

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA BIOTECNÓLOGA

“Determinación de la presencia de hemotrópicos en equinos provenientes de dos provincias del Ecuador, mediante la aplicación de técnicas de biología molecular (PCR)”

Autora: Quillupangui Quinga, Ana Belén

Directora: Chávez Larrea, María Augusta M.Sc.

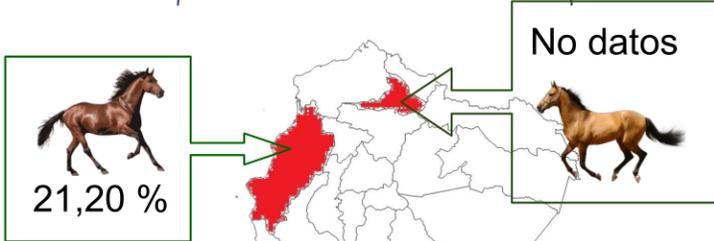
Sangolquí, 30 de agosto del 2023



INTRODUCCIÓN

Antecedentes

2021: 259 mil cabezas de ganado équido



Uso habituales de los équidos

1



2



Problema

Pasa desapercibido la salud y bienestar



Menos: **rendimiento**
Mayor: **mortalidad**
Restricciones comerciales

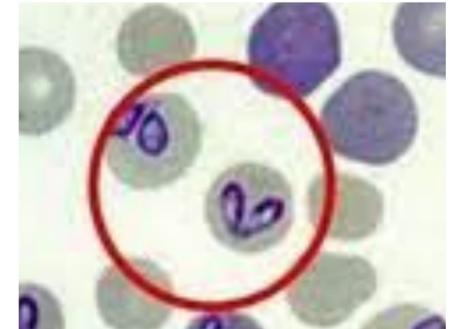
mejorar la identificación

Piroplasmosis equina

Theileria equi



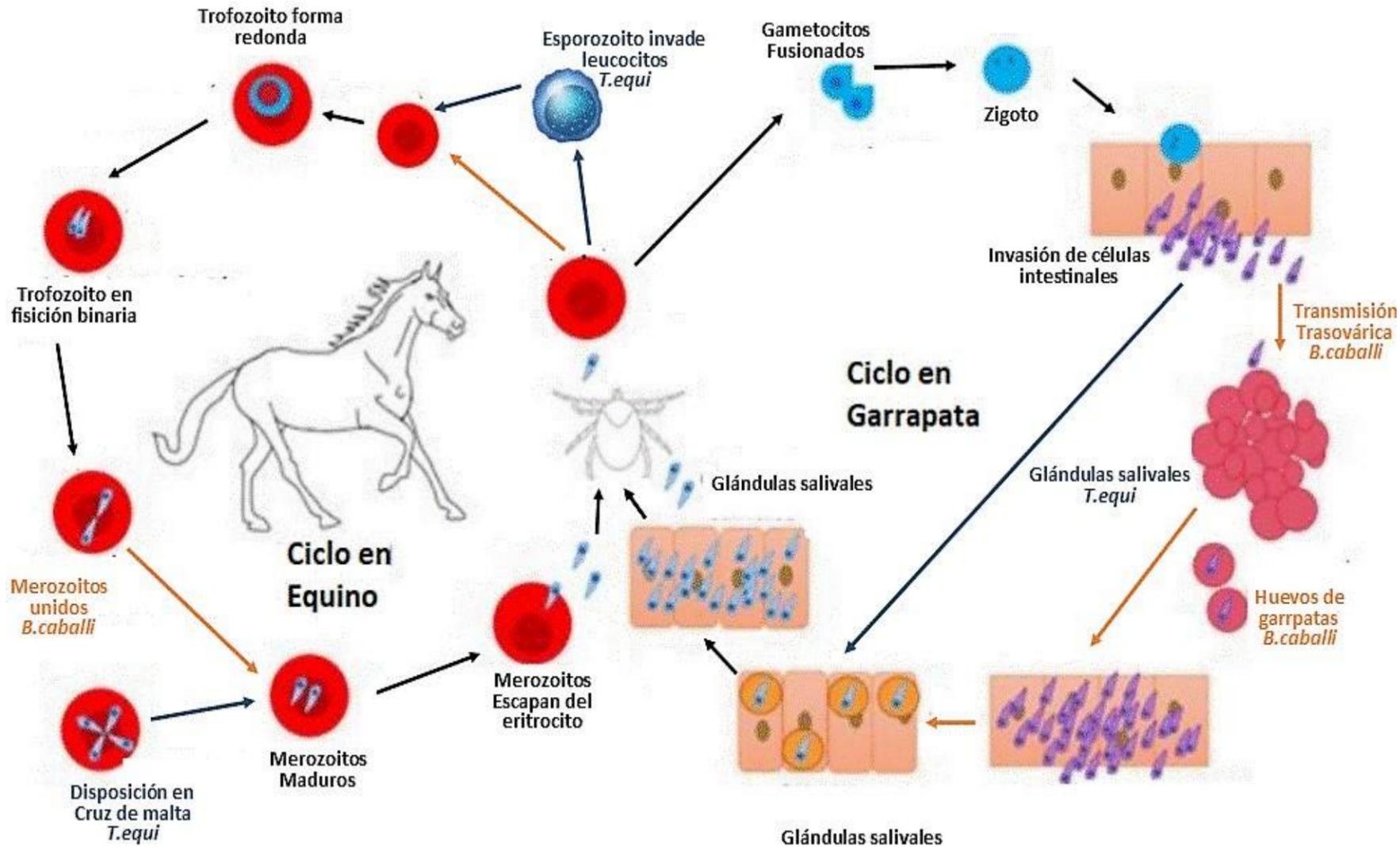
Babesia caballi



INTRODUCCIÓN

Transmisión

Síntomas



Fiebre alta (superior a 40 °C)
Membranas mucosas congestionadas
Dificultad para respirar



Anemia



Ictericia



Hemoglobinuria
Muerte.

INTRODUCCIÓN

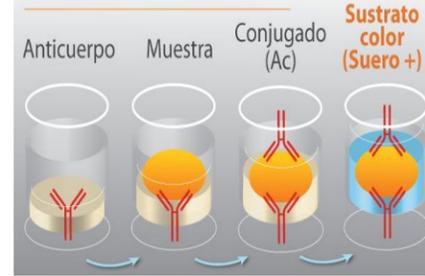
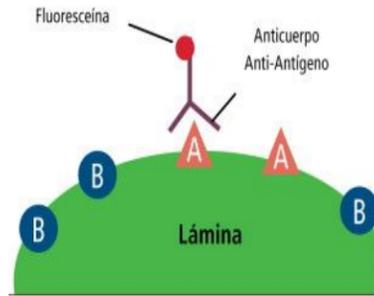
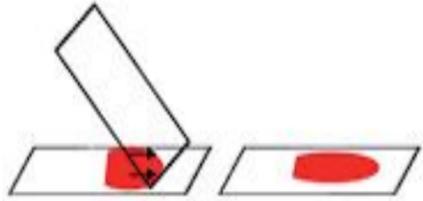
TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Frotis Sanguíneo

Inmunofluorescencia

ELISA

PCR

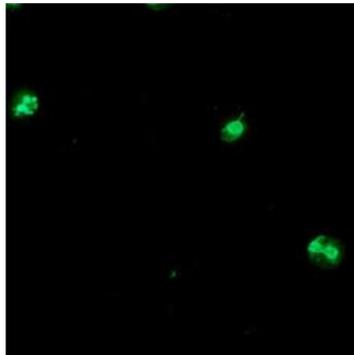
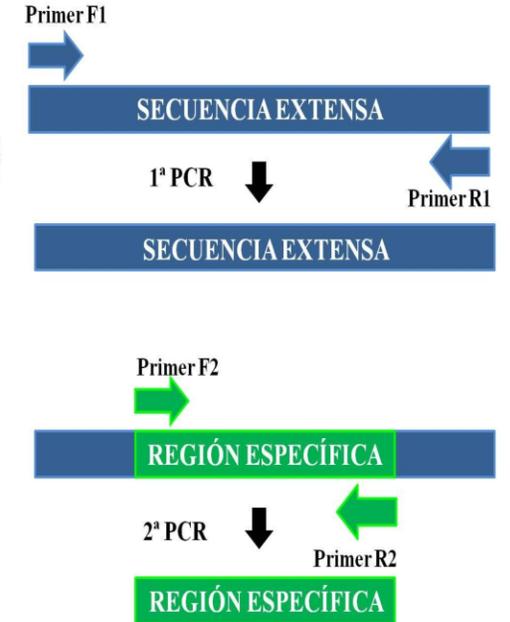
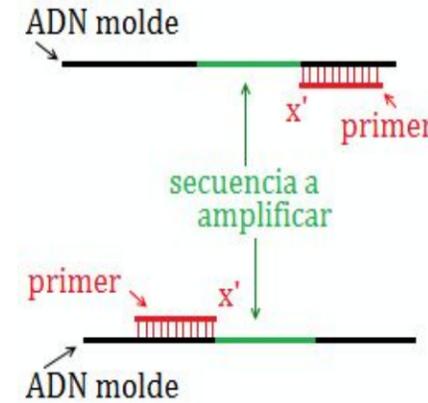


PCR Punto final

PCR Anidada

Theileria equi

Babesia caballi

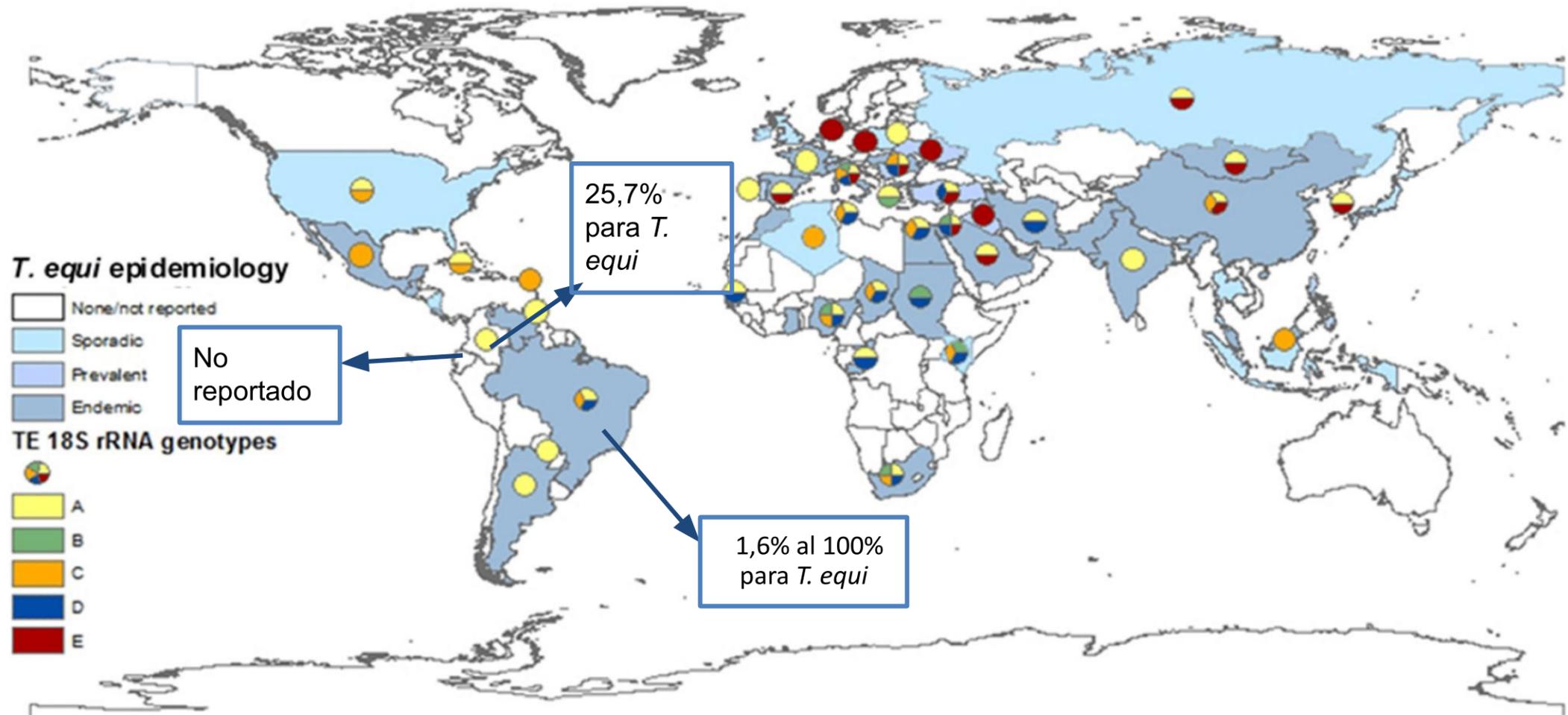


Babesia caballi

Theileria equi

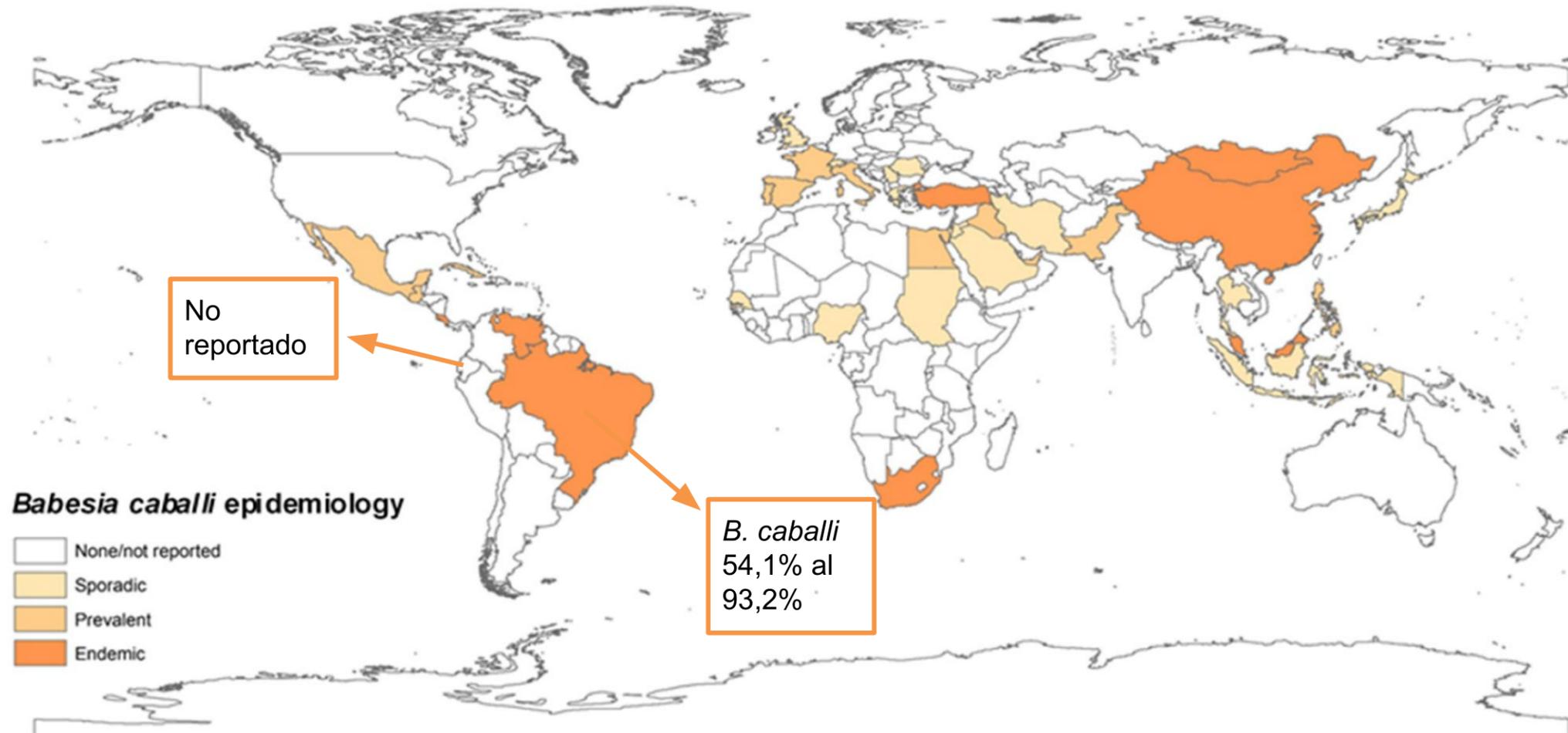
INTRODUCCIÓN

Distribución



INTRODUCCIÓN

Distribución



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de hemotrópicos (*Babesia caballi* y *Theileria equi*) en muestras sanguíneas de equinos provenientes de dos provincias del Ecuador, mediante la aplicación de técnicas de biología molecular (PCR), durante el período abril-agosto de 2023.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obtener el ADN de las muestras de sangre de equinos mediante la utilización de un kit comercial.

Detectar la presencia de *Babesia caballi* (*B. caballi*) y *Theileria equi* (*T. equi*) en las muestras de ADN de equinos mediante PCR de punto final.

Determinar la prevalencia y factores de riesgo de la presencia de hemotrópicos en equinos, provenientes de dos provincias del Ecuador.



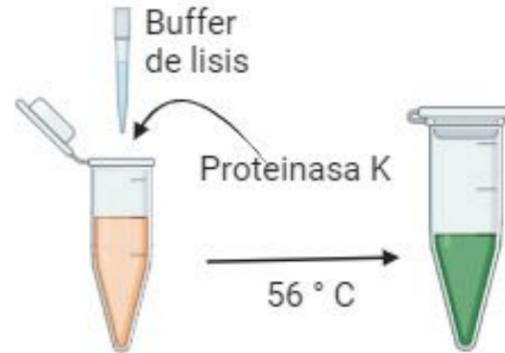
HIPÓTESIS

La PCR de punto final permite identificar la presencia de *Babesia caballi* (*B. caballi*) y *Theileria equi* (*T. equi*) en muestras de sangre equina

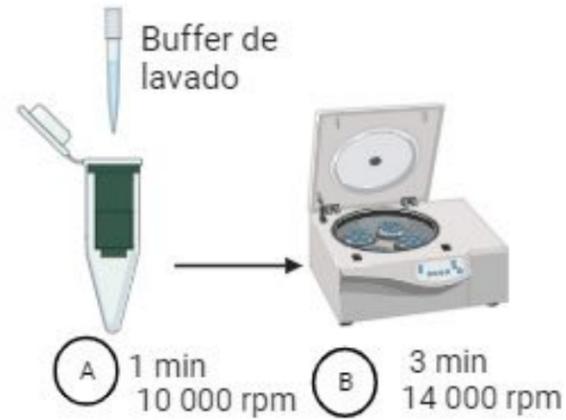
MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de ADN

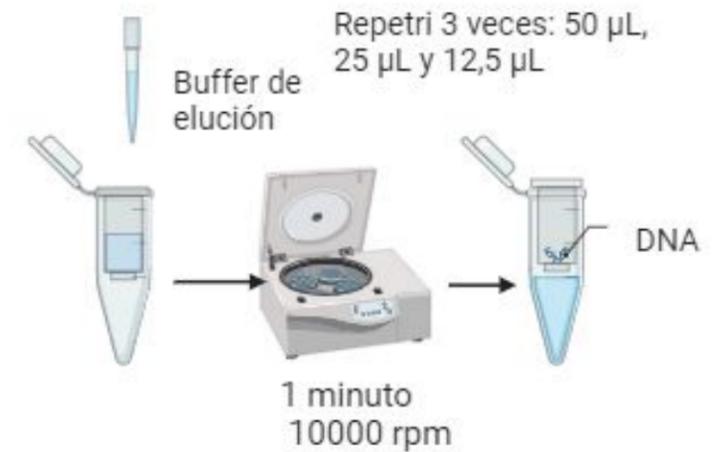
① Digestion de la muestra



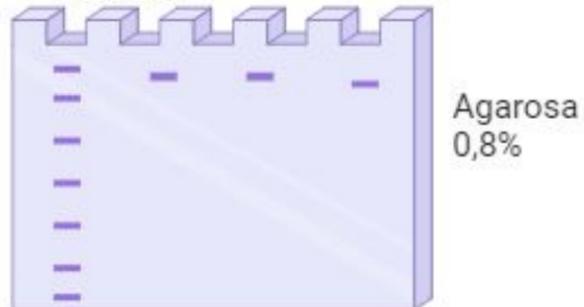
② Lavados



③ Elución



④ Visualización/ integridad del ADN



⑤ Cuantificación



KIT EXTRACCIÓN

GeneJET Whole
Blood Genomic
DNA Purification
Mini Kit

Thermo
SCIENTIFIC

MATERIALES Y MÉTODOS

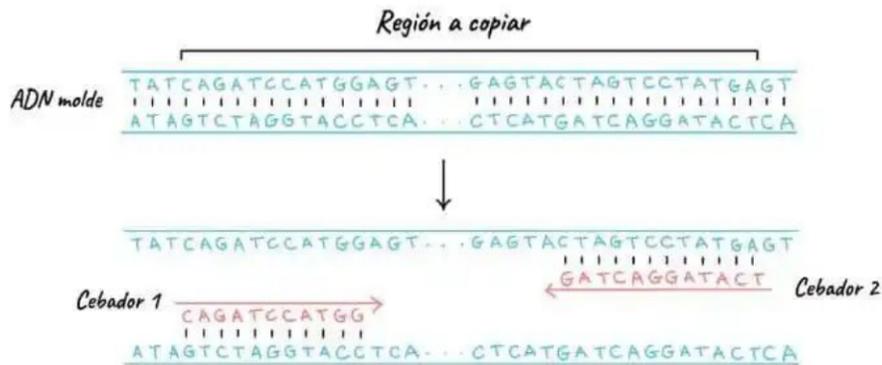
PCR punto final

CEBADORES

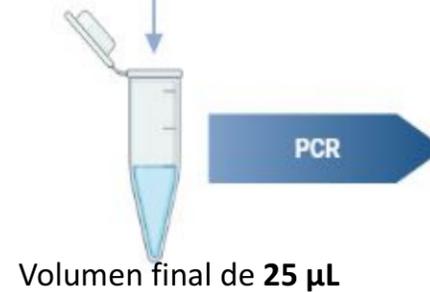
PIRO A (5'-AATACCCAATCCTGACACAGGG-3')

PIRO B (5'-TTAAATACGAATGCCCCCAAC-3')

T.equi: 18s RNA: 423bp
B.caballi: 18s RNA: 396bp

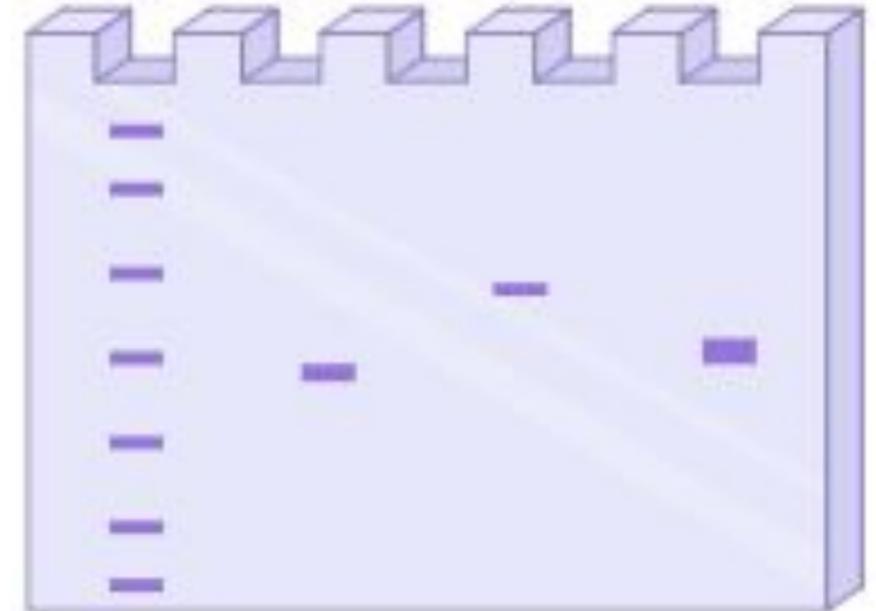


 Agua	
 Buffer	1X
 dNTPs	0.8 μM
 Cebadores PIRO A y PIRO B	0.40 μM
 Cofactor Mg ⁺	2.50 mM
 Taq Polimerasa	0.50 U/μL
 ADN	100 ng



Visualización de productos de PCR

Agarosa 2%



MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis de los datos

Unidad de estudio  Prevalencia y los factores de riesgo: solo Piroplasmosis equina



158



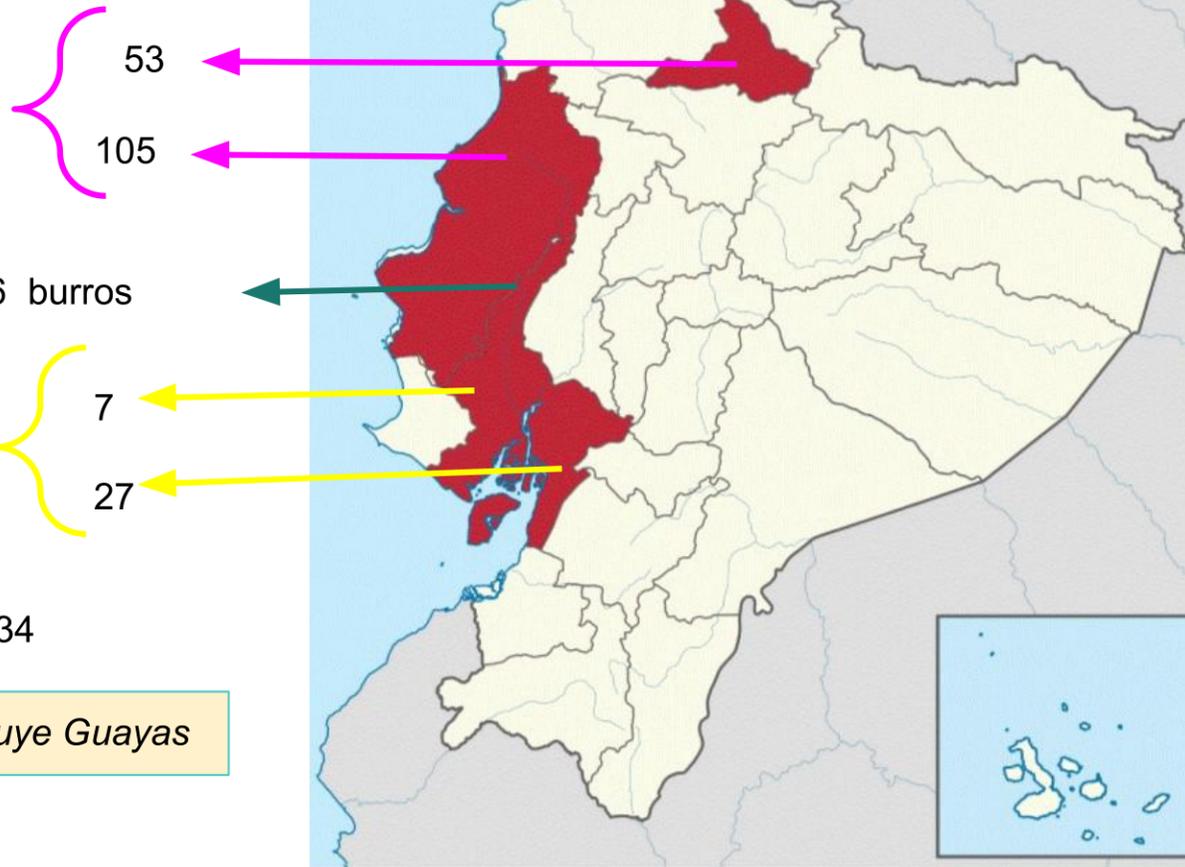
16 burros



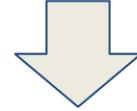
Mulas: 34



Se excluye Guayas



Prueba chi-cuadrado se $p < 0.05$)



Riesgo relativo y el atribuible para todas las variables con una diferencia significativa ($p < 0.05$)

	Negativos	Positivos	Totales
Expuestos	a	b	a+b
No expuestos	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+c+b+d

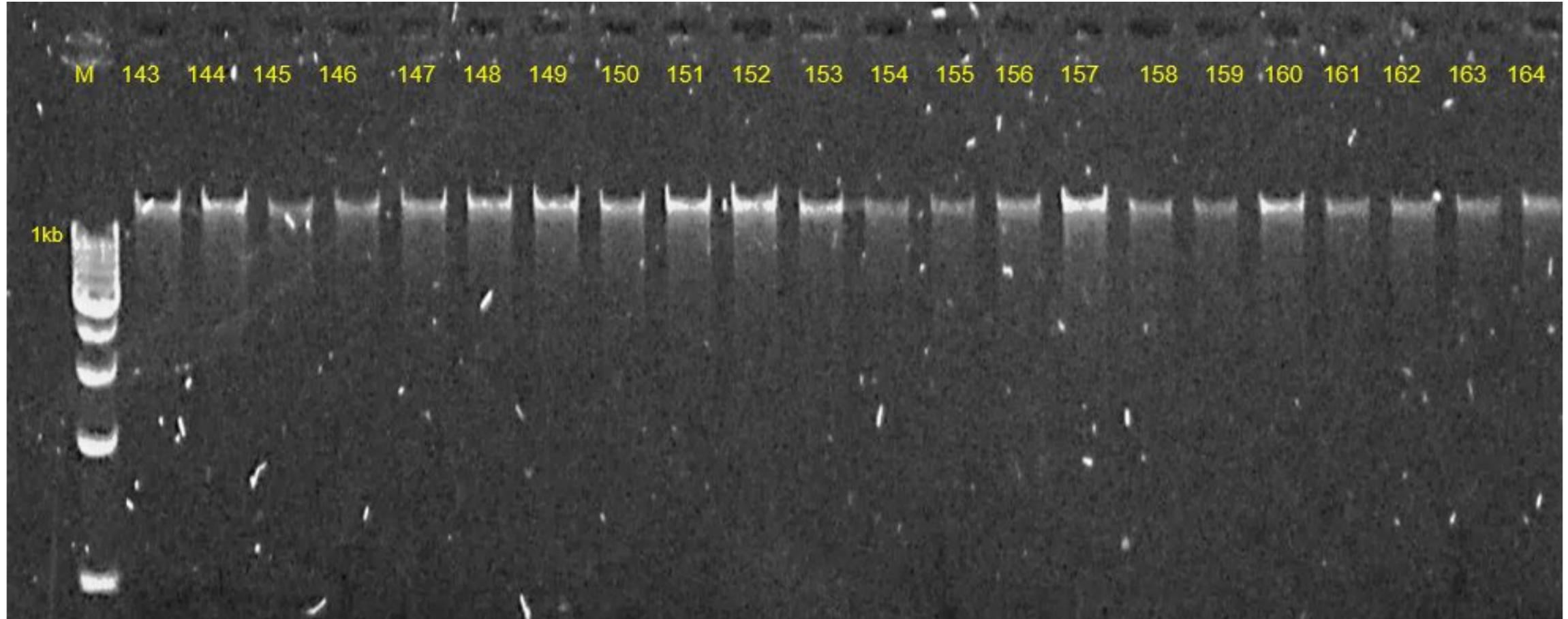
$$RR = \frac{\text{Incidencia Expuesto } (I_{e+})}{\text{Incidencia no expuesto } (I_{e-})} = \frac{\frac{a}{a+b}}{\frac{c}{c+d}}$$



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Integridad y cuantificación del ADN extraído de sangre entera equina mediante kit

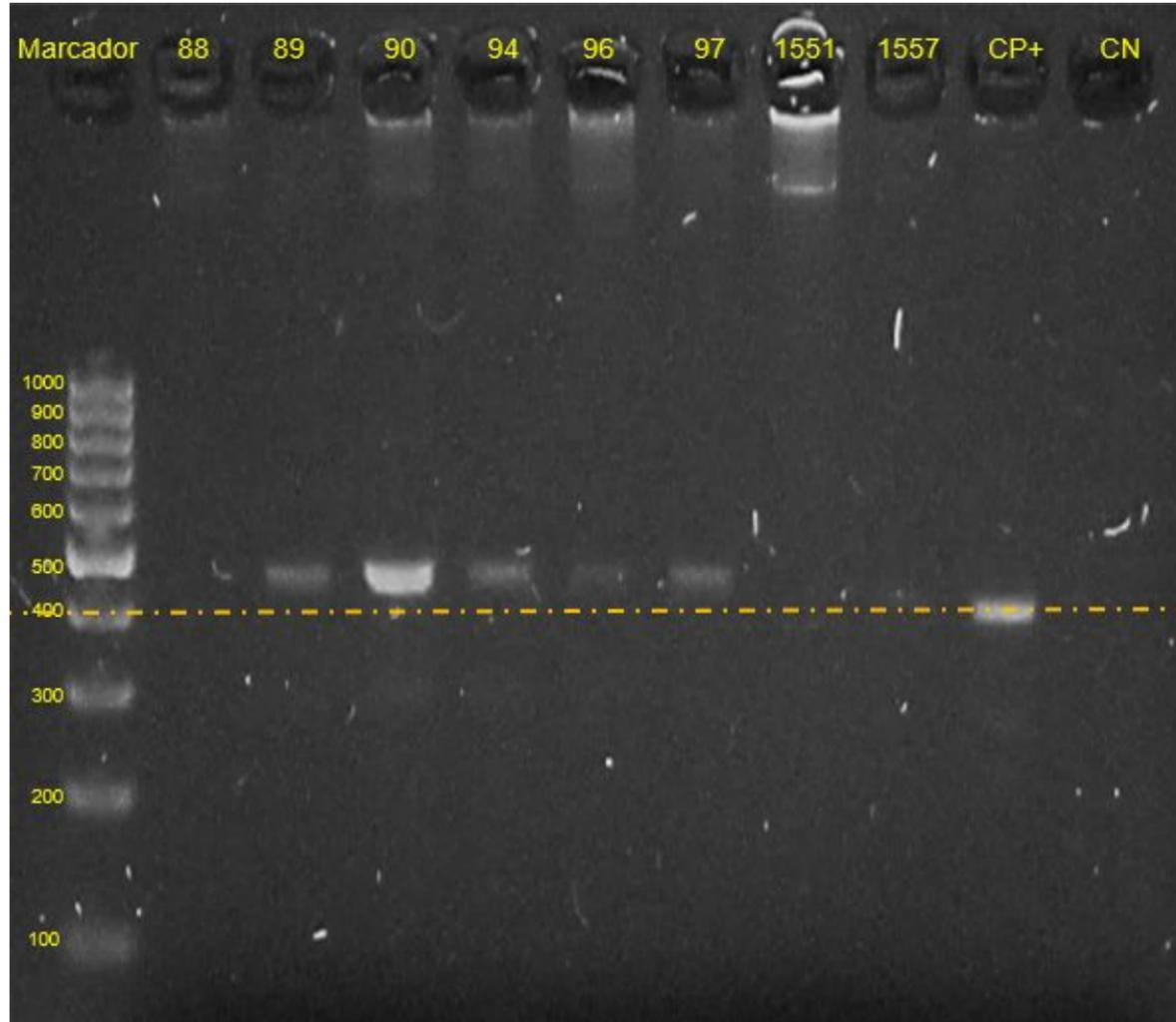
Concentración: 96,53 y 16,02 $\mu\text{g/ml}$ A260/280 $\geq 1,6-1,7$: 1,646 \pm 0,183 A260/230 $> 1,8$: 1,0736 \pm 0,643



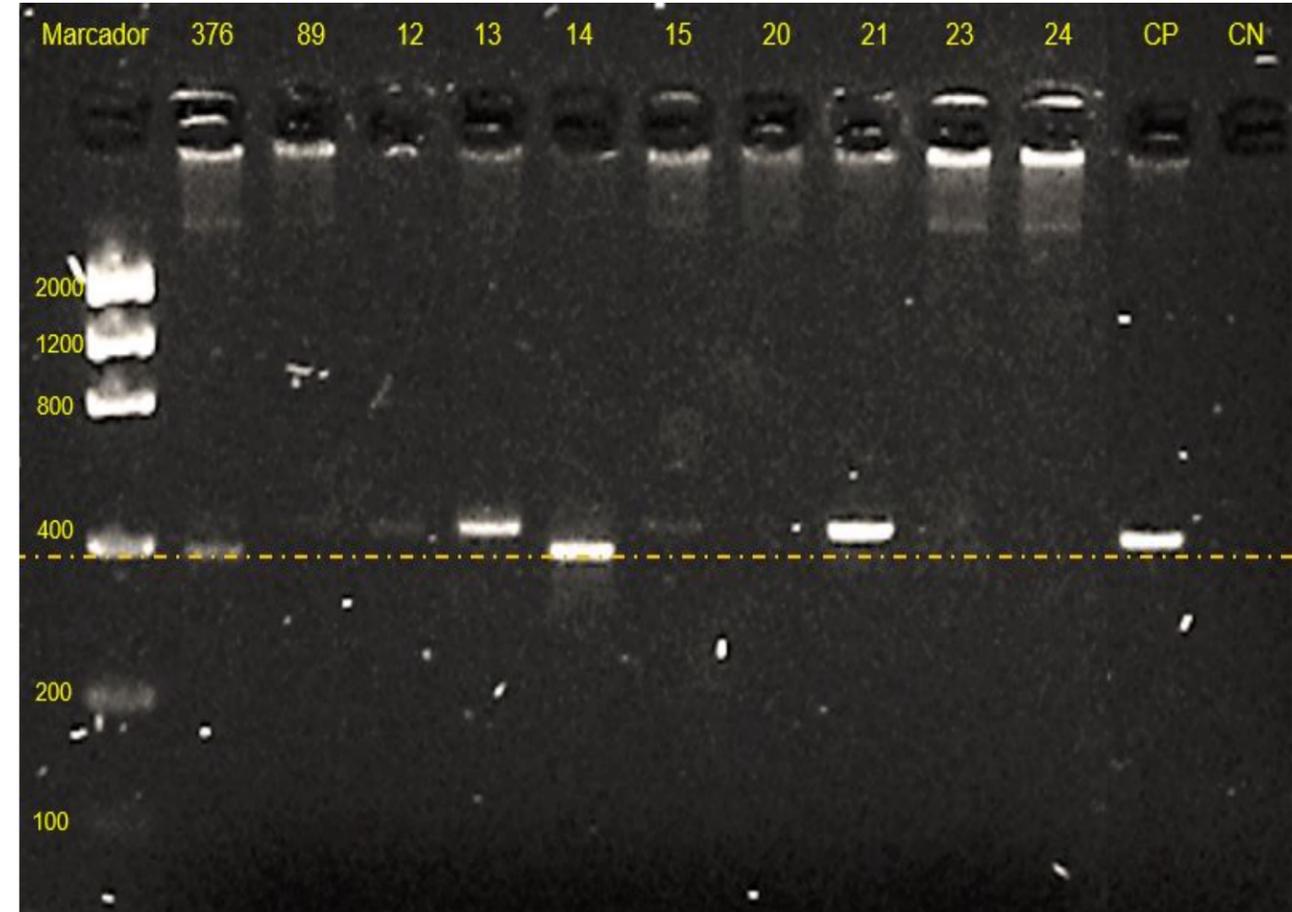
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PCR punto final con piro A y piro B

Muestras positivas para *T.equi*

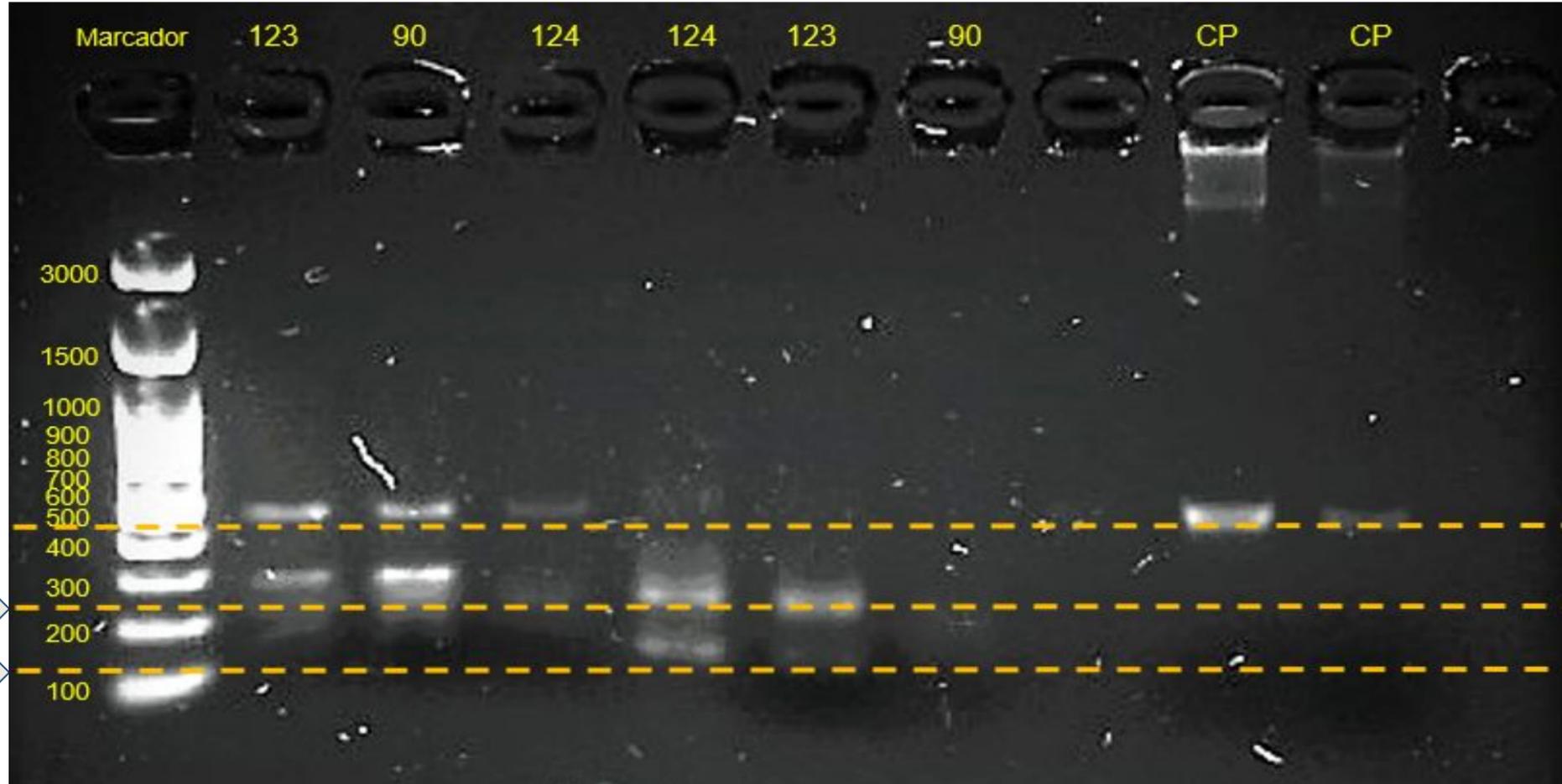


Muestras positivas para *T.equi* y *B.caballi*



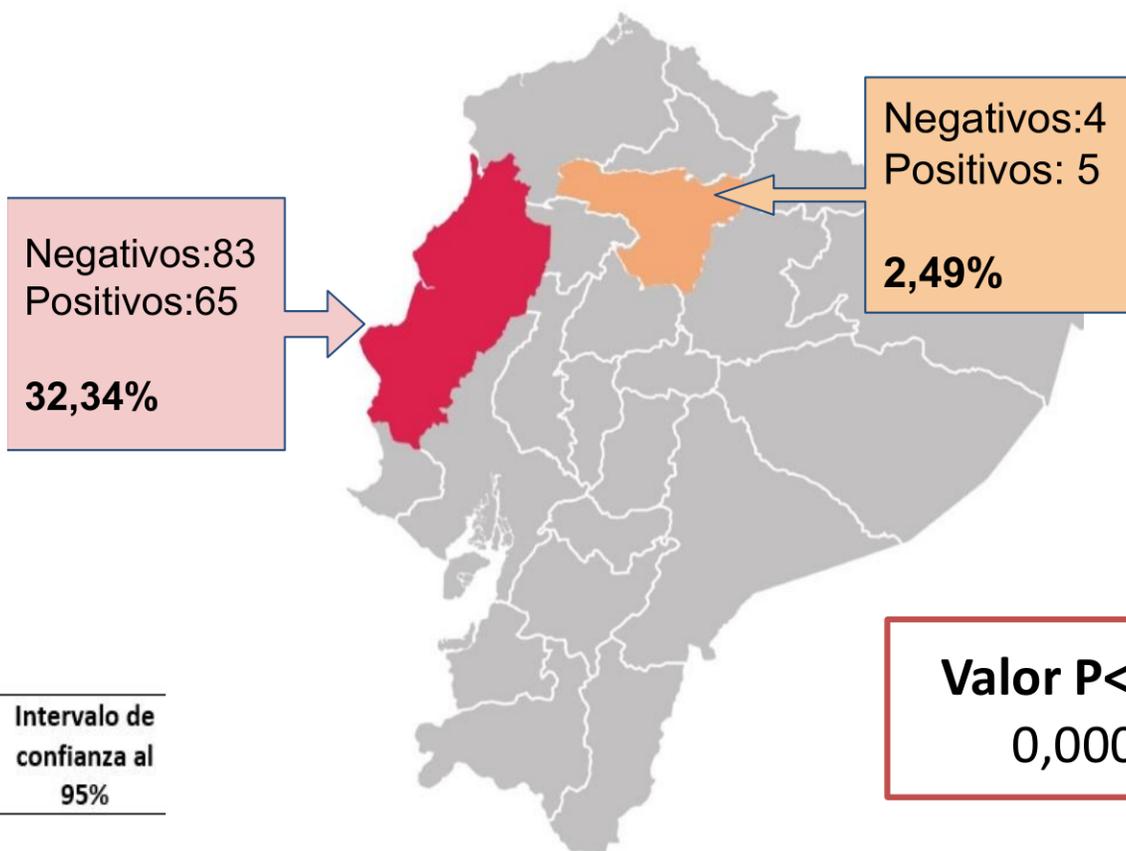
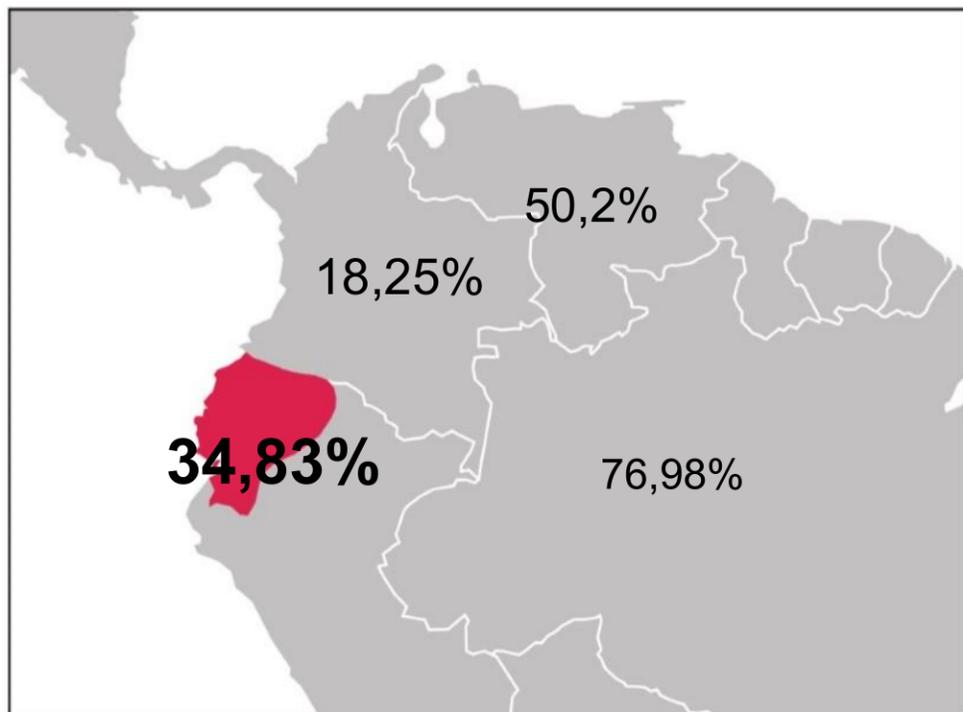
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cortes con enzimas de restricción



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Prevalencia de la enfermedad y Factor de Riesgo por localización



Variables	Animales Muestreados	Negativos	Positivos	Prevalencia (%)	Riesgo Relativo	Riesgo atribuible	Intervalo de confianza al 95%
Localización							
Provincia							
Costa	109	55	54	33,75	1,68	20,07	1,40-2,07
Sierra	51	46	5	3,13			

intervalo de confianza
 <1 factor protector
 >1 factor de riesgo.
 =1 indica ausencia de asociación



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Prevalencia de la enfermedad y Factor de Riesgo: Actividad que realiza



19,40%



8,46%



1,49%



1,00%

4,48% se desconoce

34,83%

Variables	Animales Muestreados	Negativos	Positivos	Prevalencia (%)	Riesgo Relativo	Riesgo atribuible	Intervalo de confianza al 95%
Actividad que realiza							
Trabajo agrícola y pecuario	62	23	39	24,38	2,17	29,17	1,54-3,05
Otro	98	77	21	13,13			



intervalo de confianza
 <1 factor protector
 >1 factor de riesgo.
 =1 indica ausencia de asociación

Valor P<0,05
 0,0001



ESPE
 UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
 INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Prevalencia de la enfermedad y Factor de Riesgo: Edad, sexo y especie

Variables	Animales Muestreados	Negativos	Positivos	Prevalencia (%)
Variables Zootecnia				
Sexo				
Hembra	127	82	45	22,39
Macho	66	41	25	12,44
Desconocido	8	8	0	0,00
Edad				
Potro	16	5	11	5,47
Yearling	8	6	2	1,00
Adolescente	20	12	8	3,98
Adulto	147	99	48	23,88
Desconocido	10	9	1	0,50
Especie				
Burro	16	14	2	1,00
Caballo	150	94	56	27,86
Mular	27	15	12	5,97
Desconocido	8	8	0	0,00

Valor $P < 0,05$

0,798

Intervalo

0,8-1,3

0,08

0,7-1

0,4818

0,81-1,16



CONCLUSIONES

Mediante la extracción de ADN se pudo definir una concentración óptima 96,53 y 16,02 µg/ml

Los primers piro A y piro B amplifican fragmentos de 496 *T.equi* para y 323 pb *B.caballi* que se pueden cortar con las enzimas de restricción HapII y AluI para su diferenciación, comprobando así que estos primers pueden ser utilizados para el diagnóstico de piroplasmosis equina mediante PCR punto final.

A través de la PCR se obtuvo una prevalencia de 34,83%, siendo Manabí la provincia con mayor cantidad de casos positivos, y se logró determinar dos factores de riesgo que fue la ubicación y la actividad que realiza el équido.

Mediante este estudio se pudo evidenciar por primera vez *T.equi* y *B.caballi* mediante la aplicación de PCR en el Ecuador



RECOMENDACIONES

Se recomienda no colocar más de 200 μ l de sangre de caballo para realizar la extracción de ADN mediante kit, para evitar que la acumulación de hemoglobina en la columna de sílice.

Se recomienda realizar PCR específicas con primers que amplifican secuencias específicas de *T.equus* y *B.caballi* y la secuenciación de las muestras amplificadas para una mejor identificación de las dos especies causantes de piroplasmosis.

Se recomienda aumentar el tiempo de digestión de más enzimas de restricción para mejorar el corte de los fragmentos al igual que aumentar el tiempo de corrida y disminuir la cantidad de marcado colocada.



AGRADECIMIENTOS



Dra. María Agusta Chávez M.Sc.
Carrera de Ingeniería en
Biotecnología
Matriz Sangolquí – ESPE

Dr. Armando Reyna-Bello, Ph.D.
Carrera de Ingeniería en
Biotecnología
Santo Domingo- ESPE

Dr. Jorge Ron Román, Ph.D.
Carrera de Ingeniería
Agropecuaria
IASA I - ESPE

Ing. Cristina Cholota
Técnico del Laboratorio de Docencia -
Biotecnología Animal

DOCENTES, FAMILIA Y AMIGOS