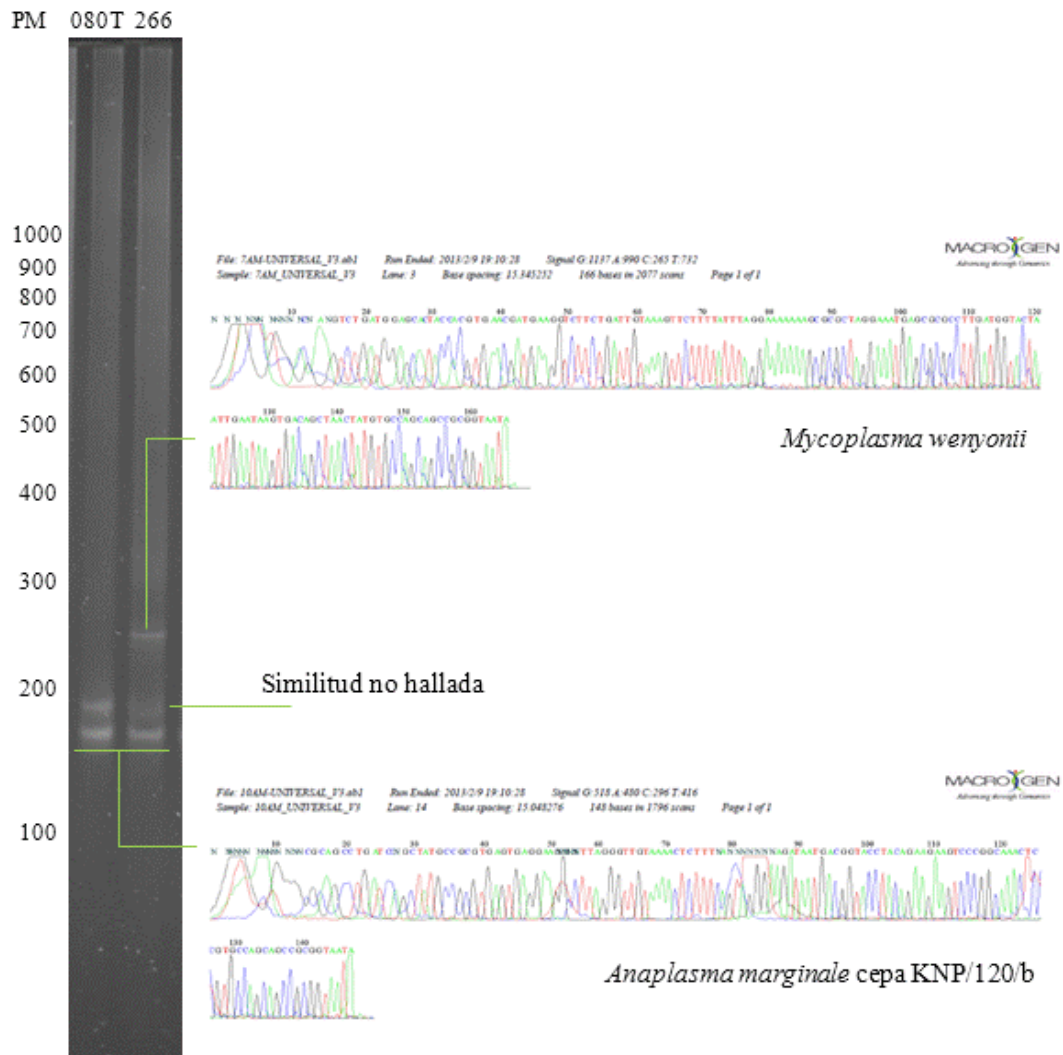


FIGURA. Detección de agentes hemotrópicos en ganado. Resultados DGGE y secuenciación./ *Detection of Hemotropic agents in cattle. DGGE results and sequencing.*

7. Monzón C, Mancebo O, Jiménez J. *Trypanosoma vivax* en búfalos (*Bubalus bubalis*) en Formosa, Argentina. *Veterinaria Argentina*. 2010; 27(268):1-4.
8. Masake R, Majiwa P, Maloo S, Makau J, Njuguna J, Maina M, Kabata J, Ole-Moi Yoi O, Nantulya V. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. *Exp Parasitol*. 1997 Feb; 85(2):193-205.
9. Miranda M, Gonzales J. Evaluación epidemiológica de la tripanosomiasis bovina en el Pantanal de San Matías (En el Municipio de San Matías, Provincia Ángel Sandoval, Departamento de Santa Cruz). [tesis]. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Bolivia; 2004.
10. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis, T. *In vitro* amplification of DNA by the PCR. In: *Molecular cloning, a laboratory manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA E.3-E.4; E.10-E11pp. 1989.
11. Rodrigues A, Campaner M, Takata C, Dell' Porto A, Milder R, Takeda G, Teixeira M. Brazilian isolates of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA

- sequences. *Vet Parasitol.* 2003 Oct; 116(3):185-207.
12. Stich R, Bantle J, Kocan K, Fekete A. Detection of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in hemolymph of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) with the Polymerase Chain Reaction. *J Med Entomol.* 1993; 30(4):781-788.
 13. Figueroa J, Chieves P, Johnson G, Buening G. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet Parasitol.* 1993 Oct; 50(1-2):69-81.
 14. Muyzer G, De Waal E, Uitertlinden A. Profiling of complex microbial populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 1993 Mar; 59(3):695-700.
 15. Villa A, Gutiérrez C, Gracia E, Moreno B, Chacón G, Varela P, Büscher P, Touratier L. Presence of *Trypanosoma theileri* in Spanish Cattle. *Ann NY Acad Sci.* 2008 Dec; 1149:352-354.
 16. Yen-Feng L, Ching-Chang C, Nai-Nu L, Shih-An L, Kwong-Chung T, Yung-Tsung C. Isolation of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* from dairy cattle in Taiwan *J Vet Med Sci.* 2010 Apr; 72(4): 417-424.
- Recibido: 27-8-2013.
Aceptado: 15-12-2013.