

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Optimización de un protocolo de extracción de ADN a partir de  
sangre bovina hemolizada y coagulada para la detección  
molecular de *Anaplasma* spp.**

**Disertación previa a la obtención del título de Microbiólogo**

**TOMÁS HUMBERTO LANDÁZURI RAFAEL**

**Quito, 2020**

## **CERTIFICADO**

Certifico que la Disertación previa a la obtención del título de Microbiólogo del Sr. Tomás Humberto Landázuri Rafael ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Mgr. Sonia Margarita Estrella Vásquez

Director de la Disertación

Quito, 20 de enero de 2020

## **DEDICATORIA**

A mi familia, a la de aquí y de allá.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Verónica Barragán por permitirme hacer parte de este proyecto de investigación y por su apreciada guía durante el desarrollo del mismo.

A Sonia M. Estrella por su revisión y comentarios que ayudaron en gran medida a mejorar el manuscrito.

Al Instituto de Microbiología – USFQ por permitirme usar sus instalaciones sin restricción.

A mi madre, Violeta Rafael, por darme todo su apoyo, cariño, paciencia y confianza durante todo el transcurso de mi carrera. Y más allá de lo académico, por ser una inspiración y modelo de vida.

A mi hermana Violeta Landázuri y mi cuñado Simón Bernard, por nunca dudar de mi potencial y siempre motivándome cuando no supe creer en mí.

A las personas que ya no me acompañan porque, aunque estén ausentes, han sido y siempre serán un pilar de luz en mi vida que me motiva para seguir adelante.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>Carátula.....</b>	<b>I</b>
<b>Certificado de aprobación .....</b>	<b>II</b>
<b>Dedicatoria.....</b>	<b>III</b>
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabla de contenidos.....</b>	<b>V</b>
<b>Lista de figuras .....</b>	<b>VI</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>VII</b>
<b>Lista de anexos .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>2</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>3</b>
<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>5</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>8</b>
<b>Discusión .....</b>	<b>12</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>15</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>15</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>20</b>

## **LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1.** Concentración de ADN (ng/μl) obtenida por cada volumen de sangre ..... **9**
- Figura 2.** Pureza de ADN obtenida para los Protocolos de Singh Original y Modificado .... **10**

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Secuencias de Cebadores y Tamaño de Amplicones .....	<b>8</b>
<b>Tabla 2.</b> Tablas cruzadas de resultados de <i>Anaplasma</i> spp. por reacción de PCR entre métodos de extracción (n=30). .....	<b>11</b>
<b>Tabla 3.</b> Presencia de <i>Anaplasma</i> spp. por PCR (n = 109) .....	<b>12</b>
<b>Tabla 4.</b> Costo relativo por muestra de métodos de extracción de ADN .....	<b>14</b>

## **LISTA DE ANEXOS**

<b>Anexo 1.</b> Protocolo de Singh et al. (2018).....	<b>20</b>
<b>Anexo 2.</b> Resultados de PCR- <i>Anaplasma</i> spp. de protocolos de extracción diferentes. ....	<b>21</b>



**Optimización de un protocolo de extracción de ADN a partir de sangre bovina hemolizada y coagulada para la detección molecular de *Anaplasma* spp.**

**Optimization of a DNA extraction protocol from hemolyzed and coagulated bovine blood for the molecular detection of *Anaplasma* spp.**

**Autores:** Tomas Landázuri Rafael<sup>1\*</sup>, Andrés Carrasco<sup>2</sup>, Renato León<sup>2</sup>, Lenin Vinuesa<sup>3</sup>, Verónica Barragán<sup>2</sup> y Sonia M. Estrella<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

<sup>2</sup>Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

<sup>3</sup>Universidad San Francisco de Quito, Escuela de Veterinaria

\*[tlandazuri021@puce.edu.ec](mailto:tlandazuri021@puce.edu.ec)

**RESUMEN.-**

Para la detección molecular de *Anaplasma* spp. por PCR se requiere de la extracción de ADN eficiente a partir de sangre completa, lo que a su vez depende de la calidad de la muestra de sangre. La falta de capacitación en toma de muestra o su incorrecta conservación conllevan a la obtención de sangre hemolizada/coagulada. Esto dificulta la detección molecular del patógeno, limitando el alcance de una investigación. Para resolver el problema con este tipo de muestra, se adaptó un protocolo de Chelex-100 con modificaciones sobre el volumen de sangre y la purificación del ADN. Se extrajo ADN de 30 muestras de sangre bovina, hemolizada/coagulada, con el protocolo adaptado y dos kits comerciales de extracción de ADN. Se comparó la positividad por PCR de *Anaplasma* spp. en las muestras obtenidas, determinándose una buena concordancia de resultados entre los tres protocolos de extracción. Adicionalmente, se empleó el protocolo modificado para obtener ADN a partir de 109 muestras de sangre bovina hemolizada/coagulada. De estas, 64% fueron positivas por PCR para *Anaplasma* spp.

El protocolo de Chelex-100 modificado es eficaz para la extracción de ADN a partir de sangre bovina, hemolizada y coagulada. El ADN obtenido con este protocolo permite la correcta detección molecular de *Anaplasma* spp. por PCR.

**PALABRAS CLAVE:** anaplasmosis, detección molecular, extracción de ADN, chelex-100, sangre.

**ABSTRACT.-**

Molecular detection of *Anaplasma* spp. by PCR requires efficient DNA extraction from whole blood, which in turn depends on the quality of the blood sample. Lack of training in sampling or improper preservation lead to hemolyzed/coagulated blood. This in turn can hinder the molecular detection of the pathogen, limiting the scope of any investigation. To solve the problem with this kind of sample, a Chelex-100 protocol was adapted with modifications in blood volume and DNA purification. We extracted DNA from 30 samples of hemolyzed/coagulated blood with the adapted protocol and two commercial DNA extraction kits. We compared the positivity of *Anaplasma* spp. by PCR in the samples obtained, determining a good concordance of results between the three extraction protocols. Additionally, the modified protocol was used to obtain DNA from 109 samples of hemolyzed / coagulated bovine blood. Of these, 64% tested positive for *Anaplasma* spp. by PCR.

The modified Chelex-100 protocol is effective for the extraction of DNA from hemolyzed and coagulated bovine blood. The DNA obtained with this protocol allows correct molecular detection of *Anaplasma* spp. by PCR.

**KEYWORDS:** anaplasmosis, blood, chelex-100, DNA extraction, molecular detection.

## **INTRODUCCIÓN.-**

La anaplasmosis, causada por especies del género *Anaplasma*, es reconocida por su impacto mundial en el sector de la salud y el sector pecuario (Reyna-bello 2014). Este género se clasifica dentro de la familia Anaplasmaeaceae y en el orden Rickettsiales, (Dumler et al. 2001). El género *Anaplasma* comprende un grupo de bacterias cocoideas, Gram negativas, no móviles, con un tamaño de 0,2 a 1 micras, cultivables en líneas celulares como por ejemplo HL-60 (Silaghi et al. 2017). Sus especies se destacan por ser parásitas obligatorias de células derivadas del proceso de hematopoyesis como: leucocitos, eritrocitos y/o plaquetas (Murray et al. 2017; Silaghi et al. 2017). En el ámbito veterinario, la anaplasmosis es una enfermedad debilitante que puede llegar a ser mortal. También puede producir pérdidas económicas importantes en el sector ganadero al disminuir la producción cárnica y lechera en algunos tipos de ganado (Goodger et al. 1979; Jonsson et al. 2008). El problema se agudiza por la existencia de portadores asintomáticos del patógeno quienes actúan como reservorio para la propagación de anaplasmosis incrementando el riesgo para las poblaciones ganaderas susceptibles la enfermedad (Aubry y Geale 2011). En el Ecuador, investigaciones recientes han reportado una alta positividad de anaplasmosis en ganado y en animales silvestres (Escobar et al. 2015; Pesquera et al. 2015; Muñoz-Guarnizo et al. 2017; Tana-Hernández et al. 2017).

Para la detección de *Anaplasma*, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) muestra mayor especificidad y sensibilidad en comparación con métodos convencionales como el cultivo, la serología y microscopía óptica (Aubry y Geale 2011; Silaghi et al. 2017). Además, la probabilidad de que ocurra detección cruzada de otros hemoparásitos al utilizar PCR es mínima (Aubry y Gale 2017). Un paso previo e importante para realizar la PCR es la extracción del ADN a partir de muestras clínicas. La eficiencia de la extracción de ADN es de alta importancia para obtener resultados confiables y repetibles durante la reacción de PCR. Idealmente, para detectar *Anaplasma* spp. se utiliza una muestra de sangre completa, esto es debido a la

capacidad que tiene este género para parasitar diferentes células sanguíneas (Silaghi et al. 2017). La sangre, como muestra, es compleja debido a que contiene diversos agentes que pueden inhibir la reacción de PCR (Al-Soud y Rådström 2001; Sidstedt et al. 2018). Esta situación se complica en las siguientes condiciones: falta de capacitación/inexperiencia en la toma de muestra y el muestreo en lugares remotos donde se dificulta la conservación o transporte óptimos. Bajo estas condiciones, es común observar la aparición de hemólisis y de coágulos, disminuyendo así la homogeneidad de la muestra. En el caso de hemólisis sanguínea, la hemoglobina y sus derivados son liberados en mayor cantidad. Por esta razón, la sangre hemolizada es generalmente descartada como muestra para detección molecular.

En el mercado existen diversos kits de extracción de ADN de diferentes casas comerciales, estos kits han sido diseñados para obtener ADN de alta calidad a partir de muestras complejas o de mala calidad como la sangre coagulada y hemolizada (Smith et al. 2003). Sin embargo, su elevado costo limita su uso en investigaciones de bajo presupuesto. El método de extracción con Chelex-100 es sencillo y barato de ejecutar, por lo tanto, es utilizado en una gran variedad de tejidos (Polski et al. 1998; Walsh et al. 2013). Este método requiere de tratamiento térmico para realizar la lisis celular y posteriormente la resina de Chelex 100 actúa como quelante, capturando iones de magnesio evitando así la acción de nucleasas que podrían degradar el ADN (Polski et al. 1998). El protocolo de Chelex-100 presentado por Singh et al. (2018) se destaca por obtener eficientemente ADN de alta cantidad y pureza. Este protocolo está diseñado para sangre seca en papel filtro, pero no ha sido descrito para su uso con muestras de sangre líquida, hemolizada y coagulada. Por lo tanto, se desconoce su utilidad para la extracción de ADN de este tipo de sangre con el objetivo de detectar molecularmente a patógenos. El presente estudio busca optimizar la técnica de Singh et al. (2018) para su uso con sangre hemolizada y coagulada para la detección molecular de *Anaplasma* spp. De esta forma se quería obtener un protocolo

que permita la correcta extracción de ADN, a partir de muestras de sangre hemolizada y coagulada, que permita la detección molecular confiable de *Anaplasma* spp.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.-**

### **Muestras.-**

Las muestras fueron obtenidas del proyecto “Planes de Finca” impulsado por el Gobierno Autónomo Descentralizado de la Provincia de Esmeraldas (GADPE) y el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) a cargo del investigador MDV. Lenin Vinuesa. En septiembre 2018, se extrajo 5 ml de sangre a partir de 149 bovinos infestados con garrapatas, en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante. Las muestras fueron conservadas a -20 °C durante 10 meses hasta el inicio de este proyecto de investigación. Al descongelar las muestras, mediante inspección visual, se pudo confirmar que todas estaban hemolizadas y contenían coágulos de pequeño o mediano tamaño, por lo que se procedió a comparar diferentes métodos de extracción que nos permitan obtener ADN de *Anaplasma* spp. a partir de estas muestras. El análisis molecular de este estudio fue realizado bajo el Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos Nro. MAE-DNB-CM-2018-0106.

### **Modificación de un protocolo de extracción de ADN que utiliza Chelex.-**

Basado en el protocolo de extracción de ADN publicado por Singh et al. (2018) para sangre seca en papel filtro, se realizó dos modificaciones: 1) volumen de sangre extraída y 2) modificaciones durante la fase de precipitación de proteínas. Para este experimento se utilizó diez muestras de sangre positivas para *Anaplasma* spp., previamente confirmadas mediante secuenciación del gen 16S rDNA.

De cada una de las 10 muestras de sangre hemolizada y coagulada positivas para *Anaplasma* spp. se utilizó tres diferentes volúmenes de sangre: 5 µl, 50 µl y 100 µl y se extrajo el ADN utilizando el procedimiento de extracción de ADN publicado por Singh et al. (2018) (ver

protocolo resumido en el Anexo 1). Se comparó la cantidad de ADN recuperado en cada volumen utilizado. Una vez definido en 50 µl el volumen con mayor cantidad y mejor pureza de ADN se procedió a modificar la fase de precipitación de proteínas del procedimiento de extracción de ADN publicado por Singh et al. (2018) utilizando las mismas 10 muestras positivas para *Anaplasma* spp. Esta modificación se realizó con el objetivo de aumentar la pureza del ADN extraído y consiste en la adición de pasos en el proceso de precipitación de proteínas (entre los pasos 10 - 11 del Anexo 1) que se la detalla a continuación:

- Añadir Etanol al 75 % en proporción 1:1 con el volumen de sobrenadante recuperado en el paso 10.
- Dejar reposar durante una noche a -20 °C. Aproximadamente 16 h.
- Centrifugar la mezcla a 13 000 rpm por 1,5 min.
- Recuperar el sobrenadante
- Realizar el paso 11 de acuerdo al procedimiento de Singh et al. (2018)

Se realizó la comparación de cantidad y pureza de ADN entre ambos protocolos ensayados.

### **Evaluación de la cantidad y pureza de ADN.-**

La concentración de ADN, las relaciones 260/280 y 260/230 fueron medidos por espectrofotometría con el equipo Nanovue PLUS™.

### **Comparación del protocolo modificado con kits comerciales Qiagen® y Bioneer®.-**

Para realizar esta comparación, se extrajo el ADN de 30 muestras de sangre hemolizada y coagulada con el kit de DNeasy Blood & Tissue Kits Print Qiagen®, el kit AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit Bioneer® y con el protocolo de Singh et al. (2018) modificado al que llamaremos de ahora en adelante: Protocolo de Chelex Modificado (PCM). Para ambos kits se siguieron las indicaciones detalladas por las casas comerciales respectivas para la extracción de

ADN a partir de sangre completa. Al finalizar la extracción con cada método se realizaron las alícuotas respectivas de cada extracto y se las conservó a -20 °C.

### **Detección de *Anaplasma spp.*-**

Para confirmar la utilidad del protocolo PCM en la detección molecular de *Anaplasma spp.* se realizó un PCR específico para este género bacteriano detallado por Zobba et al. (2014), en 109 muestras de sangre hemolizada y coagulada.

Con el objetivo de descartar la posibilidad de obtener falsos negativos debido a la inhibición de la reacción de PCR, el 10% de muestras fueron ensayadas con la reacción de PCR para el gen constitutivo  $\beta$ -Actina siempre presente en las muestras de sangre bovina (Du Breuil et al. 1993). El control positivo fue una muestra clínica caracterizada molecularmente como *Anaplasma spp.* El detalle de los cebadores y el tamaño del producto de ambas reacciones de PCR están detallados en la Tabla 1. Para revelar los resultados de PCR se realizó una electroforesis a 100 V por 30 minutos con geles de agarosa al 1,6 %, utilizando bromuro de etidio como agente intercalante. Los productos de la amplificación fueron visualizados con el equipo fotodocumentador ChemiDoc XRS+ (BioRad).

### **Análisis estadístico.-**

Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas con un nivel de significancia de 95 % con el software R v.3.3.0 (R Core Team 2019). Para determinar las diferencias en la cantidad de ADN entre los diversos volúmenes de sangre, se utilizó la prueba de Friedman con pruebas post-hoc de Wilcoxon y la corrección de Bonferroni aplicada (McLaughlin y Sainani 2014). La pureza de ADN, de los ensayos de precipitación de proteínas, fue comparada con la prueba no paramétrica Wilcoxon. La concordancia de los resultados de PCR entre los tres métodos de extracción fue determinada con la prueba Kappa de Cohen y la prueba McNemar (Sánchez-Otero 2016).

**Tabla 1:** Secuencias de Cebadores y Tamaño de Amplicones

Gen	Cebador	Secuencia: 5' – 3'	Tamaño amplicon	Referencia
<b>16S</b>	AnaplsppF	AGAAGAAGTCCCGGCAAAC	800 bp	Zobba et al. (2014)
	AnaplR3	GAGACGACTTTTACGGATTAGCTC		
<b><math>\beta</math>-actina</b>	XAHR 17	CGGAACCGCTCATTGCC	289 bp	DeBreuil et al. (1996)
	XAHR 20	ACCCACACTGTGCCCATCTA		

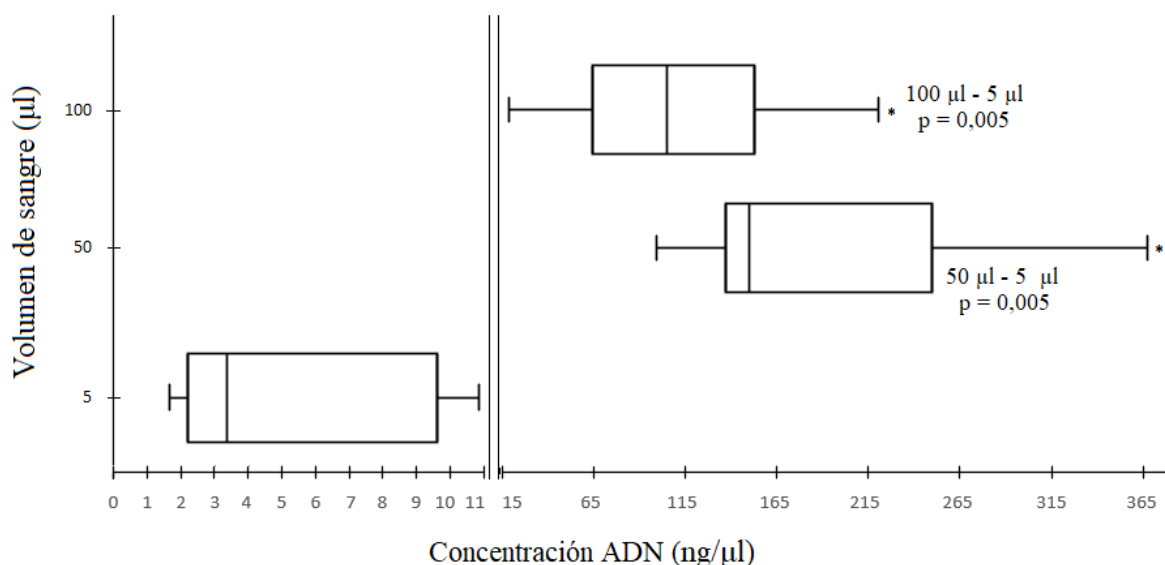
## RESULTADOS.-

### Adaptación del protocolo de Singh et al (2018) a sangre líquida, hemolizada y coagulada.-

#### Volumen de sangre.-

Las concentraciones de ADN se midieron para las muestras obtenidas de cada tratamiento de volumen de sangre. La concentración de ADN obtenida es diferente entre los volúmenes de sangre usada (Figura 1). Todas las muestras extraídas presentaban un pellet final de color rojo y de tamaño mediano.

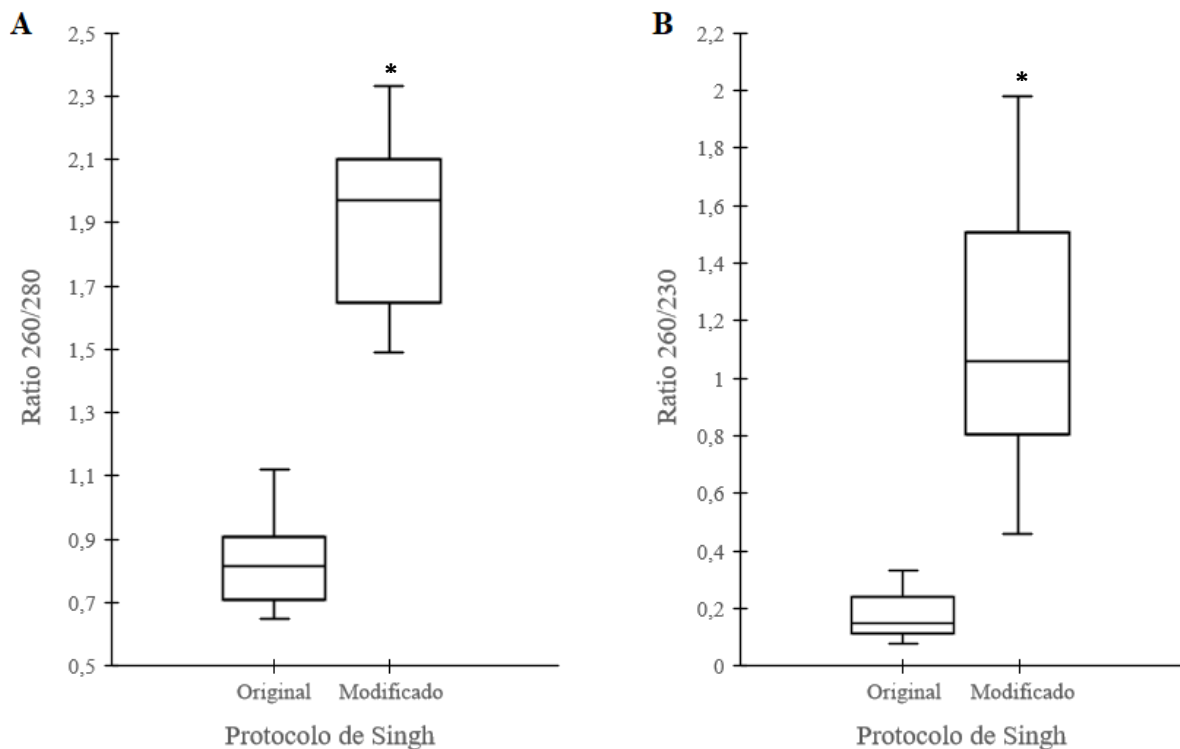




**Figura 1.** Concentración de ADN (ng/μl) obtenida por cada volumen de sangre (n = 10 muestras de sangre positivas para *Anaplasma* spp., previamente confirmadas mediante secuenciación del gen 16S rDNA). Existen diferencias significativas en la concentración de ADN dependiendo del volumen de sangre,  $\chi^2(2) = 16,800$ ,  $p = 0,000$ . El análisis post-hoc con la prueba de Wilcoxon fue realizado con la corrección de Bonferroni aplicada. Se determinan diferencias significativas de concentración de ADN entre volúmenes de sangre, excepto entre los volúmenes de 50 μl y 100 μl ( $Z = -2,293$ ,  $p = 0,066$ ).

### Fase de precipitación de proteínas.-

La pureza del ADN extraído es diferente según el protocolo empleado. El protocolo de Singh modificado presenta mayor pureza que el protocolo de Singh original (Figura 2). Visualmente, el pellet rojo ya no era evidente en las muestras obtenidas con el protocolo modificado.



**Figura 2.** Pureza de ADN obtenida para los Protocolos de Singh Original y Modificado (n = 10 muestras de sangre positivas para *Anaplasma* spp., previamente confirmadas mediante secuenciación del gen 16S rDNA). **A.** El protocolo modificado tuvo un efecto positivo y significativo sobre la relación 260/280 en comparación al protocolo original (Wilcoxon:  $Z = -2,803$ ,  $p = 0,005$ ). **B.** La comparación de medianas por prueba de Wilcoxon determina que el protocolo modificado obtiene relaciones 260/230 significativamente más altos que los obtenidos con el protocolo original ( $Z = -2,666$ ,  $p = 0,002$ ).

Se determinó que existe una disminución significativa de la concentración de ADN con el protocolo de Singh modificado (Wilcoxon:  $Z = -2,803$ ,  $p = 0,005$ ; mediana de protocolo original: 134,60 ng/μl, y mediana de protocolo modificado: 8,00 ng/μl). Adicionalmente, se realizó la reacción de PCR-*Anaplasma* spp. en las muestras de este ensayo y se confirmó la presencia del patógeno en todas las muestras de ADN. La diferencia observada entre ambos protocolos fue la presencia de bandas inespecíficas. Un mayor número de muestras obtenidas con el protocolo original presentaron bandas inespecíficas, mientras que con el protocolo modificado solo se visualizó amplicones inespecíficos en una muestra (Anexo 2).

## **Positividad de *Anaplasma* spp. en extractos de ADN obtenidos con kits comerciales vs PCM.-**

No se observó inhibición de la reacción de PCR en las muestras de ADN obtenidas con los tres métodos de extracción. Se obtuvo resultados equivalentes para la presencia de *Anaplasma* spp. entre los métodos de extracción (Tabla 2) con índices de concordancia Kappa de Cohen de 0,72 entre el protocolo PCM y los dos kits comerciales. La prueba exacta de McNemar determina que no existe diferencia significativa en la proporción de muestras positivas por PCR entre los kits y el protocolo PCM ( $p = 0,500$ ).

**Tabla 2.** Tablas cruzadas de resultados de *Anaplasma* spp. por reacción de PCR entre métodos de extracción (n=30).

		<b>Kit Qiagen®</b>	
		<b>Positivos</b>	<b>Negativos</b>
<b>PCM</b>	<b>Positivos</b>	25	0
	<b>Negativos</b>	2	3

		<b>Kit Bioneer®</b>	
		<b>Positivos</b>	<b>Negativos</b>
<b>PCM</b>	<b>Positivos</b>	25	0
	<b>Negativos</b>	2	3

**PCM= Protocolo de Singh modificado**

## **Aplicación del protocolo PCM a muestras de sangre hemolizada y coagulada para la detección molecular de *Anaplasma* spp.-**

De las 109 muestras extraídas con el protocolo PCM, se determinó que 70 fueron positivas para *Anaplasma* spp. por amplificación del gen 16S rDNA. El resumen de resultados se detalla en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Presencia de *Anaplasma* spp. por PCR (n = 109)

	<b>Positivos</b>	<b>Negativos</b>
<b>Número de Muestras</b>	70	39
<b>Porcentaje %</b>	64	36

## **DISCUSIÓN.-**

La anaplasmosis es una enfermedad de importancia veterinaria al tener un impacto negativo sobre el sector pecuario (Reyna-bello 2014). La FAO estima que en América Latina y el Caribe, aproximadamente el 80% de los productores ganaderos son pequeños agricultores familiares de zonas rurales (FAO 2016). A su vez, regiones rurales no poseen acceso constante a programas de control, erradicación o de conocimientos sobre la anaplasmosis. Por lo tanto, la investigación es necesaria para entender la realidad epidemiológica de esta enfermedad. En estas áreas rurales de difícil acceso es complicado asegurar la conservación. Esto, junto a la falta de experiencia en toma de muestra puede llevar a la aparición de hemolisis y coágulos que dificultan su posterior análisis. Esto podría llevar a la pérdida de muestras y, por lo tanto, de datos necesarios en investigaciones del género *Anaplasma*.

Este trabajo buscaba optimizar un protocolo de Chelex-100 modificado a partir de Singh et al. (2018) que permita el análisis de las muestras con las dificultades mencionadas. Además de permitir conocer la circulación y el impacto de *Anaplasma* spp. en estas poblaciones.

Al adaptar el protocolo de Singh et al. (2018) se determinó que la concentración de ADN incrementó a mayor volumen de sangre empleado. Se determinó que 50 µl era el volumen óptimo para continuar con la adaptación del protocolo. Durante estos ensayos, se observó que las muestras de ADN obtenidas presentaban un pellet de color rojizo. En cambio, Singh et al.

(2018) no reportaron la presencia visual de contaminantes en el ADN que ellos extraían. Esto demostraba que las muestras de sangre hemolizada y coagulada contenían mayor cantidad de contaminantes que debían ser removidos. Debido a esto se realizó la modificación con etanol para obtener mayor pureza de ADN.

En protocolos de extracción, el etanol es usado normalmente para la precipitación de ADN (Green y Sambrook 2016). En este estudio, el etanol fue usado con el fin de precipitar proteínas, posterior al tratamiento con acetato de sodio. Los estudios realizados por Cohn et al. (1947) y Ekwumemgbo et al. (1970) demostraron la utilidad del etanol, a bajas temperaturas, para precipitar proteínas sanguíneas de mayor solubilidad y estabilidad. Estos reportes concuerdan con los resultados obtenidos pues se determinó que el protocolo PCM permitía la remoción correcta de proteínas al obtenerse valores de la relación 260/280 alrededor de 1,80. Este hecho fue confirmado al no poderse visualizar ningún contaminante en forma de pellet rojo en los extractos de ADN. El método modificado (PCM) logró obtener los valores más altos de la relación 260/230 pero no llegaron al nivel óptimo de pureza determinado entre 2,0 – 2,2 para muestras de ADN (Thermoscientific 2012).

Se encontró que el protocolo modificado disminuye la concentración de ADN. Esta disminución es posible pues según Green y Sambrook (2016), la combinación de etanol al 75 % y acetato de amonio es suficiente para causar la precipitación de ADN. A pesar de esto, los resultados confirman que la menor concentración de ADN no causó falsos negativos en la detección molecular de *Anaplasma* spp. El protocolo PCM sacrifica pureza por concentración de ADN final, pero no afecta negativamente la detección por PCR de *Anaplasma* spp. Se determinó que existe una concordancia substancial más allá del azar entre los tres métodos de extracción ensayados (McHugh 2012). Adicionalmente, se demostró que el protocolo de extracción PCM permite obtener resultados de PCR al mismo nivel que dos kits de extracción comerciales. Es importante mencionar que el protocolo PCM propuesto posee un menor costo

por muestra que el kit de Qiagen® o el kit de Bioneer® (Tabla 4). La reducción de costo por muestra es relevante pues en el país los insumos de laboratorio puede costar hasta diez veces más que en países desarrollados como EE.UU (Rodríguez 2019).

**Tabla 4.** Costo relativo por muestra de métodos de extracción de ADN.

Método de extracción	Costo relativo por muestra
Kit comercial Qiagen®	\$\$\$
Kit comercial Bioneer®	\$\$
PCM	\$

Se determinaron limitaciones de este estudio en lo que respecta el diagnóstico de casos individuales, pero se resalta su utilidad en investigaciones donde el objetivo es determinar la circulación del patógeno. Esto se debe a que se tiene información sobre el límite de detección de PCM. Tomando en cuenta que animales portadores pueden tener cargas bacterianas menores a  $2,5 \times 10^3$  bacterias por ml de sangre (Corona González et al. 2014), es muy posible que los falsos negativos se den por baja carga bacteriana que el protocolo PCM no permite detectar.

Los resultados de nuestros análisis obtenidos a partir de muestras de sangre de animales infestados con garrapatas, vectores del género *Anaplasma*, coinciden con los resultados de otros estudios realizados en el Ecuador en los que se reportan positividades del 75 al 85 % (Escobar et al. 2015; Tana-Hernández et al. 2017). Lo que demuestra la utilidad del protocolo PCM para la detección molecular de *Anaplasma* spp.

## **CONCLUSIONES.-**

Se adaptó un protocolo barato de Chelex-100 para la extracción de ADN a partir de sangre hemolizada y coagulada. Es posible utilizar el protocolo PCM para reducir costos de investigación del género *Anaplasma*. El protocolo permite obtener resultados en la detección molecular por PCR de *Anaplasma* spp. a la par de kits comerciales. Se evidenció la utilidad del protocolo modificado (PCM) al emplearlo en la detección por PCR de *Anaplasma* spp. El protocolo PCM puede presentar un número pequeño de falsos negativos lo cual debe ser tomado en cuenta al momento de interpretar resultados.

## **Perspectivas.-**

Se debería determinar el límite de detección de ADN genómico de *Anaplasma* spp. en muestras de sangre con el protocolo establecido PCM.

La alta prevalencia debe ser estudiada con mayor profundidad y llevar a cabo la identificación a nivel de especie del género *Anaplasma*. con el objetivo de determinar la realidad de la anaplasmosis en Ecuador.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Al-Soud WA, Rådström P. 2001. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. J Clin Microbiol. 39(2):485–493. doi:10.1128/JCM.39.2.485-493.2001.

Aubry P, Geale DW. 2011. A review of Bovine anaplasmosis. Transbound Emerg Dis. 58(1):1–30. doi:10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x>.

Du Breuil RM, Patel JM, Mendelow B V. 1993. Quantitation of  $\beta$ -actin-specific mRNA transcripts using xeno-competitive PCR. *Genome Res.* 3(1):57–59. doi:10.1101/gr.3.1.57. <https://genome.cshlp.org/content/3/1/57.full.pdf>.

Cohn EJ, Hughes WL, Weare JH. 1947. Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. XIII. Crystallization of Serum Albumins from Ethanol-Water Mixtures. *J Am Chem Soc.* 69(7):1753–1761. doi:10.1021/ja01199a051. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01199a051>.

Corona González B, Obregón D, Alemán Y, Alfonso P, Vega E, Díaz A, Martínez S. 2014. Tendencias en el diagnóstico de la anaplasmosis bovina ,. *Rev Salud Anim.* 36(2):73–79. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2014000200001](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2014000200001).

Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, 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(6):2145–2165. doi:10.1099/00207713-51-6-2145.

Ekwumengbo PA, Kagbu JA, Nok AJ, Omoniyi IK, Ameh PO, Oladunni N. 1970. Isolation of Plasma Proteins from Bovine Blood by Cold Ethanol Precipitation and Anion Exchange Chromatography. *J Nepal Chem Soc.* 26:2–12. doi:10.3126/jncs.v26i0.3624. <https://www.nepjol.info/index.php/JNCS/article/view/3624>.



Escobar A, Cevallos O, Villarreal P, Carranza M, Carranza H, Pinargote E. 2015. Prevalence and detection by nested PCR of *Anaplasma marginale* in cattle and tick in the center of the coast of Ecuador. *Cienc y Tecnol* 2015. 8(1):11–17.

[http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2\\_V8 N1 2Escobar et al.pdf](http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_V8 N1 2Escobar et al.pdf).

FAO. 2016. Ganadería de América Latina y el Caribe puede jugar rol clave en el logro de los Objetivos de Desarrollo Sostenible. Of Reg la FAO para América Lat y el Caribe.

<http://www.fao.org/americas/noticias/ver/es/c/421098/>.

Goodger WJ, Carpenter T, Riemann H. 1979. Estimation of economic loss associated with anaplasmosis in California beef cattle. *J Am Vet Med Assoc*. 174(12):1333–1336.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/511736>.

Green MR, Sambrook J. 2016. Precipitation of DNA with Ethanol. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016(12):pdb.prot093377. doi:10.1101/pdb.prot093377.

Jonsson NN, Bock RE, Jorgensen WK. 2008. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Vet Parasitol*. 155(1–2):1–9. doi:10.1016/j.vetpar.2008.03.022.

McHugh ML. 2012. Interrater reliability: The kappa statistic. *Biochem Medica*. 22(3):276–282. doi:10.11613/bm.2012.031.

McLaughlin MJ, Sainani KL. 2014. Bonferroni, holm, and hochberg corrections: Fun names, serious changes to P values. *PM R*. 6(6):544–546.

Muñoz-Guarnizo T, Ayora-Fernández P, Luzuriaga-Neira A, Corona-González B, Martínez-Marrero S. 2017. Prevalence of *Anaplasma marginale* in cattle from Zamora Chinchipe province, Ecuador. <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v39n1/rsa09117.pdf>.

Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. 2014. *Microbiología médica*. Barcelona: Elsevier.

Pesquera C, Portillo A, Palomar AM, Oteo JA. 2015. Investigation of tick-borne bacteria (*Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. and *Borrelia* spp.) in ticks collected from Andean tapirs, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador. In: *Parasites and Vectors*. Vol. 8. BioMed Central Ltd.

Polski JM, Kimzey S, Percival RW, Grosso LE. 1998. Rapid and effective processing of blood specimens for diagnostic PCR using filter paper and Chelex-100. *J Clin Pathol - Mol Pathol*. 51(4):215–217. doi:10.1136/mp.51.4.215.

R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

Reyna-bello A. 2014. *Anaplasma marginale* : Logros y Retos. In: *Logros & Desafíos de la Ganadería Doble Propósito*.

[https://www.researchgate.net/publication/272025622\\_Anaplasma\\_marginale\\_Logros\\_y\\_Retos](https://www.researchgate.net/publication/272025622_Anaplasma_marginale_Logros_y_Retos).

Rodríguez V. 2019. La investigación científica en Ecuador es cinco veces más cara por costos de reactivos y equipos. <https://www.primicias.ec/noticias/tecnologia/investigacion-cientifica-ecuador-cuesta-cinco-veces-mas/>.

Sánchez-Otero J. 2016. *Introducción a la estadística no paramétrica y al análisis multivariado*. Quito, Ecuador: Giro Creativo: 12-13.

Sidstedt M, Hedman J, Romsos EL, Waitara L, Wadsö L, Steffen CR, Vallone PM, Rådström P. 2018. Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR. *Anal Bioanal Chem*. 410(10):2569–2583. doi:10.1007/s00216-018-0931-z.

Silaghi C, Santos AS, Gomes J, Christova I, Matei IA, Walder G, Domingos A, Bell-Sakyi L, Sprong H, Von Loewenich FD, et al. 2017. Guidelines for the Direct Detection of *Anaplasma* spp. in Diagnosis and Epidemiological Studies. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 17(1):12–22. doi:10.1089/vbz.2016.1960. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28055579>.

Singh UA, Kumari M, Iyengar S. 2018. Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin. *Biol Proced Online.* 20(1). doi:10.1186/s12575-018-0077-6.

Smith K, Diggle MA, Clarke SC. 2003. Comparison of commercial DNA extraction kits for extraction of bacterial genomic DNA from whole-blood samples. *J Clin Microbiol.* 41(6):2440–2443. doi:10.1128/JCM.41.6.2440-2443.2003.

Tana-Hernández L, Navarrete-Arroyo K, Ron-Román J, Reyna-Bello A, Chávez-Larrea MA. 2017. PCR-diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle populations of Ecuador and its molecular identification through sequencing of ribosomal 16S fragments. *BMC Vet Res.* 13(1). doi:10.1186/s12917-017-1311-1.

Thermoscientific. 2012. Assessment of Nucleic Acid Purity. [www.thermoscientific.com](http://www.thermoscientific.com).

Walsh PS, Metzger DA, Higushi R. 2013. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10(4): 506-13 (April 1991). *Biotechniques.* 54(3):134–139. doi:10.2144/000114018. <https://www.future-science.com/doi/10.2144/000114018>.

Zobba R, Anfossi AG, Parpaglia MLP, Dore GM, Chessa B, Spezzigu A, Rocca S, Visco S, Pittau M, Alberti A. 2014. Molecular investigation and phylogeny of *anaplasma* spp. in mediterranean ruminants reveal the presence of neutrophil-tropic strains closely related to *A. platys*. *Appl Environ Microbiol.* 80(1):271–280. doi:10.1128/AEM.03129-13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24162569>.

## **ANEXOS**

### **Anexo 1. Protocolo de Singh et al. (2018)**

#### **Extracción de ADN**

1. Calentar a 100 °C, 300 µl de solución stock Chelex-100 7% por 10 min.
2. Añadir 5 µl de sangre y calentar la mezcla por 8 min a 100 °C.
3. Mezclar con la ayuda de un vórtex por 15 s y recalentar por 7 min a 100 °C.
4. Centrifugar por 1,5 min a 12 000 RPM.
5. Recuperar el sobrenadante y descartar el pellet.

#### **Precipitación de Proteínas**

6. Añadir solución stock de Acetato de Amonio (7,5 M) al sobrenadante recuperado previamente de forma que la solución final tenga una concentración de 2,5 M
7. Reposar la mezcla por 5 min en hielo.
8. Mezclar con la ayuda de un vórtex por 10 s.
9. Centrifugar por 13 000 RPM por 10 min a - 4 °C.
10. Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo.

#### **Precipitación de ADN**

11. Añadir solución stock de Acetato de Sodio (3 M) al sobrenadante recuperado de forma que la solución final tenga una concentración de 0,3 M.
12. Añadir 200 µl de Etanol Absoluto.
13. Mezclar con la ayuda de un vórtex por 5 s.
14. Reposar la mezcla por 4 h a -20 °C.
15. Centrifugar a 13 000 RPM por 10 min a -4 °C. Descartar sobrenadante.
16. Lavar el pellet dos veces: la primera vez con 200 µl Etanol al 75 % helado y la segunda vez con 200 µl Etanol Absoluto helado. Cada lavado fue seguido por una centrifugación a 13 000 RPM por 10 min a -4 °C y el descarte del sobrenadante.
17. Dejar secar el pellet al aire por 10 min.
18. Resuspender en 100 µl de 1X AE

**Anexo 2. Resultados de PCR-*Anaplasma* spp. de protocolos de extracción diferentes.**

Protocolo original (Fila Arriba) y protocolo modificado (Fila Abajo).

