

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria
Ingeniería Agronómica



Proyecto Especial de Graduación
Porcentaje de prevalencia e identificación de *Anaplasma marginale*
(Theiler), agente causante de la anaplasmosis, mediante técnicas
convencionales y moleculares, en una finca bovina en El Paraíso,
Honduras

Estudiantes

Eduardo Alfredo Villarreal Paz
Tristan Fernando Flores Romero

Asesores

Jesus Orozco Ph.D.

Carolina Avellaneda Ph.D.

Honduras, agosto 2022

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

CELIA O. TREJO RAMOS

Directora del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Agradecimientos

A Dios por regalarnos la vida y la oportunidad de haber sobrepasado cada dificultad en el camino.

A nuestros padres, los culpables de nuestros éxitos.

A nuestra *Alma Mater*, quien nos regaló disciplina, formación y conocimiento.

A nuestros asesores, quienes ofrecieron su mano desinteresada para guiar nuestros pasos.

A nuestros colegas, quienes nos apoyaron incansablemente a lo largo de nuestro trabajo.

Al equipo de trabajo de cada departamento, quienes nos ofrecieron de su tiempo y apoyo en los momentos difíciles.

Contenido

Agradecimientos	3
Índice de cuadros	6
Índice de figuras	7
Índice de anexos.....	8
Resumen	9
Abstract.....	10
Introducción	11
Materiales y Métodos	15
Localización Experimental	15
Tamaño de Muestra	15
Metodología de Muestreo	16
Extracción de Muestras de Sangre	16
Extracción de Garrapatas	16
Análisis Epidemiológico e Identificación de Garrapatas	16
Realización del Frotis.....	17
Cálculo de Prevalencia	17
Identificación de Garrapatas	17
Procedimiento y Preparación para la Extracción de ADN de las Garrapatas	18
Protocolo de Extracción de ADN	18
Medición de la Calidad del ADN mediante Electroforesis	20

Primers utilizados para el Proceso del Termociclador	20
Preparación de Master Mix (1X) (PCR convencional)	21
Preparación del Termociclador para el Análisis PCR	22
Preparación de Electroforesis	22
Resultados y Discusión	23
Identificación de Especies de Garrapatas.....	24
Medición de la Calidad de ADN mediante Espectrofotómetro	27
Medición de la Calidad de ADN mediante Electroforesis	27
Sensibilidad de Examen PCR.....	28
Validación de Muestras en Transiluminador Ultravioleta	28
Conclusiones	30
Recomendaciones	31
Referencias.....	32
Anexos.....	35

Índice de cuadros

Cuadro 1 Materiales y Equipos de laboratorio.	18
Cuadro 2. Especificidad del iniciador, gen, sentido, secuencia y referencia.	21
Cuadro 3. Reactivos utilizados para la preparación del Master Mx (μL = microlitros).....	21
Cuadro 4. Perfil térmico utilizado en el termociclador (temperatura y tiempo)	22
Cuadro 5. Características morfológicas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	25
Cuadro 6. Características morfológicas de <i>Amblyomma cajennense</i>	25
Cuadro 7. Especies de garrapatas identificadas, mostrando un total, porcentaje y distribución de hembras y machos en una finca del departamento de El Paraíso, Honduras.....	25
Cuadro 8. Numero de muestra, concentraciones de ADN ng/ml y la pureza obtenida.	27

Índice de figuras

Figura 1 Ubicación de la finca en la aldea El Pataste, perteneciente al departamento de El Paraíso, Honduras.....	15
Figura 2 Observación de frotis de sangre bovina extraída de la vena coccígea en microscopio a (100X), donde se aprecian estructuras redondeadas de color rojo (eritrocitos), con ausencia de cuerpos intracelulares en la periferia y una leve deformación.	23
Figura 3 Observación de frotis de sangre bovina extraída de la vena coccígea en el microscopio a (100X), donde se aprecian estructuras redondeadas de color rojo (eritrocitos), con presencia de cuerpos intracelulares en la periferia y una leve deformación.....	24
Figura 4 A la izquierda vista dorsal de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> , se puede apreciar escutelo presente solo en una porción del dorso (hembra). A la derecha, vista dorsal de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> , se aprecia la forma hexagonal de la base del capítulo, esta identificación se realizó mediante estereoscopio.	26
Figura 5 A la izquierda vista dorsal, se aprecia un escutelo ornamentado y a la derecha vista ventral, se aprecia los festones ubicados en la zona posterior del dorso, <i>Amblyomma cajennense</i> (hembra), esta identificación se realizó mediante estereoscopio.	26
Figura 6 Observación de electroforesis en transiluminador ultravioleta, para medición de calidad del ADN extraído de garrapatas provenientes de una finca bovina en El Paraíso, Honduras.....	28
Figura 7 Imagen en transiluminador ultravioleta, la flecha indica el fragmento (número de pares de bases) donde amplificaron las muestras con la escalera molecular utilizada, siendo esta 600pb para <i>A. marginale</i>	28

Índice de anexos

Anexo A Cálculo de volumen final en diluciones realizadas para primers y DNTP's utilizados en el proceso del termociclador.	35
Anexo B Tubo de almacenamiento (15ml) para garrapatas con alcohol al 70%.	36
Anexo C Observación de un tubo de microcentrífuga, se aprecia la división de las tres zonas luego de la centrifugación.....	37
Anexo D Extracción de sangre de la vena coccígea (vena caudal).	38
Anexo E Extracción de garrapatas.	39

Resumen

Anaplasma marginale es una bacteria perteneciente al género de las rickettsias del genogrupa II de las Ehrlichias, que parasita los eritrocitos maduros del ganado bovino y causa severas pérdidas económicas fundamentalmente en las zonas tropicales y subtropicales. Para establecer un programa de manejo de la enfermedad en las producciones ganaderas, es necesario tener conocimiento de la prevalencia, vectores e identificación del patógeno causal. Con el objetivo de evaluar la prevalencia de *Anaplasma marginale* en una finca en el departamento de El Paraíso, Honduras, se analizaron muestras de sangre de 37 animales, a través de un análisis microscópico (frotis sanguíneo) y, se colectaron garrapatas de los animales muestreados. Adicionalmente se realizaron pruebas moleculares para la identificación del patógeno a nivel de especie. La prevalencia estimada fue de 51%, identificando dos especies de garrapatas, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (84.21%), *Amblyomma cajennense* (Fabricius) (15.79%). Mediante pruebas moleculares se determinó que el patógeno presente en la finca muestreada es *Anaplasma marginale*.

Palabras claves: análisis microscópico, estabilidad zoonótica, garrapatas, prevalencia, pruebas moleculares.

Abstract

Anaplasma marginale is a bacterium belonging to the genus Rickettsiae of genogroup II of the Ehrlichias, which parasitizes mature erythrocytes of cattle and causes severe economic losses mainly in tropical and subtropical zones. To establish a disease management program in livestock production, it is necessary to have knowledge of the prevalence, vectors, and identification of the causal pathogen. With the aim of evaluating the prevalence of *Anaplasma marginale* in a farm in the department of El Paraíso, Honduras, blood samples from 37 animals were analyzed through a microscopic analysis (blood smear). Ticks were also collected from the sampled animals. Additionally, molecular tests were performed to identify the pathogen at the species level. The estimated prevalence was 51%, identifying two tick species, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Minning) (84.21%), *Amblyomma cajennense* (Fabricius 1787) (15.79%). Through molecular tests it was determined that the pathogen present in the sample farm is *Anaplasma marginale*.

Keywords: microscopic analysis, molecular testing, prevalence, ticks, zoonotic stably.

Introducción

La anaplasmosis bovina es una enfermedad hemolítica causada por una bacteria Gram negativa, *Anaplasma marginale*, (Rickettsiales: Anaplasmataceae). *Anaplasma marginale* fue descubierta por Theiler en 1910. Inicialmente, Theiler lo clasificó como un protozooario, de ahí el nombre de *Anaplasma*, al estar desprovisto de citoplasma y *marginale* por su ubicación periférica en el eritrocito. Trabajos realizados Kreier y Ristic (1972), con la coloración de Gram, señalaron que era una bacteria y no un protozooario, lo cual fue aceptado en el documento clásico de las bacterias, el manual Bergey (1984) (Dumler et al. 2001).

Los eritrocitos son el único punto de infección de *A. marginale* en los bovinos; dentro de estas células, las inclusiones unidas a la membrana contienen de 4-8 rickettsias, donde un 70% o más eritrocitos pueden salir afectados por una infección aguda (Ristic et al. 1968). Una vez infectado, el ganado puede permanecer toda la vida como portador, y la identificación depende de la detección de anticuerpos específicos mediante pruebas serológicas, o del ADN de las rickettsias mediante técnicas de amplificación (Boone et al. 2012). La actividad de *A. marginale* dentro del eritrocito, origina una cantidad de cambios en la membrana del glóbulo rojo que son en buena parte responsables de la respuesta autoinmune del animal con anaplasmosis (Lesseur et al. 1992).

La anaplasmosis se presenta con una marcada anemia hemolítica, altos niveles de rickettsemia, disminución del peso, aborto y en muchos casos, la muerte en animales de más de tres años (Blanco Martínez et al. 2015). Cuando un animal mayor de un año se infecta por primera vez, la manifestación clínica es inminente y mientras más edad tenga, más grave será la enfermedad (Radostits et al. 2006). Otros signos que se pueden presentar son, daños en la piel por acción de las picaduras, pérdida de sangre, debilitamiento, estrés, disminución en la producción de leche y menor eficiencia reproductiva del hato (Fernández-Salas et al. 2012). La enfermedad clínica es más notable en bovinos, pero otros rumiantes que incluyen búfalo de

agua, bisonte, antílope africano, y ciervo se pueden convertir en persistentemente infectados con *Anaplasma* (Rajput et al. 2005).

La enfermedad suele transmitirse por garrapatas, pero también puede producirse una transmisión mecánica por picadura de insectos o por agujas (OIE 2014). Entre los vectores artrópodos están algunos géneros de garrapatas, principalmente *Boophilus* y *Dermacentor* (Sauer y Hair 1986); (Zaugg et al. 1986); (Potgieter et al. 1983), *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Yeruham y Braverman 1981) y Los mosquitos *Siphona* spp. y *Psophona* spp.; y tábanos del género *Tabanus* (Ristic et al. 1968).

En el caso de las garrapatas, estas adquieren el agente al alimentarse de animales que se encuentran en la fase aguda de la enfermedad y aún quizás en la fase subclínica; dentro del vector, la bacteria pasa del intestino a las glándulas salivales transmitiéndose a un nuevo hospedero cuando la garrapata se alimenta nuevamente (Harrus et al. 1998). Una garrapata adulta puede sobrevivir hasta 568 días sin alimentarse y posee la capacidad de transmitir el agente hasta 155 días pos-infección (Harrus et al. 1998). Un estudio de experimentos de transmisión presenta una lista de hasta 19 garrapatas diferentes capaces de transmitir experimentalmente *A. marginale*, *Argas persicus* (Oken), *Ornithodoros lahorensis* (Neumann), *Boophilus annulatus*, (Packard), *B. calcaratus* (Lahille), *B. decoloratus* (Stiles & Hassall) *B. microplus* (Minning), *Dermacentor albipictus* (Packard), *D. andersoni* (Stiles), *D. hunteri* (Bishopp), *D. occidentalis* (Marx), *D. variabilis* (Say), *Hyalomma excavatum* (Koch), *H. rufipes* (Koch), *Ixodes ricinus* (Linnaeus), *I. scapularis* (Say), *Rhipicephalus annulatus* (Say), *R. bursa* (Canestrini y Fanzago), *R. calcaratus* (Birula), *R. decoloratus* (Koch), *R. evertsi* (Neumann), *R. sanguineus* (Latreille) y *R. simus* (Koch). *Rhipicephalus microplus* es la garrapata que más repercute en Centroamérica, África y Asia, con mayor incidencia en el corredor biológico del caribe (Guglielmone et al. 2006) y es quizás el vector más importante en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Stiller et al. 1989).

La presencia de esta enfermedad dentro de explotaciones ganaderas significa pérdidas económicas en el contexto mundial de hasta 2.5 billones de dólares (Vecino et al. 2014). La FAO señala que para el año 2030 el consumo total de la carne se incrementará un total de 32% y el consumo de la leche un 42% (Food and Agriculture Organization 2009).

Para la detección de anticuerpos de *A. marginale*, la fijación del complemento fue muy utilizada hasta hace unas décadas (Corona Gonzalez et al. 2014). La aglutinación en tarjeta, la inmunofluorescencia indirecta, y las pruebas ELISA son las más utilizadas para la detección de anticuerpos, pero muchas de estas técnicas utilizan antígenos crudos, contaminados con membranas del eritrocito, lo que da como resultado un número elevado de falsos negativos cuando se analizan animales persistentemente infectados (Rajput et al. 2005).

El sector agropecuario es importante para la economía de Honduras; este representa el 12.9% del Producto Interno Bruto (PIB), el 35.6% del valor total de las exportaciones del país, y emplea al 35% de la población económicamente activa. El sector agropecuario también juega un papel esencial en la reducción de la inseguridad alimentaria y nutricional. Un total de 1.2 millones de personas, el 11% de la población total, se encuentra en situación de malnutrición (Derlagen et al. 2019). La tasa de mortalidad bovina en Honduras esta arriba de los parámetros establecidos por problemas de manejo y sanidad del ganado nacional (Leiva 2015)

Desafortunadamente, en Honduras aún no se cuenta con información sobre la prevalencia de *A. marginale* dentro de las producciones ganaderas, actualmente los dos únicos datos existentes sobre la presencia de la bacteria son proporcionados por la Federación Nacional de Ganaderos de Honduras (FENAGH) y por investigación realizada en Zamorano, con fincas seleccionadas en el departamento de Choluteca, donde se encontró en porcentaje de prevalencia de 83.84% en los 270 bovinos muestreados (Padilla, Tesis sin publicar).

Para establecer un programa de manejo de la enfermedad en las producciones ganaderas, es necesario tener conocimiento de la prevalencia, vectores e identificación del agente causal. Para evaluar los parámetros antes mencionados se establecieron los siguientes

objetivos en la investigación: determinar la presencia y prevalencia de *A. marginale* en una finca de ganado bovino en el departamento de El Paraíso, mediante prueba convencional de frotis sanguíneo; identificar las especies de garrapatas involucradas en la transmisión de *A. marginale*; e, identificar el agente causal mediante técnicas moleculares.

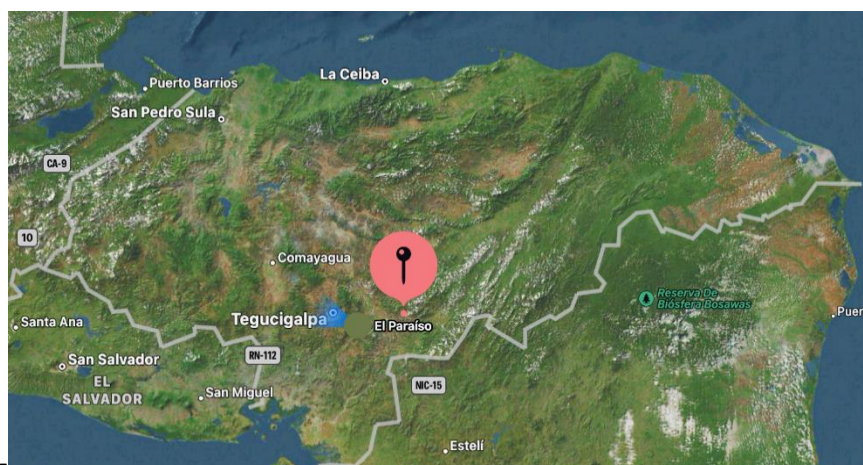
Materiales y Métodos

Localización Experimental

El estudio se realizó en el departamento de El Paraíso, Honduras en marzo del 2022. En una finca de ganado bovino lechero ubicada en la aldea El Pataste, perteneciente al municipio de Danlí. (Figura 1). La finca está ubicada entre los 14.09358º latitud norte y 86. 66529º latitud oeste. La aldea cuenta con una altitud media de 855 msnm., temperatura y humedad relativa media anual de 21°C – 32°C y respectivamente, con una precipitación anual de 85.75mm.

Figura 1

Ubicación de la finca en la aldea El Pataste, perteneciente al departamento de El Paraíso, Honduras



Tamaño de Muestra

La finca donde se realizó el estudio cuenta con una población total de 130 bovinos, en el cual se muestrearon un total de 37 individuos, una muestra que representa un total del 28% de los bovinos ubicados dentro de la finca.

Metodología de Muestreo

Para la selección de los 37 individuos se consideraron los factores de edad y la raza. De cada animal se recolectaron 3 mL de sangre y cinco garrapatas. Las edades de los animales muestreados fueron seleccionados entre un rango de: 1) 1–2 años, 2) > a 2 años. Todas las razas seleccionadas para la investigación fueron encastes.

Extracción de Muestras de Sangre

La extracción de sangre de los bovinos se realizó mediante una punción en la vena coccígea, utilizando jeringas de 5 mL y 10 mL respectivamente, se recolectó un volumen total de 3 mL por cada muestra. Las muestras de sangre fueron almacenadas en tubos vacutainer de 5 mL con anticoagulante EDTA K3. Posteriormente los tubos fueron rotulados con el número del animal muestreado y almacenados en una nevera a una temperatura entre 4-7 °C hasta su traslado al Laboratorio de Entomología de la EAP, para su posterior análisis.

Extracción de Garrapatas

La extracción de las garrapatas se realizó mediante una pinza metálica; se recolectaron cinco garrapatas por animal. No se consideró el lugar de extracción de las garrapatas. Las garrapatas fueron depositadas en tubos con alcohol al 70 % para su preservación, previamente rotulados con el número del animal y almacenados en cajas para su traslado al Laboratorio de Entomología de EAP para su identificación.

Análisis Epidemiológico e Identificación de Garrapatas

Las muestras de sangre recolectadas de los bovinos fueron refrigeradas hasta el momento de realizar los análisis, 24 horas después de su recolección. Mediante un examen microscópico de frotis sanguíneo, se determinó la presencia de los cuerpos de inclusión intracelulares en los eritrocitos de la sangre de los bovinos, este examen fue realizado en el Laboratorio de Entomología de la EAP.

Realización del Frotis

Se utilizaron las muestras de sangre recolectadas del ganado bovino, estas fueron almacenadas en tubos con anticoagulante y trasladadas bajo refrigeración. Para la realización del frotis, se utilizó una gota fina de sangre y dos portaobjetos. La gota fue colocada sobre un portaobjeto y, se realizó el extendido de la sangre sobre la superficie con un segundo portaobjetos inclinado a un ángulo de 45°. Las muestras se dejaron secar al ambiente durante una hora, seguido de esto, fueron teñidas con tinción de Wright y se dejaron secar durante 10 minutos. Posteriormente, fue aplicado un buffer a las muestras y se dejaron secar durante 10 minutos, seguido de esto, se lavaron las muestras con agua potable para retirar el restante de tinción. Las muestras fueron colocadas sobre papel toalla, para retirar las gotas de agua restante y posteriormente fueron analizadas. Las muestras se observaron en un microscopio a 100x, agregando una gota de aceite de inmersión sobre la muestra. Fue objetivo observar la presencia de cuerpos de inclusión intracelulares en la zona periférica de los glóbulos rojos de la sangre bovina.

Cálculo de Prevalencia

Se obtuvo el porcentaje de prevalencia por medio de la siguiente ecuación [1].

$$Prevalencia (\%) = \frac{\text{Número de muestras positivas}}{\text{Número total de muestras}} = 100\% [1]$$

Identificación de Garrapatas

Las garrapatas colectadas de los animales muestreados se identificaron con la ayuda de un estereoscopio. Las características utilizadas para su identificación fueron: escutelo, aparato bucal (hipostoma), festones, surcos marginales, placas ventrales y base del capítulo. Se definió el sexo, la familia, el género y la especie para su correcta identificación, esta actividad se realizó con las claves de Egizi et al. (2019).

Procedimiento y Preparación para la Extracción de ADN de las Garrapatas

Se utilizaron equipos y materiales para la extracción de ADN de las garrapatas, los cuales fueron provistos por el Laboratorio de Fitopatología, diagnóstico y análisis de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano (Cuadro1).

Cuadro 1

Materiales y Equipos de laboratorio utilizados para la extracción de ADN de garrapatas provenientes de una finca bovina en El Paraíso, Honduras.

Materiales	Equipo
Etanol al 100%	Microcentrífuga capaz de al menos 14,000 rpm
Isopropanol al 100%	Tubos de microcentrífuga sin nucleasa (1.5 mL)
Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)	
Acetato de Sodio (3M)	

Protocolo de Extracción de ADN

Para la realización del protocolo de extracción de ADN de las garrapatas, se emplearon las muestras que habían sido almacenadas a una temperatura de 4 °C. Únicamente fueron seleccionadas las garrapatas que habían sido recolectadas de los animales que mediante los frotis sanguíneos mostraron cuerpos de inclusión en la periferia de los eritrocitos. Se seleccionó el método de extracción para insectos que fue provisto por el kit E.Z.N.A.® Insect DNA Kit.

Para la extracción del ADN fue necesario romper los tejidos de las muestras, para esto, las garrapatas fueron pulverizadas con nitrógeno líquido en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.

Se Agregaron 350 µL de CTL Buffer y 25 µL de solución de proteinasa K y se colocaron en el disruptor durante 20 segundos. Seguido de esto, las muestras se incubaron en un baño maría a 65 °C por un periodo de tiempo de 30 minutos o hasta que la muestra se solubilizara completamente. Se agregaron 350 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se colocaron en el disruptor durante 20 segundos para su correcta mezcla.

Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante dos minutos a una temperatura de 4 °C. Después del centrifugado, las muestras se dividieron en tres zonas, el sobrenadante, la capa divisoria y la parte lechosa. El sobrenadante fue transferido a un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml, evitando contaminar la fase acuosa con la fase lechosa, que contiene inhibidores y contaminantes. Se agregó un volumen de BL Buffer igual al volumen de sobrenadante obtenido en cada muestra y 2 µL de RNAsa, posteriormente las muestras fueron colocadas en el disruptor a máxima velocidad durante 15 segundos.

Las muestras fueron incubadas a 65°C durante 10 minutos. Se agregó un volumen de etanol al 100 % igual al volumen de sobrenadante obtenido de cada muestra y se colocaron en el disruptor a máxima velocidad durante 15 segundos. Se insertó una mini columna de ADN HiBind® en un tubo de recogida de 2 ml. Se prosiguió con el protocolo para el equilibrio de columnas, agregando 100 µl de Acetato de Sodio 3M a la mini columna de ADN HiBind® y se dejó reposar durante cuatro minutos.

Las muestras fueron centrifugadas a máxima velocidad durante 20 segundos, el filtrado obtenido fue desechado y se reutilizó el tubo de recolección. Los volúmenes de listado aclarado de cada muestra fueron transferidos a la mini columna de ADN HiBind®. Estas muestras fueron centrifugadas a máxima velocidad durante un minuto, se desechó el filtrado obtenido y se reutilizó el tubo de recolección. Se agregaron 500 µL de HBC Buffer, se centrifugó a máxima velocidad durante 30 segundos y se desechó el filtrado. Se agregaron 700 µL de Buffer de lavado de ADN, se centrifugó a máxima velocidad durante un minuto y se desechó el filtrado. Se centrifugó la mini columna HiBind® DNA vacía durante 2 minutos a velocidad máxima para secar la matriz de la columna.

Se transfirió la mini columna de ADN HiBind® a un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml y se agregaron 50 µL de Buffer de elución, directamente al centro de la membrana de la columna. Las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 2 minutos y se centrifugaron a máxima velocidad durante 1 minuto. Se estimó un paso del 70% de ADN con

este último paso, por consiguiente, se realizó una segunda elución para asegurar el paso del 30% de ADN restante, obteniendo un volumen de elución total de 50 µL. Como último paso, el ADN obtenido fue almacenado a -20°C. Cuantificación de ADN en espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop® ND-1000.

Para cuantificar la concentración de las muestras de ADN, se hizo uso de un espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop® ND-1000 provisto por el Laboratorio de Fitopatología, diagnóstico y análisis de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Se utilizó el programa de software Nano Drop 1000 3.7, para operar el espectrofotómetro, utilizando el modelo de Nucleic Acid para realizar la cuantificación del ADN. Se utilizaron volúmenes de 2 µL para cada muestra, la cuantificación se realizó para estimar dos factores: 1) La concentración de ADN en ng/µL y 2) la pureza de los ácidos nucleicos, utilizando una relación de absorbancia 260/280 nm.

Medición de la Calidad del ADN mediante Electroforesis

Para la medición de calidad de ADN, se utilizó la técnica de electroforesis. Para la realización de esta práctica se preparó un gel de agar al 1%.

Primers utilizados para el Proceso del Termociclador

Se emplearon iniciadores de la casa comercial Integrated DNA Technologies, esperando la amplificación del fragmento de 18-25 bases nitrogenadas (Cuadro 2). Estos iniciadores fueron provistos por el Laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Identificación de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano.

Cuadro 2

Especificidad de los cebadores, gen, sentido, secuencia y referencia utilizados para la detección del gen msp1 β en el ADN extraído de las garrapatas provenientes de la finca bovina de El Paraíso, Honduras.

Especificidad de	Gen	Sentido	Secuencia	Referencia
<i>A. marginale</i>	msp1 β	Directo	5'- CCATCCTCGGCCGTATTCCAGCGCA- 3	Molad et al, 2006
	msp1 β	Inverso	5'-CTGCCTTCGCGTCGATTGCTGTGC-3'	

Preparación de Master Mix (1X) (PCR convencional)

El master mix fue realizado utilizando concentraciones convencionales para la realización de una PCR, agregando esta master mix a las 19 muestras de ADN, las cuales fueron introducidas a un termociclador con un perfil térmico específico para su reacción (Cuadro3).

Cuadro 3

Reactivos utilizados para la preparación del Master Mx (μL = microlitros), para la amplificación de los cebadores AMLA-B3 R y AMLA-F3 F en electroforesis.

Reactivos	Cantidades (μL)
H ₂ O PCR	6.7
DNA	6
Buffer PCR 10X	2
DNTP's	2
MgCl ₂	1
Primer F	1
Primer R	1
Taq Polimerasa	0.3
Volumen total	20

Preparación del Termociclador para el Análisis PCR

Se utilizó el perfil térmico mencionado en investigaciones por Khumalo (2012) (Cuadro 4).

Cuadro 4

Perfil térmico utilizado en el termociclador (temperatura y tiempo)

Pasos	Temperatura/tiempo
1) Desnaturalización inicial	95°C / 1 minuto
2) Desnaturalización	95°C / 30 segundos
3) Anillamiento	55°C / 1 minuto
4) Extensión	72°C / 1 minuto
5) 40 ciclos	Desnaturalización del paso 2)
6) Extensión final	72°C / 7 minutos
7) Retención final	4°C

Preparación de Electroforesis

Se agregó un volumen de 20 mL de Buffer TAE 50X a una probeta de 1 litro, se aforó con agua destilada, obteniendo una concentración de 1X TAE. Seguido de esto, se extrajeron 150 mL de la solución realizada y se depositaron en un Erlenmeyer. Se agregaron 1.5 g de agarosa al 1% en 1X TAE y se calentaron al microondas durante tres minutos. Posteriormente, se agregó un volumen de 7.5 µL de bromuro de etidio y se dejó reposar dentro de una cámara extractora. Se preparó el recipiente acrílico para la posterior solidificación de la solución, luego de cinco minutos la solución fue colocada en el acrílico juntos con los peines para la realización de las celdas. Se dejó reposar durante 15 minutos hasta la solidificación de la solución acuosa. Una vez el agar solidificó la solución, fue colocada en el acrílico para electroforesis. Se extrajo un volumen de 4 µL de las muestras de ADN, estas fueron diluidas con 2 µL de Buffer de carga y colocadas en cada celda respectivamente. Se estableció la electroforesis con un amperaje de 80 watts durante una hora y 10 minutos. El gel fue observado bajo un transiluminador ultravioleta.

Resultados y Discusión

Se analizaron un total de 37 muestras de sangre bovina, las cuales fueron sometidas a un análisis microscópico para determinar la presencia de cuerpos de inclusión intracelulares de *Anaplasma* (Figuras 2 y 3), 8 muestras fueron positivas (21%) y 29 muestras negativas (79%).

Figura 2

Observación de frotis de sangre bovina extraída de la vena coccígea en microscopio a (100X), donde se aprecian estructuras redondeadas de color rojo (eritrocitos), con ausencia de cuerpos intracelulares en la periferia y una leve deformación.

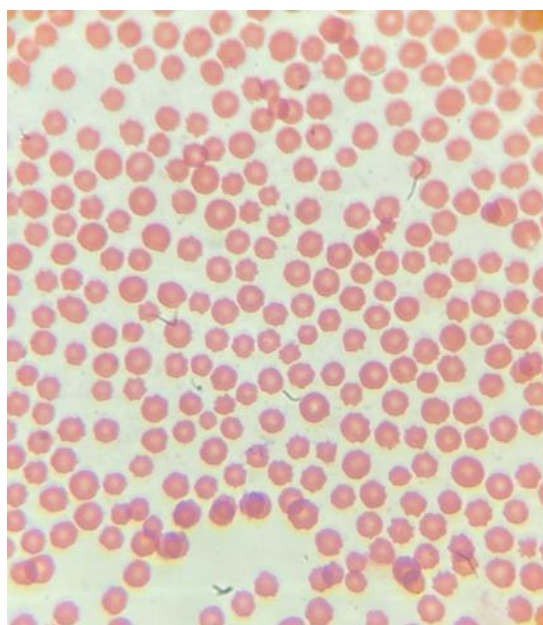
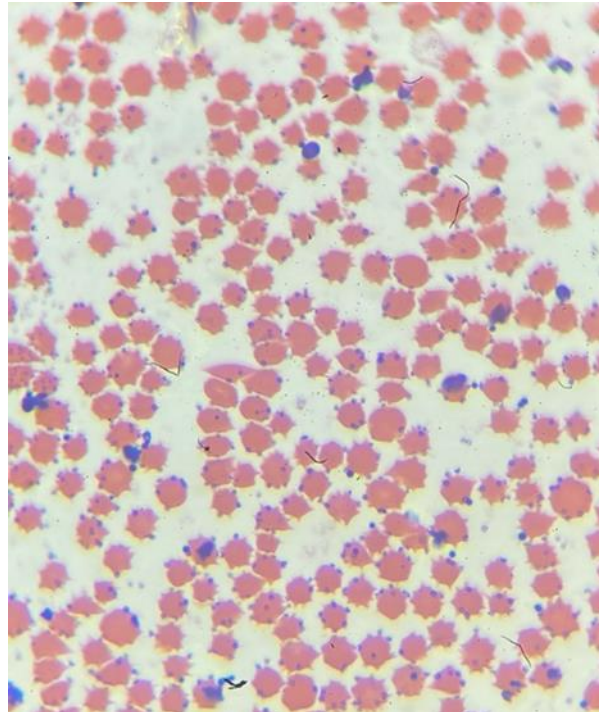


Figura 3

Observación de frotis de sangre bovina extraída de la vena coccígea en el microscopio a (100X), donde se aprecian estructuras redondeadas de color rojo (eritrocitos), con presencia de cuerpos intracelulares en la periferia y una leve deformación.



Identificación de Especies de Garrapatas

Se identificaron dos especies de garrapatas, *Rhipicephalus B. microplus* y *Amblyomma cajennense* (Cuadros 5 y 6). *Rhipicephalus B. microplus* (Figura 4) presentó 42 machos y 134 hembras, representando el 67% de las garrapatas, por otro lado, *A. cajennense* (Figura 5), presento un número total de 0 machos y 33 hembras, representando el 33% (Cuadro 7).

Cuadro 5

Características morfológicas de Rhipicephalus (Boophilus) microplus.

Características morfológicas	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
Escutelo	Ovalado y ancho en la parte anterior
Surcos marginales	-
Aparato bucal (hipostoma)	Palpos ligeramente más cortos que el hipostoma
Festones	Carencia
Base del capitulum	Forma hexagonal
Placas ventrales	Forma redonda u ovalada

Cuadro 6

Características morfológicas de Amblyomma cajennense.

Características morfológicas	<i>Amblyomma cajennense</i>
Escutelo	Ornamentado
Surcos marginales	Ausentes
Aparato bucal (hipostoma)	Palpos largos y delgados; hipostoma largo
Festones	Ápice en los festones
Base del capitulum	Sub – rectangular
Placas ventrales	-

Cuadro 7

Especies de garrapatas identificadas, mostrando un total, porcentaje y distribución de hembras y machos en una finca del departamento de El Paraíso, Honduras.

Especie de garrapatas	Sexo		Total	Distribución (%)
	Hembra	Macho		
<i>R. microplus</i>	134	42	176	84.21
<i>A. cajennense</i>	33	0	33	15.79
Distribución (%)	79.9	20.1		100.0

Figura 4

A la izquierda vista dorsal de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, se puede apreciar escutelo presente solo en una porción del dorso (hembra). A la derecha, vista dorsal de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, se aprecia la forma hexagonal de la base del capítulo, esta identificación se realizó mediante estereoscopio.



Figura 5

A la izquierda vista dorsal, se aprecia un escutelo ornamentado y a la derecha vista ventral, se aprecia los festones ubicados en la zona posterior del dorso, *Amblyomma cajennense* (hembra), esta identificación se realizó mediante estereoscopio.



Medición de la Calidad de ADN mediante Espectrofotómetro

Con el protocolo de extracción provisto por el E.Z.N.A.® Insect DNA Kit, se obtuvo una media de calidad de 268.05 ng/uL, una mínima de 2.72 ng/uL y una máxima de 1401.53 ng/uL (Cuadro 8).

Cuadro 8

Número de muestra, concentraciones de ADN ng/mL y la pureza obtenida en muestras extraídas de garrapatas de una finca en El Paraíso, Honduras.

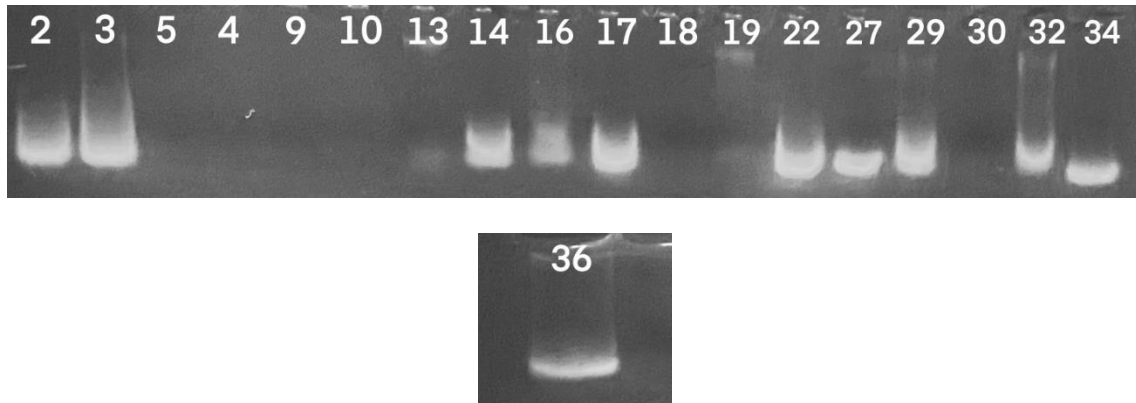
Muestra	Concentración (ng/μL)	Calidad (A260/280)
M 2	778.34	2.11
M 3	1401.53	2.13
M 5	3.76	2.22
M 4	5.32	1.74
M 9	2.72	5.07
M 10	19.24	2.00
M 13	100.92	2.14
M 14	267.07	2.13
M 16	92.92	2.04
M 17	779.02	2.14
M 18	28.76	0.95
M 19	40.33	2.00
M 22	4.99	2.10
M 27	6.40	1.67
M 29	505.91	2.07
M 30	19.74	2.18
M 32	375.17	2.08
M 34	278.38	1.97
M 36	382.50	2.00

Medición de la Calidad de ADN mediante Electroforesis

Al realizar la medición de calidad mediante electroforesis se puede apreciar que no todas las muestras realizadas obteniendo una buena calidad dado a que no todas las muestras corrieron adecuadamente (Figura 6).

Figura 6

Observación de electroforesis en transiluminador ultravioleta, para medición de calidad del ADN extraído de garrapatas provenientes de una finca bovina en El Paraíso, Honduras.

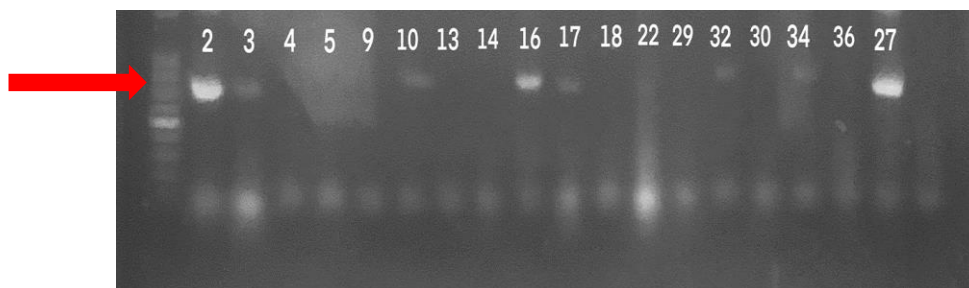


Sensibilidad de Examen PCR

Los productos del termociclador fueron analizados en electroforesis con gel de agarosa al 1% y una escalera de peso molecular de 100pb para ser observadas en transiluminador ultravioleta (Figura 7)

Figura 7

Imagen en transiluminador ultravioleta, la flecha indica el fragmento (número de pares de bases) donde amplificaron las muestras con la escalera molecular utilizada, siendo esta 600pb para A. marginale.



Validación de Muestras en Transiluminador Ultravioleta

Las muestras positivas en el examen microscópico de frotis sanguíneo fueron corridas en el termociclador, procesadas en electroforesis y posteriormente observadas en el transiluminador ultravioleta. Fue objetivo analizar las muestras amplificadas en banda de 600

pares de bases (pb), utilizando una escalera de peso molecular de 100 pb. en el transiluminador, obteniendo un resultado de ocho muestras positivas para *A. marginale*, (M2, M3, M10, M16, M17, M32, M34 y M27). Estos resultados son comparables con Corona y Martínez (2011), donde su amplificación del gen fue posible en todos los aislamientos de *A. marginale* probados, apareciendo una banda de 653pb. De igual forma, los resultados se comparan con los obtenidos por Corona et al. (2012), quienes mencionan que la identificación de *Anaplasma marginale* fue confirmada con la secuenciación de uno de los fragmentos de 345 pb amplificado.

Conclusiones

Se identificó que las garrapatas que afectan el hato ganadero son la *Amblyomma cajennense* con un porcentaje de 15.79% y la *R. (Boophilus) microplus* con un porcentaje de 84.21%. De igual forma, se determinaron estas especies como principales vectores.

Como resultado de las pruebas moleculares realizadas en la garrapata, se logró identificar el agente causal a nivel de especie, siendo esta *A. marginale* señalada por los iniciadores utilizados.

Se determinó la presencia de *A. marginale* en la finca ubicada en el departamento de El Paraíso, Honduras con una prevalencia del 21.6 % del hato ganadero, por lo que la finca es considerada una zona enzoótica.

Recomendaciones

Evaluar la enfermedad dependiendo de la época del año (lluvia o seca) para determinar el porcentaje de incidencia en el ganado bovino según el comportamiento del ectoparásito hematófago en los dos diferentes escenarios.

Recolectar un mayor número de garrapatas en el hato ganadero, para obtener una mayor cantidad y mejor calidad de muestras extraídas de ADN.

Realizar una separación de garrapatas a nivel de especie para identificar la garrapata vector y mejorar resultados a nivel de control del espécimen.

Referencias

- Blanco Martínez R, Cardona Álvarez J, Vargas Vilorio M. 2015. Prevalencia de parásitos hematópicos endoglobulares en bovinos gyr puros en Córdoba, Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*. (31):67. doi:10.19052/mv.3710.
- Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM, editores. 2012. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume One: the Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. 2nd ed. New York: Springer. 1 online resource. ISBN: 9781441931597.
- Corona B, Martínez S. 2011. Detección de *Anaplasma marginale* en bovinos, mediante la amplificación por PCR del gen *msp5*. *Revista de Salud Animal*. 33(1):24–31.
- Corona B, Obregón D, Martínez S, Espinosa I, Fonseca H, Roque E. 2012. Detección por PCR de *Anaplasma marginale* en búfalos de la región occidental en Cuba. *Revista Salud Animal*. 34(1):11–18.
- Corona Gonzalez B, Alemán Y, Alfonso P, Vega E, Díaz E, Martínez M. 2014. Tendencias en el diagnóstico de la anaplasmosis bovina. *Revista de Salud Animal [Reseña]*. 36(Volumen 36):73–79. <https://www.researchgate.net/publication/317519765>.
- Derlagen C, Salvo CP de, Egas Yerovi JJ, Pierre G. 2019. *Análisis de políticas agropecuarias en Honduras*. [sin lugar]: Inter-American Development Bank.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 51(Pt 6):2145–2165. eng. doi:10.1099/00207713-51-6-2145.

- Egizi AM, Robbins RG, Beati L, Nava S, Vans CR, Occi JL, Fonseca DM. 2019. A pictorial key to differentiate the recently detected exotic *Haemaphysalis longicornis* Neumann, 1901 (Acari, Ixodidae) from native congeners in North America. *Zookeys*. (818):117–128. eng. doi:10.3897/zookeys.818.30448.
- Fernández-Salas A, Rodríguez-Vivas RI, Alonso-Díaz MA. 2012. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. *Vet Parasitol*. 183(3-4):338–342. eng. doi:10.1016/j.vetpar.2011.07.028.
- Food and Agriculture Organization. 2009. El estado mundial de la agricultura y la alimentación: La ganadería a examen. Roma: FAO. 184 p. ISBN: 9789253062157.
- Guglielmone AA, Beati L, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Nava S, Venzal JM, Mangold AJ, Szabó MPJ, Martins JR, González-Acuña D, et al. 2006. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Exp Appl Acarol*. 40(2):83–100. eng. doi:10.1007/s10493-006-9027-0.
- Harrus S, Waner T, Aizenberg I, Foley JE, Poland AM, Bark H. 1998. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. *J Clin Microbiol*. 36(1):73–76. eng. doi:10.1128/JCM.36.1.73-76.1998.
- Khumalo Z. 2012. Development of species-specific polymerase chain reaction (PCR), REAL-TIME PCR and loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detection of *Anaplasma marginale* strains in South Africa. Department of Zoology and Entomology.
- Kreier JP, Ristic M. 1972. Definition and taxonomy of *Anaplasma* species with emphasis on morphologic and immunologic features. *Z Tropenmed Parasitol*. 23(1):88–98. eng.
- Leiva P. 2015. Diagnóstico situacional de la industria de carne de res en Honduras [Tesis de pregrado]. Valle de Yegua: Escuela Agrícola Panamericana Zamorano.
- Lesseur M, Aso P, Contreras-Bretaña M, Gierdina S. 1992. Immunolabeling and Ultrastructural Localization of an *Anaplasma marginale* Soluble Antigen. 1(1):87–102.
- OIE. 2014. Manual de las pruebas de diagnóstico y vacunas para los animales terrestres. Manual Terrestre de la OIE. 2.4.2:1–18.

- Potgieter FT, Kocan KM, McNew RW, Ewing SA. 1983. Demonstration of colonies of *Anaplasma marginale* in the midgut of *Rhipicephalus simus*. *Am J Vet Res.* 44(12):2256–2261. eng.
- Radostits O, Gay C, Hinchcliff K, Constable P, editores. 2006. *Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th ed. Edinburgh: Saunders - Elsevier. 2156 p. ISBN: 0702027774. eng.
- Rajput ZI, Hu S-H, Arijo AG, Habib M, Khalid M. 2005. Comparative study of *Anaplasma* parasites in tick carrying buffaloes and cattle. *J Zhejiang Univ Sci B.* 6(11):1057–1062. eng. doi:10.1631/jzus.2005.B1057.
- Ristic M, Sibinovic S, Welter CJ. 1968. An attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc.* 72:56–69. Eng.
- Sauer J, Hair J. 1986. Development of *Anaplasma marginale* Theiler in ixodid ticks: coordinated development of a rickettsial organism and its tick host. *Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks.* 472–505.
- Stiller D, Kocan KM, Edwards W, Ewing SA, Barron JA. 1989. Detection of colonies of *Anaplasma marginale* in salivary glands of three *Dermacentor* spp infected as nymphs or adults. *Am J Vet Res.* 50(8):1381–1385. eng.
- Vecino JAC, Echeverri JAB, Cárdenas JA, Herrera LAP. 2014. Distribución de garrapatas *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* en bovinos y fincas del Altiplano cundiboyacense (Colombia). *Ciencia & Tecnología Agropecuaria.* 11(1):73–84. doi:10.21930/rcta.vol11_num1_art:197.
- Yeruham J, Braverman Y. 1981. Review the Transmission of *Anaplasma marginale* to Cattle by Blood-Sucking Arthropods. 37–44.
- Zaugg JL, Stiller D, Coan ME, Lincoln SD. 1986. Transmission of *Anaplasma marginale* Theiler by males of *Dermacentor andersoni* Stiles fed on an Idaho field-infected, chronic carrier cow. *Am J Vet Res.* 47(10):2269–2271. eng.

Anexos

Anexo A

Cálculo de volumen final en diluciones realizadas para primers y DNTP's utilizados en el proceso del termociclador.

$$C1V1 = C2V2$$

$$V2 = \frac{C1V1}{C2} \text{ [2]}$$

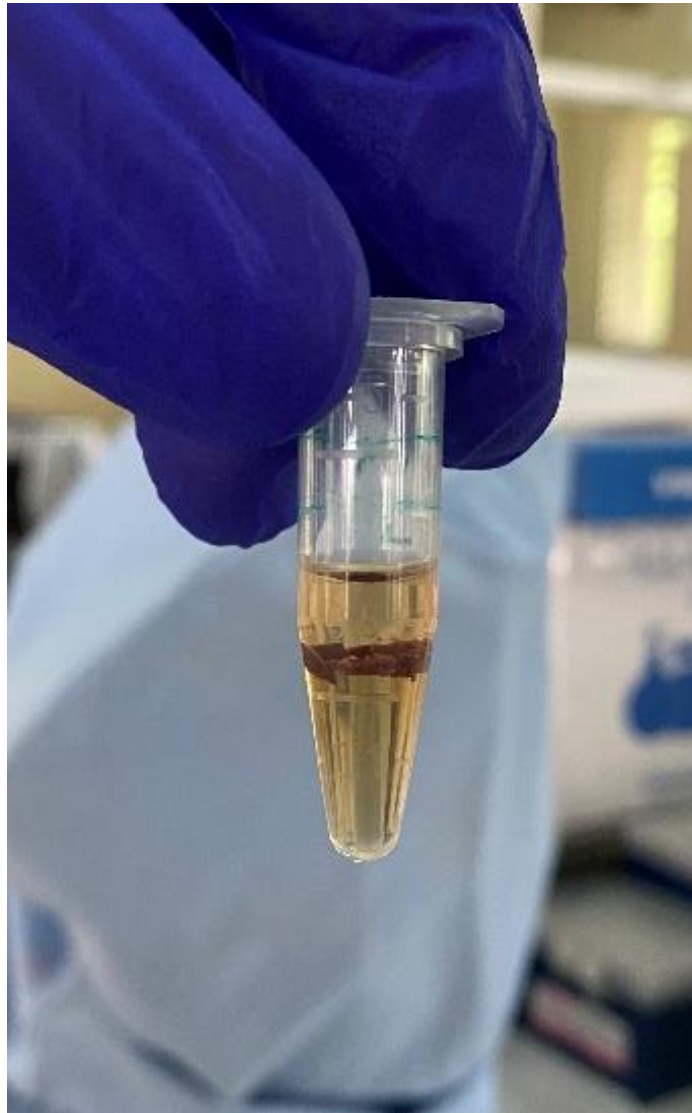
Anexo B

Tubo de almacenamiento (15ml) para garrapatas con alcohol al 70%.



Anexo C

Observación de un tubo de microcentrífuga, se aprecia la división de las tres zonas luego de la centrifugación.



Anexo D

Extracción de sangre de la vena coccígea (vena caudal).



Anexo E

Extracción de garrapatas.

