



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

ARES

ACADÉMIE
DE RECHERCHE ET
D'ENSEIGNEMENT
SUPÉRIEUR



Determinación de la seropositividad y caracterización molecular de *Anaplasma marginale* en bovinos pertenecientes a un muestreo realizado en la zona de Chone, Manabí.

Autor: Cando Escobar, Kevin Joel

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Director: Reyna Bello, Armando Ph.D.

Agosto del 2022

FECHA ÚLTIMA REVISIÓN: 09/10/13

CÓDIGO: SGC.DI.260

VERSIÓN: 1.1



INTRODUCCIÓN

La anaplasmosis bovina es una enfermedad infecciosa no contagiosa causada por la *Rickettsia Anaplasma marginale*

Es uno de los agentes hemotrópicos bovinos con mayor relevancia en el ámbito ganadero, junto a *Trypanosoma vivax*, *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*



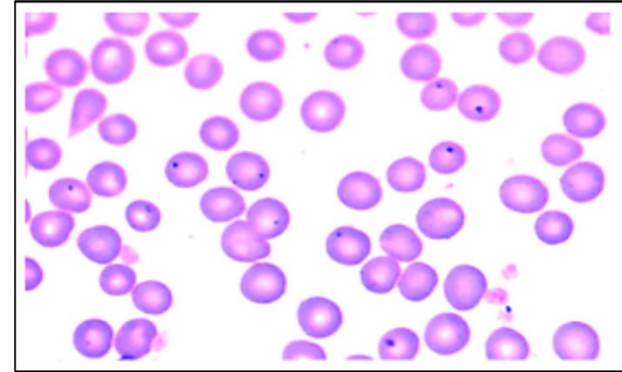
Es importante tener un panorama amplio sobre la seropositividad y diversidad genética de la anaplasmosis en las diferentes zonas ganaderas del Ecuador a fin de entender los mecanismos de transmisión, métodos de detección, tratamientos y control de la anaplasmosis bovina.



MARCO TEÓRICO

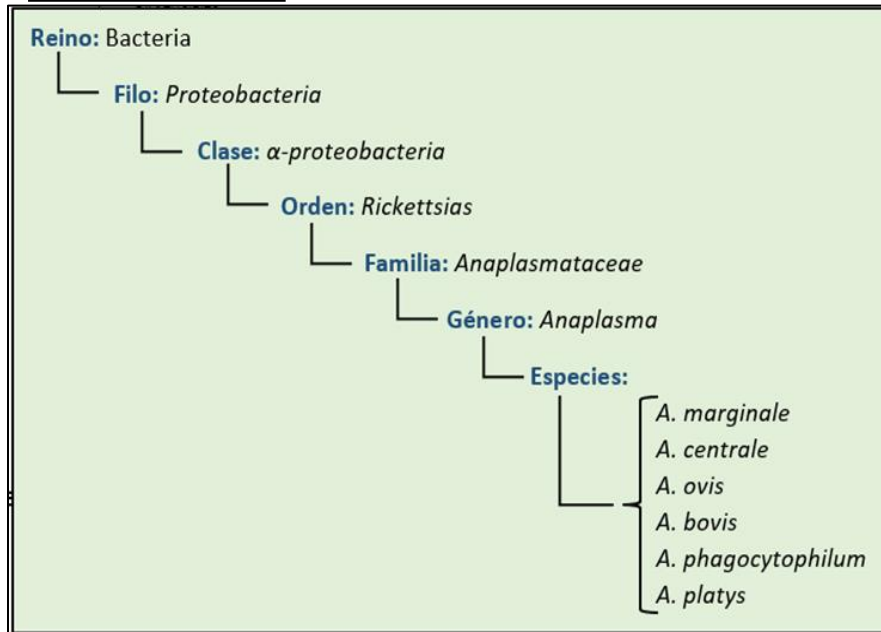
Descripción

Anaplasma marginale es una rickettsia intraeritrocítica gran-negativa, del ganado y otros rumiantes con distribución en todo el mundo

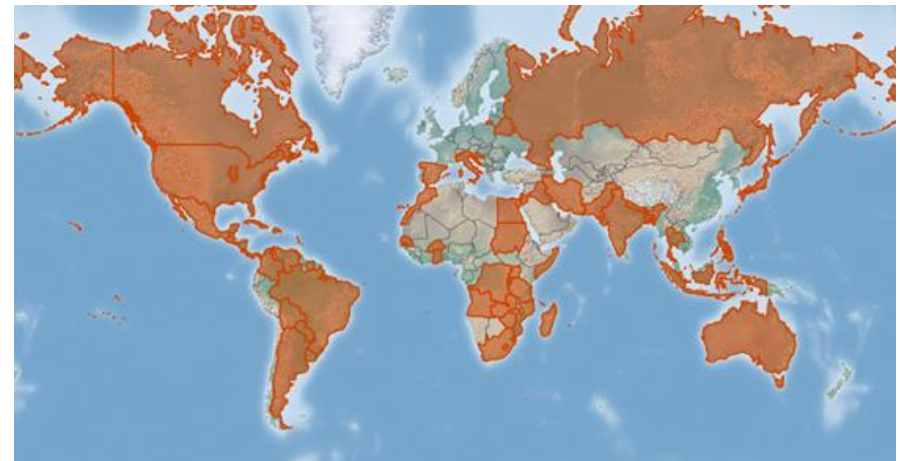


Fortis de *Anaplasma marginale* (Muñoz et. al, 2018)

Taxonomía



Distribución



Distribución de *Anaplasma marginale* en el mundo (CABI, 2022).



MARCO TEÓRICO

Transmisión

Biológica

- *Rhipicephalus microplus*
- *Dermacentor*
- *Ixodes*



Mecánica:

- *Tabanus*
- *Stomoxys*



Iatrogénica

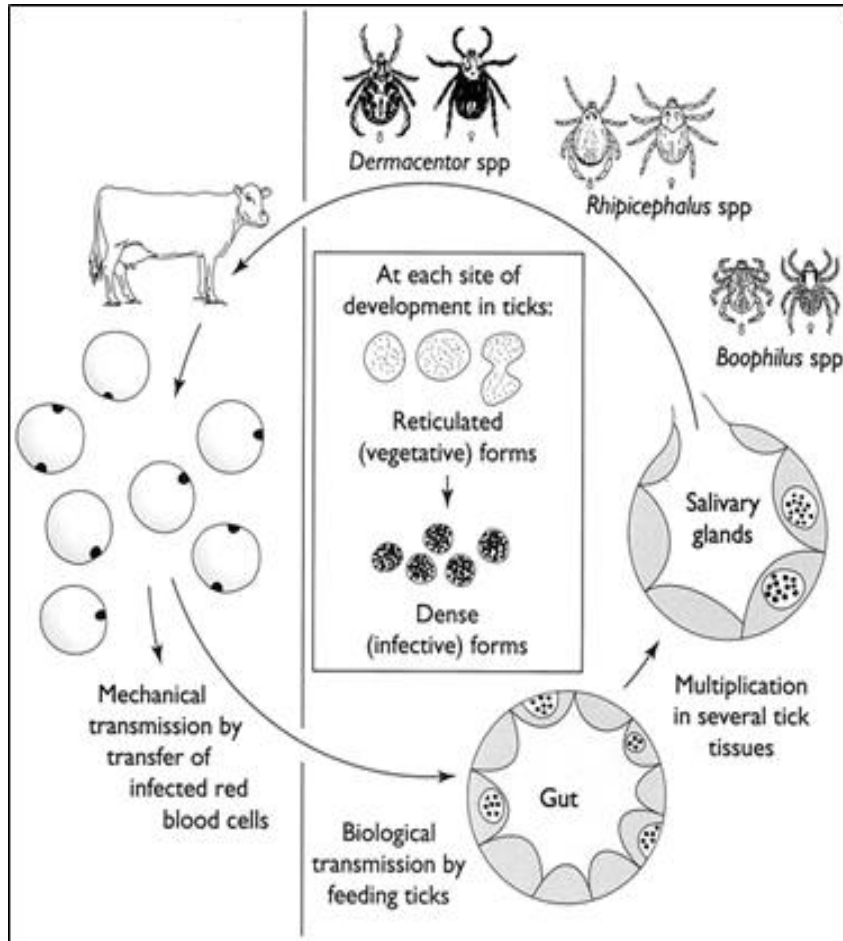


Transplacentaria



MARCO TEÓRICO

Ciclo de vida



Ciclo de vida del parásito *Anaplasma marginale*.
(Kocan et al., 2003)

Signos clínicos y patogénesis

Los bovinos de todas las edades pueden infectarse, no obstante la aspereza de la enfermedad y el riesgo de muerte aumenta con la edad.

Síntomas

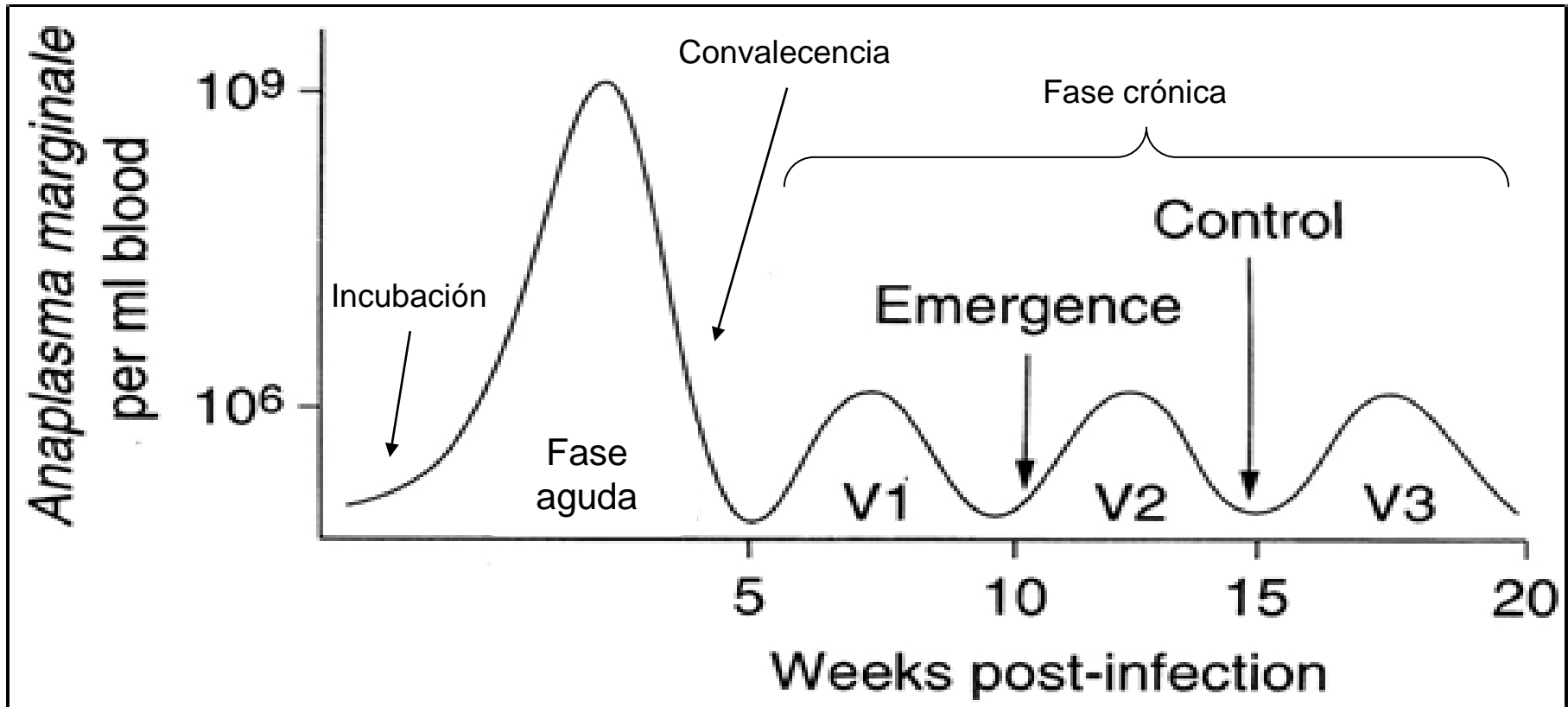
- anemia
- palidez en mucosas
- pérdida de peso
- letargo
- depresión
- abortos
- muerte

La anaplasmosis puede dividirse en 4 etapas:

- incubación
- fase aguda
- convalecencia
- fase crónica.



Ciclo de parasitemia de *Anaplasma marginale*



Adaptado de “Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* in Kocan et al., 2003, Revista de Salud Animal, (698-712).



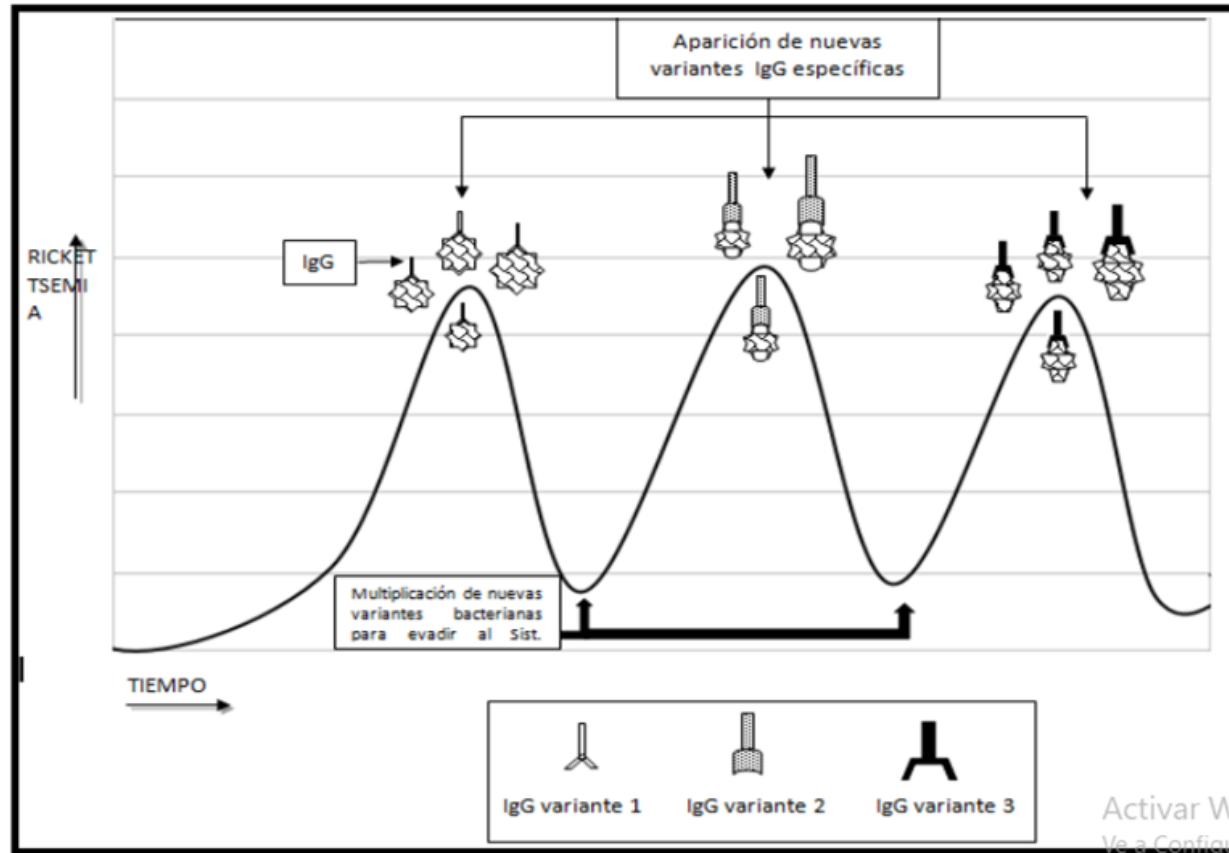
MARCO TEÓRICO

Respuesta inmunitaria

A. marginale forma cuerpos iniciales al infectar los glóbulos rojos, son inmunes en primera instancia a los linfocitos citotóxicos del CMH I y II.

Se presenta una respuesta autoinmune al ser los eritrocitos fagocitados por células reticuloendoteliales

Emergencia de nuevas variantes y evasión al sistema inmune



Elizalde y Reyna-Bello (2014)



MARCO TEÓRICO

Proteínas de superficie

MSP1 α

Adhesina hacia eritrocito y células de garrapatas, taxonomía

MSP1 β

Adhesina a eritrocitos

MSP2

Variabilidad antigénica, inmunodominante

MSP3

Variabilidad antigénica, inmunodominante

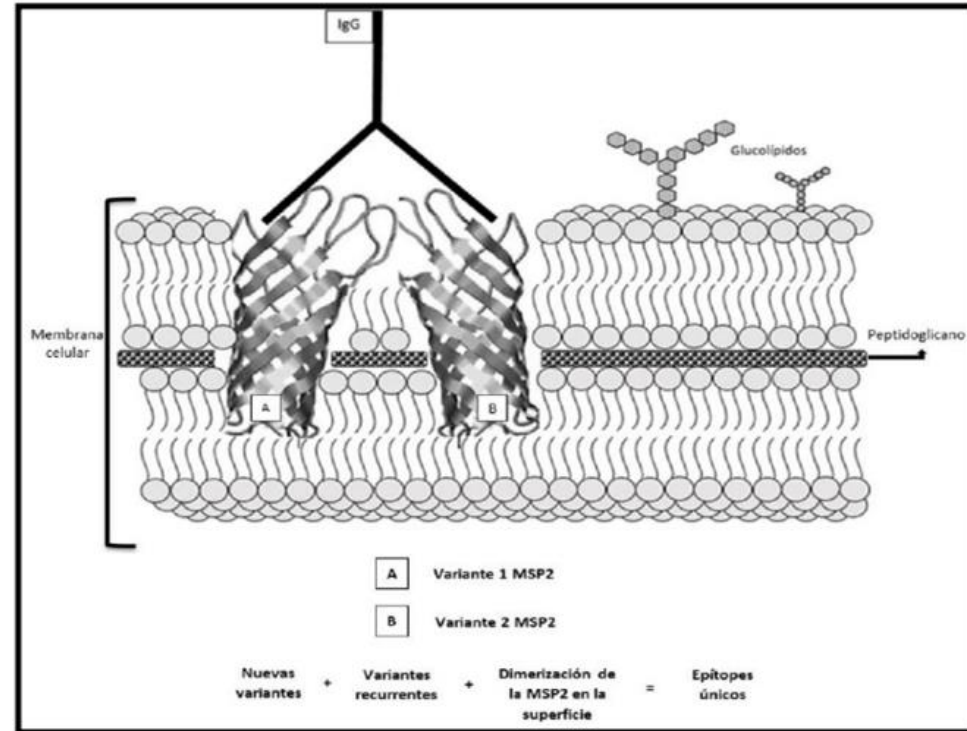
MSP4

Taxonomía

MSP5

Diagnóstico

Proteína MSP2, expresión de variantes antigénicas



Elizalde y Reyna-Bello (2014)



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

- **General:**

Determinar la seropositividad y caracterizar molecularmente la bacteria *Anaplasma marginale* en muestreos realizados en la zona de Chone, Manabí.

- **Específicos:**

Realizar muestreos en zonas con historial clínico de *A. marginale*.

Realizar la prueba de PCR a la población muestreada y determinar la seropositividad.

Caracterizar molecularmente el agente patógeno empleando genes de las proteínas de superficie.

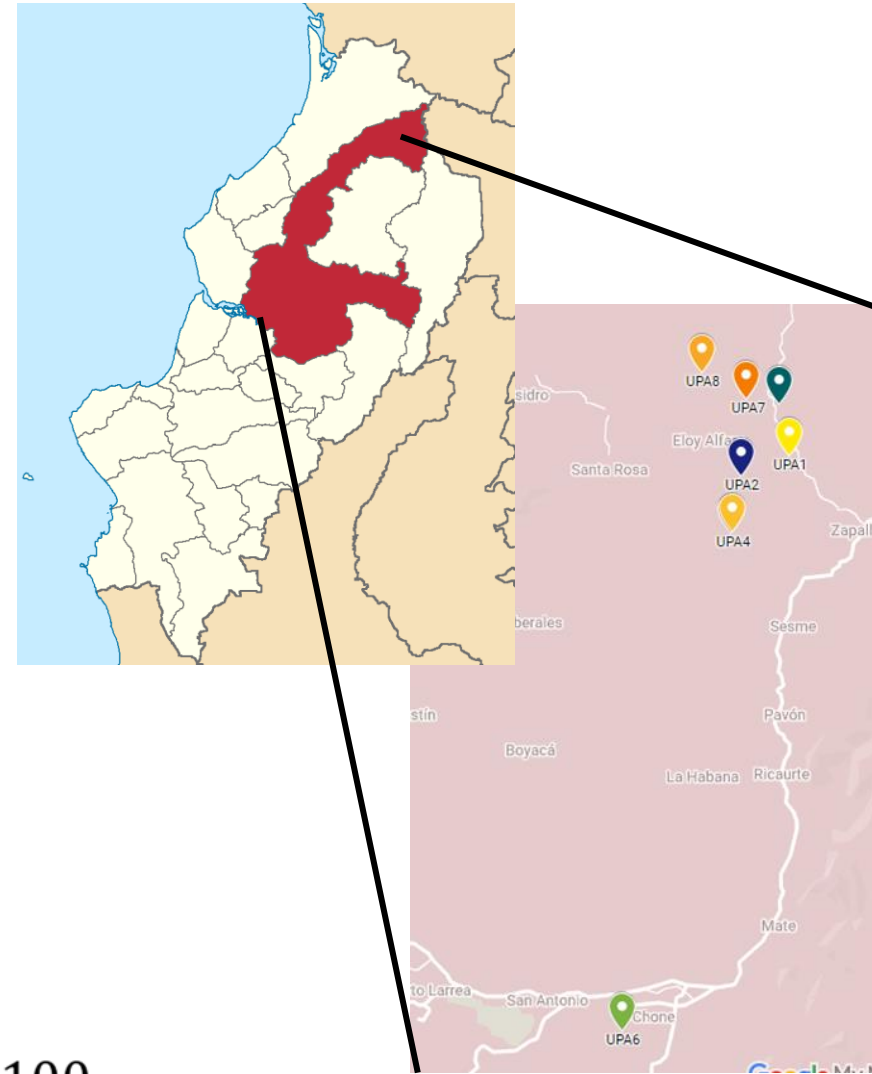


METODOLOGÍA

1. Obtención de muestras

Tabla 1. Ubicación de las fincas dónde se obtuvieron las muestras

N°	Código de la finca	Muestras	N° de muestras
1	UPA1	400 – 430	31
2	UPA2	431 – 445	15
3	UPA3	446 – 497	52
4	UPA4	498 – 512	15
5	UPA5	513 – 532	20
6	UPA6	533 – 557	25
7	UPA7	558 – 571	14
8	UPA8	572 – 592	20



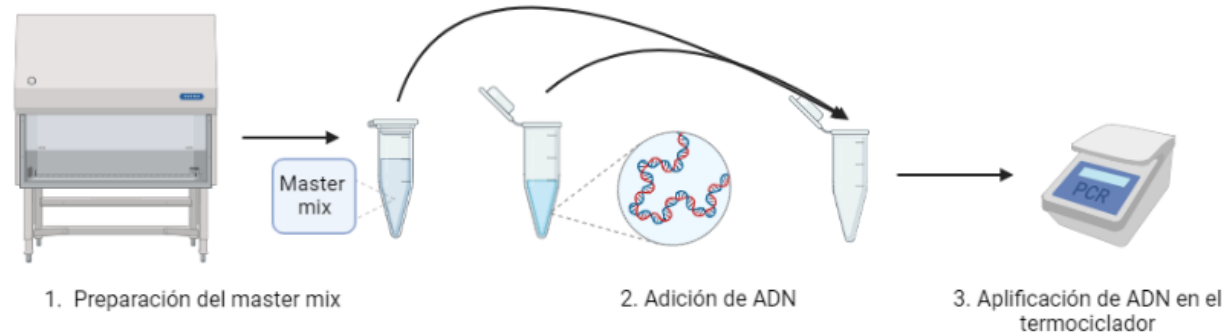
2. Prevalencia: $\frac{\text{número de casos positivos}}{\text{número total de casos}} \times 100$



3. Estandarización de PCR para el diagnóstico de *A. marginale*.

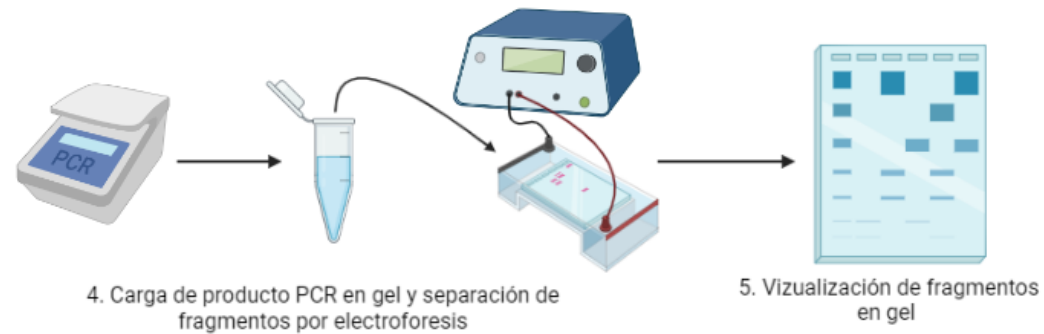
A)

Reactivos	Unidad	Concentración final	Volumen (μL)
H ₂ O		-	14.90
Buffer+MgCl ₂	mM	1.00	2.50
19A	μM	1.00	2.50
19B	μM	1.00	2.50
dNTP's	mM	0.20	0.50
Taq	U/μL	0.50	0.10
ADN	ng/uL	100	2
VOLUMEN FINAL			25.00



B)

	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	45 s	40
Hibridación	64	30 s	40
Extensión	72	1 min	40
Extensión final	72	10 min	1
Mantenimiento	10	-	-



C)

Nombre de los Cebadores	Dirección	Secuencias	(pb)
19A	Fordward	GTGTTCTGGGGTACTCCTA	806
19B	Reverse	TGATCTGGTCAGCCCCAGCT	

METODOLOGÍA

4. Estandarización de PCR del gen *msp1a*

5. Estandarización de PCR del gen *msp4*

A)

Reactivos	Unidad	Concentración final	Volumen (μL)
H ₂ O		-	-
Buffer+MgCl ₂	mM	2.00	5.00
Forward	μM	0.50	1.25
Reverse	μM	0.50	1.25
dNTP's	mM	0.20	0.50
Taq	U/μL	1.00	0.20
ADN	ng/uL	100	1
VOLUMEN FINAL			25.00

A)

Reactivos	Unidad	Concentración final	Volumen (μL)
H ₂ O		-	17.05
Buffer+MgCl ₂	mM	1.50	3.75
Forward	μM	0.50	1.25
Reverse	μM	0.50	1.25
dNTP's	mM	0.20	0.50
Taq	U/μL	1.00	0.20
ADN	ng/uL	100	1
VOLUMEN FINAL			25.00

B)

	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	94	30 s	35
Hibridación	62	30 s	35
Extensión	72	45 s	35
Extensión final	72	5 min	1
Mantenimiento	10	-	-

B)

	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	30 S	1
Desnaturalización	94	30 s	35
Hibridación	62	30 s	35
Extensión	72	1 min	35
Extensión final	72	5 min	1
Mantenimiento	10	-	-

C)

Primers	Dirección	Secuencias	(pb)
420F	Forward	GTGCTGGTTGTGTGGTTGTG	420
420R	Reverse	CTTGCCGCCAATTAGCTCCT	

C)

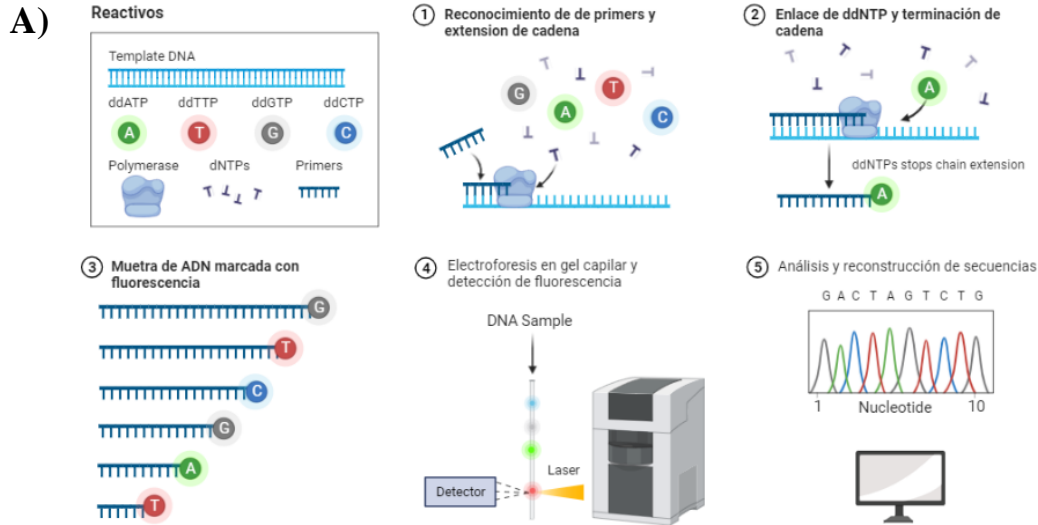
Nombre de los Cebadores	Dirección	Secuencias	(pb)
MSP45	Forward	CCGGATCCTTAGCTGAACAG GAATCTTGC	850
MSP43	Reverse	GGGAGCTCCTATGAATTACA GAGAATTGTTTAC	

Tablas. A) Reactivos para la PCR; B) Condiciones de la PCR;
C) Cebadores para la amplificación del gen

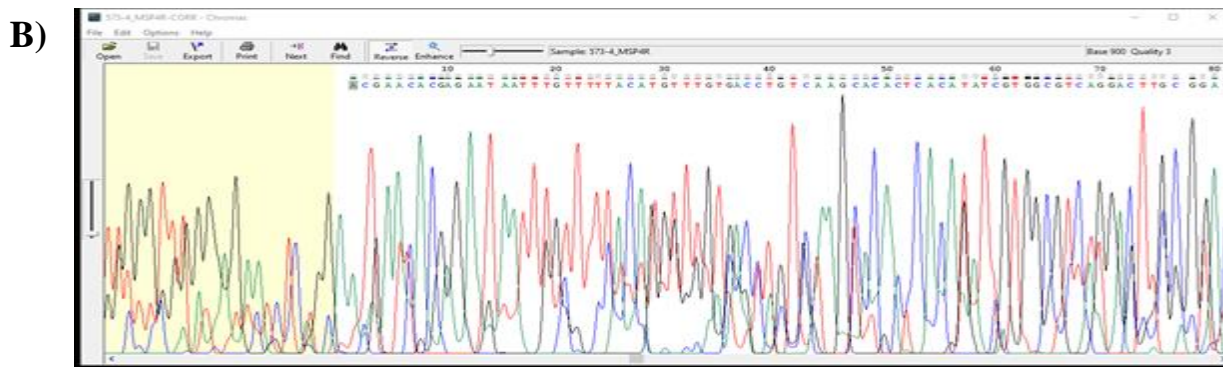


ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

6. Secuenciación



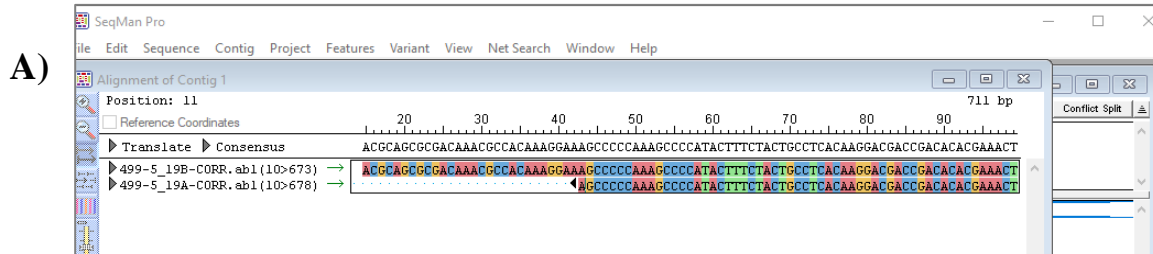
7. Secuencia consenso, blast y alineamiento



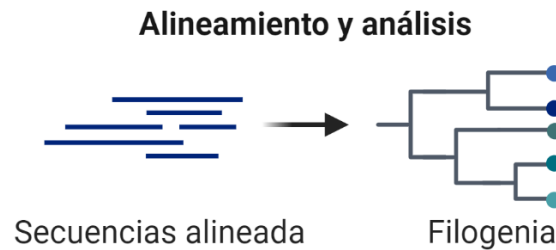
Figuras. A) Descripción gráfica del proceso de secuenciación;
B) Trabajo en el programa Chromas



7. Secuencia consenso, blast y alineamiento



8. Filogenia

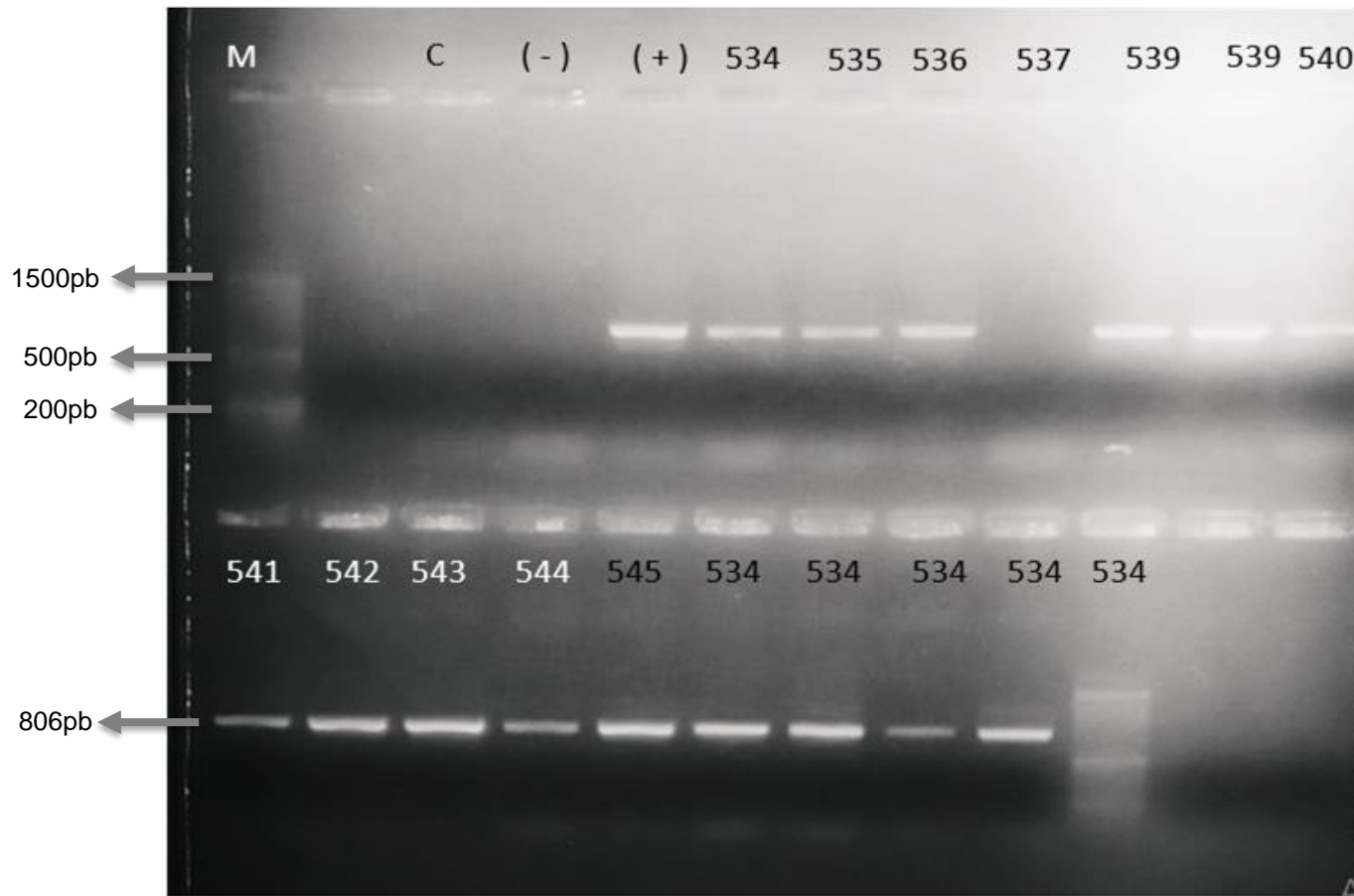


Figuras. A) Trabajo en el programa SeqMan Pro ; B) Trabajo en el programa Mega 7



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Electroforesis en gel de PCR para msp5



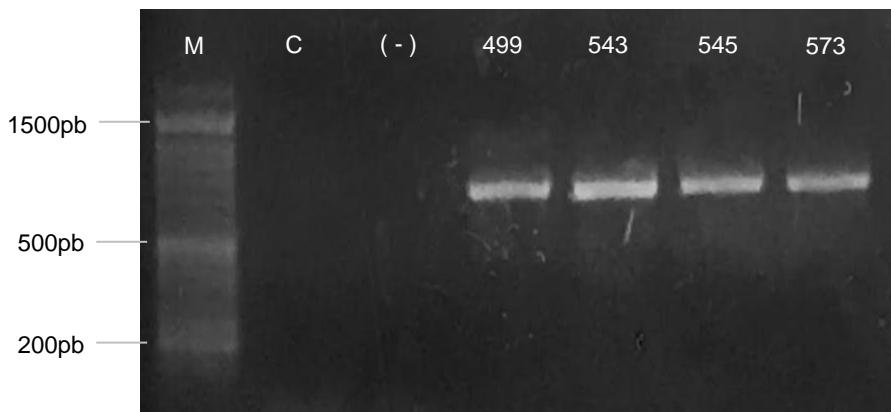
Se reporta que entre uno de los casos positivos se encontró un becerro menor a 3 meses, correspondiente a la muestra 543, con clínica de *A. marginale*.

Electroforesis en gel de agarosa al 2%, de muestras del producto PCR de msp5 para diagnóstico de *A. marginale*. Muestras del 534-577, muestras positivas con 806pb

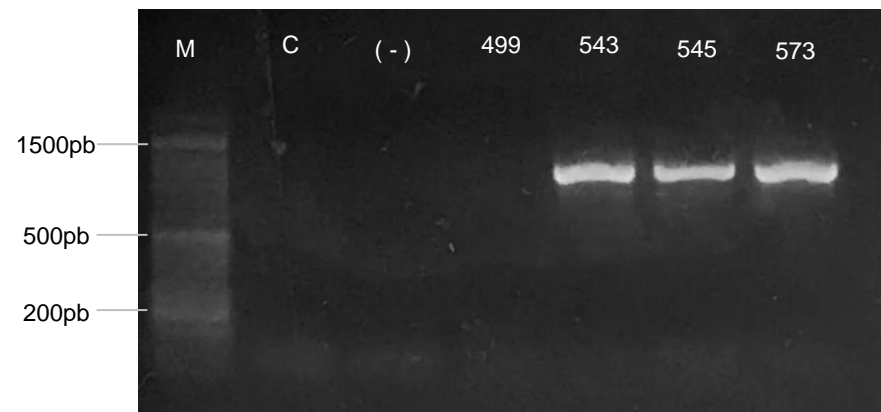


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

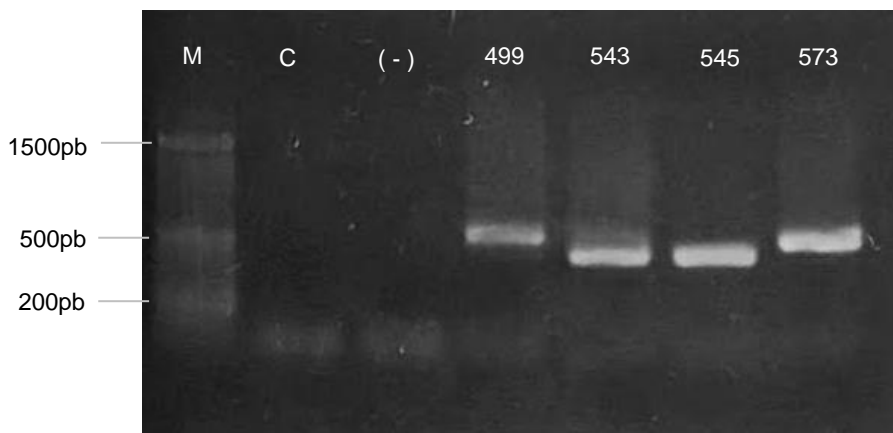
Electroforesis en gel de PCR de los genes *msp1α*, *msp4* y *msp5*



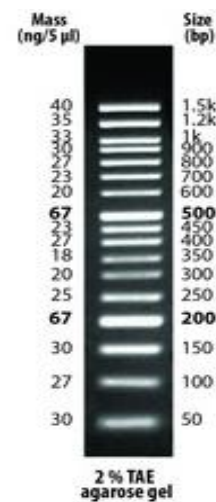
Electroforesis en gel de agarosa al 2%, del producto PCR de *msp5* de muestras 499, 543, 545 y 573. 806pb≈



Electroforesis en gel de agarosa al 2%, del producto PCR de *msp4* de muestras 499, 543, 545 y 573. 850pb≈



Electroforesis en gel de agarosa al 2%, del producto PCR de *msp1α* de muestras 499, 543, 545 y 573. 500pb ≈ y 420pb ≈



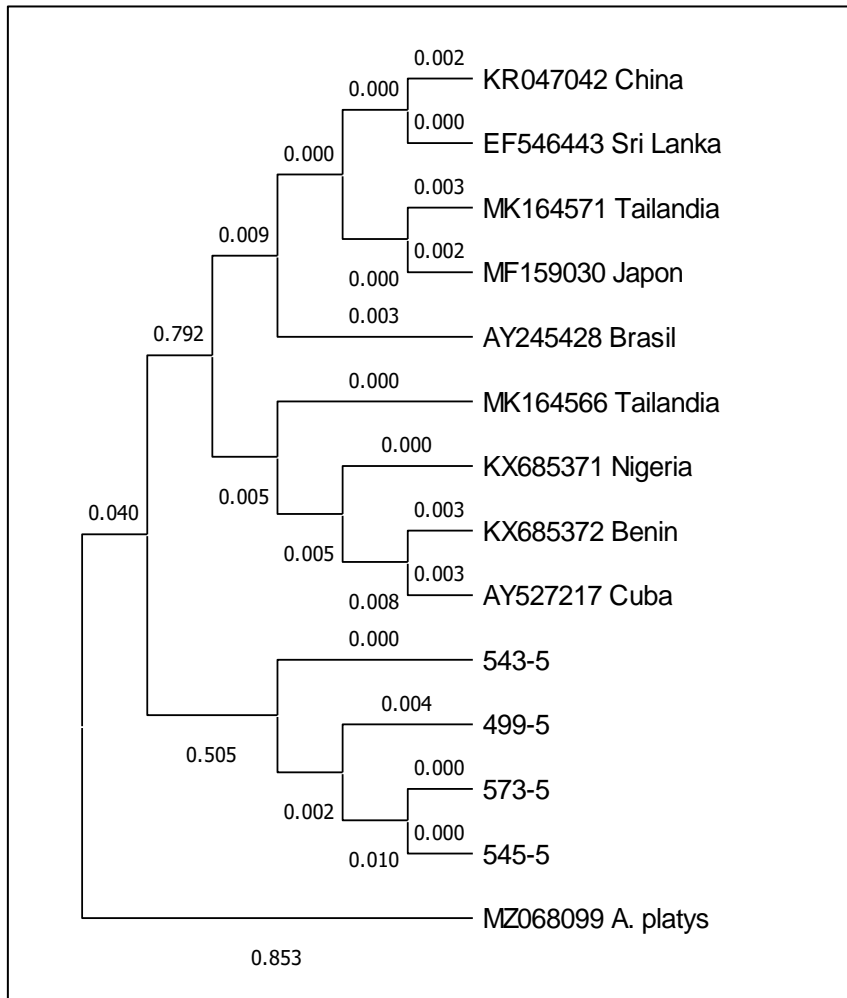
Referencias del marcador de peso molecular



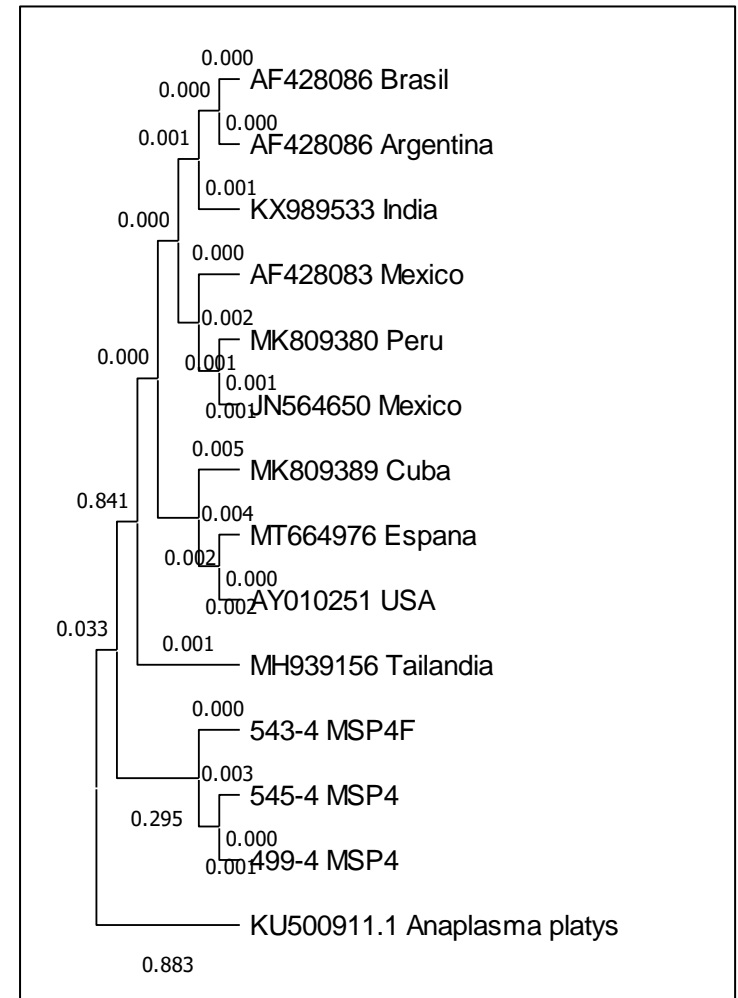
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Filogenia

A)



B)

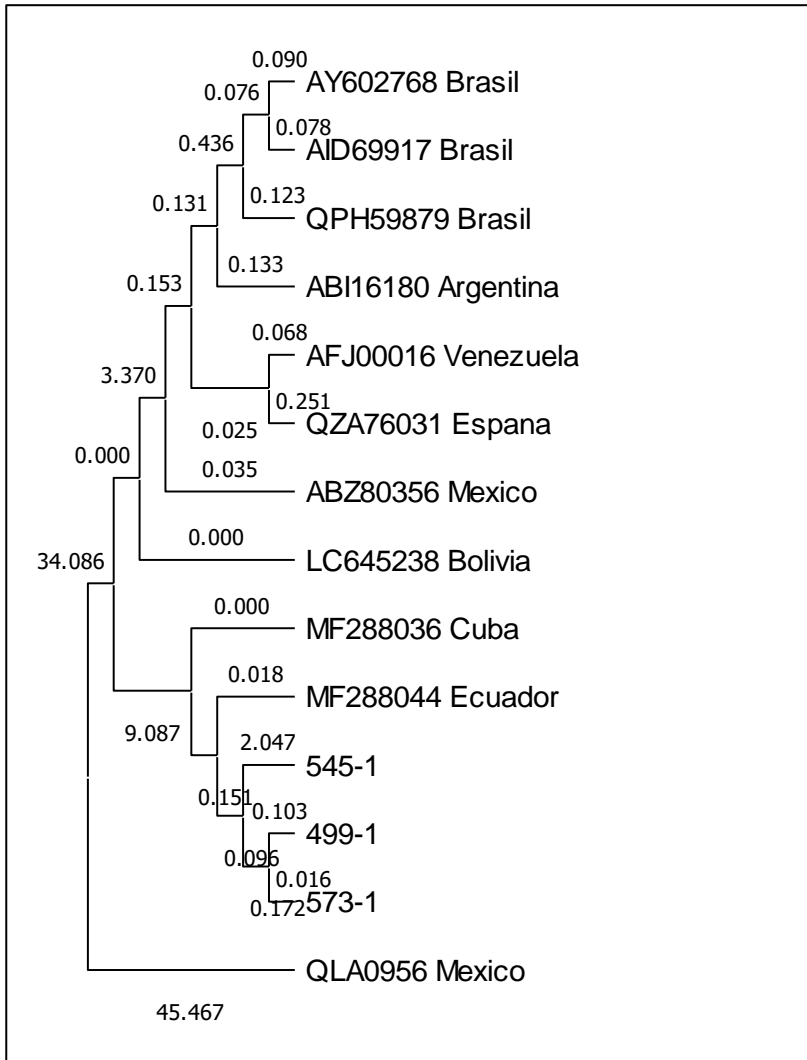


Figuras. A) Árbol filogenético de msp5;

B) Árbol filogenético de msp4



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



El análisis hecho con *msp1 α*, da a conocer la variabilidad génica de cepas que se pueden encontrar en el país, dado el peculiar caso de la muestra 543 evidencia la importancia de los estudios filogenéticos de las cepas de *A. marginale* en cada país a fin de entender los procesos epidemiológicos

Árbol filogenético de *msp1α*



CONCLUSIONES

- Se logró establecer que la prevalencia de la enfermedad es del 81,77%. Con rangos en las UPA muestreadas que van desde 61 hasta 92%.
- Anapalsmosis bovina es una enfermedad presente en los rebaños del país a pesar de que los animales puedan parecer sanos. Por lo que es importante diagnosticarla y evitar su propagación mediante el traslado de animales.
- Al encontrarse un becerro menor a 6 meses con clínica de la enfermedad, se da a conocer un caso particular de anaplasmosis bovina, por lo que los estudios de caracterización molecular son necesarios en el país a fin de obtener un panorama completo de la diversidad génica de las cepas circundantes en las zonas ganaderas.



RECOMENDACIONES

- Siendo la prevalencia del 81,77% de animales infectados, es recomendable conocer este tipo de datos, para evitar la propagación de la bacteria a zonas con animales sanos.
- Al presentarse problemas en la secuenciación de ciertos genes, entre ellos el gen *msp1 α* de la muestra de interés 543, se recomienda la clonación del gen en un vector de clonación con la finalidad de lograr una secuenciación con mayor exactitud del gen
- Este tipo de estudios en otras importantes zonas ganaderas del país a fin de discernir la variabilidad genética de las diferentes cepas de *A. marginale* con motivo de abordar mejor el control de la enfermedad.



AGRADECIMIENTOS

Proyecto Brutryp

Doctor Armando Reyna

Vanessa Armijos

Boris, Italo, Génesis, Jordan, Jessica, Angela,
Brandon, Harry, Hugo, Mateo y Lissette

Familia



¡Gracias!



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA